

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»

Методы исследований в паразитологии

Краткий курс лекций
для аспирантов II курса

Направление подготовки
06.01.01. Биологические науки
Профиль подготовки
Паразитология

Саратов 2014

УДК 619:616-093/098:616.9/99
ББК 48:48.73
П-18

Рецензенты:

Заведующий паразитологическим отделением микробиологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области»

Л.А. Удовикова

Начальник отдела лабораторного дела ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области»

О.Ю. Галиуллина

П18 Методы исследований в паразитологии: краткий курс лекций для аспирантов / Д.М. Коротова, Л.М. Кашковская // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2014. – 124 с. ISBN ...

Краткий курс лекций по дисциплине «Методы исследований в паразитологии» составлен в соответствии с программой дисциплины и предназначен для аспирантов. Краткий курс лекций содержит теоретический материал по основным вопросам общей и частной паразитологии. Направлен на формирование у студентов знаний об основных закономерностях эпизоотического процесса при инвазионных болезнях, на применение этих знаний для планирования и проведения профилактических мероприятий, для решения проблем животноводства. Материал ориентирован на вопросы профессиональной компетенции будущих специалистов сельского хозяйства.

УДК 619:616-093/098:616.9/99
ББК 48:48.73

© Коротова Д.М., Кашковская Л.М., 2013

ISBN ...

© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ»,

Введение

Цель – изучить и отработать методы определения возбудителей, научиться планировать и ставить опыты, оформлять протоколы экспериментов, проводить статистическую обработку полученных данных, правильно оформлять научную документацию, изучить библиографию.

Целями подготовки аспиранта являются:

- формирование навыков самостоятельной научно-исследовательской и педагогической деятельности;
- углубленное изучение теоретических и методологических основ паразитологии.

Лекция №1 Вводная. Планирование научных исследований.

История

Некоторые. гельминтозы [аскаридоз, энтеробиоз, дракункулез (ришта), тениидозы] были известны ещё в глубокой древности. Об инвазии аскаридами и цепнями упоминается в Папирусах Эберса (16 век до нашей эры). Гиппократ ввёл термины «Helminthos» и «Ascaridos». Ибн-Сина (1020) рекомендовал лечить аскаридоз цитварной полынью. М. Мальпиги в 1697 год впервые описал паразитирование гельминтов (фасциол) в печени человека. П. С. Паллас (1760) подверг критике теорию самозарождения гельминтов, утверждая, что заражение людей и животных Гельминтозы происходит при поступлении в их тело яиц паразитов через рот вместе с пищей и водой. Первый труд по медицинский гельминтологии принадлежит Бремсеру (J. Bremser, 1819). Дальнейшее развитие гельминтология получила в трудах по биологии трематод Стенструпа (Г. Steenstrup, 1842), трихинеллы — Гербста, Ценкера (G. Herbst, 1848; F. Zenker, 1860), эхинококка — Зибольда (С. Siebold, 1852), ришты А. П. Федченко (1869), вухерерий - П. Мансона (1877), широкого лентеца — М. Брауна (1883). В середине прошлого века были описаны как нозологические формы анкилостомидозы [Дубини (А. Dubini), 1838], моче-половой шистосоматоз [Бильхарц (Th. Bilharz), 1851]. Гризингер (W. Griesinger, 1854) установил этиологического роль анкилостом в развитии так называемый египетского хлороза. В конце 19 — начале 20 век описаны клонорхоз [Мак-Коннелл (J. McConnell), 1874], описторхоз (К. Н. Виноградов, 1891), стронгилоидоз [Норман (А. Normand), 1876], кишечный и японский шистосоматозы.

С. П. Боткин (1884) установил причинную связь между паразитированием широкого лентеца и развитием у больного анемии. В опытах самозаражения Коино (S. Koino, 1922) установил, что личинки аскарид, мигрируя по малому кругу кровообращения, вызывают лёгочный синдром, позднее описанный Леффлером (W. Löffler, 1932).

И. И. Мечников (1901), Р. Бланшар (1904), М. В. Вейнберг (1907), К. И. Скрябин (1923) указывали на роль гельминтов в переносе бактериальной флоры в организм человека. Аллергическая природа клинических проявлений острой фазы Гельминтозы была показана на примере трихинеллёза В. П. Баженовым (1935). Было установлено, что при инвазии широким лентецом развивается эндогенный авитаминоз В₁₂, являющийся причиной анемии [Г. Ф. Ланг, 1940; Бонсдорфф (В. Bonsdorff), 1948, 1951]. С начала 20 век при Гельминтозы стали применять иммунологический методы диагностики. Тальяферро (W. Taliaferro, 1929), Р. С. Шульц и Н. П. Шихобалова (с 1935 по 1940 год), Оливер-Гонсалес (J. Oliver-Gonzalez, 1946) положили начало систематическому изучению иммунитета при Гельминтозы.

Основные понятия: проблема, предмет исследования, объект исследования, гипотеза, методы исследования.

Научно-исследовательская работа чаще всего включает практическую часть, т.е. научное исследование. Любое исследование предполагает предварительную работу, цель которой — наметить общие контуры исследования, его программу, а также примерные сроки выполнения каждого этапа. Научно-исследовательская деятельность предполагает следующие этапы:

- 1 этап — определение проблемы, предмета и объекта исследования.
- 2 этап — изучение литературы по проблеме, уточнение основных понятий, предварительное описание предмета исследования и окончательное название работы.
- 3 этап — формулировка цели, задач и гипотезы исследования.
- 4 этап — выбор методов исследования.
- 5 этап — сбор фактического материала.
- 6 этап — обработка результатов исследования и их интерпретация.

Рассмотрим данные этапы и исследовательскую деятельность на каждом из них более подробно.

1 этап – определение проблемы, предмета и объекта исследования. В любом исследовании постановка проблемы является исходным пунктом.

Проблема – это неизученные или слабоизученные особенности, уровни, взаимосвязи каких-либо явлений, представляющих интерес, как для науки, так и для практики. Это вопрос, на который необходимо найти ответ, требующий определенных практических и теоретических действий.

В процессе определения проблемы существует соблазн охватить исследованием как можно более широкий круг явлений, получить ответы на все вопросы. Подобная ошибка распыляет усилия исследователя, снижает качество исследования, делает его поверхностным. Следует ограничивать свои интересы решением конкретной, актуальной проблемы.

Определение проблемы исследования тесно связано с выбором предмета и объекта исследования.

Предмет исследования – это конкретная особенность, факт, явление, рассмотрение и изучение которых необходимо для решения проблемы исследования.

Объект исследования – это то, что изучается; объектами исследования могут быть люди, группы людей, организации, физические объекты, психические феномены и т.п.

Продуманные и четко сформулированные проблема, предмет и объект исследования позволяют уже на первом этапе исследования определить объем и направленность предстоящей работы, тематику литературы, с которой необходимо познакомиться, заранее позаботиться о методиках. Также это экономит время, затрачиваемое на исследование.

2 этап – изучение литературы по проблеме, уточнение основных понятий, предварительное описание предмета исследования и окончательное название работы. Цель этого этапа – выяснить, что известно науке по изучаемой проблеме, а что изучено слабо или совсем не изучено. Это последнее и может составить специфику проблемы исследования.

Кроме того, исследователь часто сталкивается с проблемой неопределенности или противоречивости имеющихся в литературе понятий. В этом случае трудно сравнивать результаты разных исследований, если в них неоднозначно употребляются одни и те же понятия. Для нейтрализации этого факта исследователь должен изучить литературу по данной проблеме, чтобы быть в курсе той полемики, которая ведется в литературе относительно интересующих его понятий и теорий. Если однозначность в определении понятий не удалась, приходится принять одну из возможных точек зрения и обязательно оговорить это в дипломной работе.

Работа с литературой должна начинаться еще в процессе выбора темы. Она приобретает важнейшее значение после согласования плана работы.

Студент, как правило, подбирает требуемую литературу самостоятельно. Роль научного руководителя заключается в основном в рекомендациях и советах по отбору источников.

При работе с литературой в первую очередь изучается специальная научная литература, а затем периодические издания. При наличии нескольких изданий по определенной проблеме целесообразно избрать более позднее издание, отражающее окончательно сложившуюся точку зрения.

Широта и полнота изучения источников и литературы, умение выделить необходимое, главное, сопоставление и анализ различных фактических и статистических данных – важнейший показатель качества исследований студента и навыков работы с литературой.

Изучение литературы начинают с поисков соответствующих источников в библиотечных каталогах и просмотра библиографии прочитанных книг.

Выходные данные литературных источников по теме исследования можно записывать и составлять из них картотеку, что позволит легко составить перечень используемой литературы в дальнейшем.

Наиболее информативные литературные источники по теме исследования следует законспектировать, можно отметить собственные мысли и идеи, возникающие при прочтении литературы. На основании конспектов и выписок из прочитанной литературы осуществляют аналитическое описание предмета исследования. Обычно его делают в хронологической последовательности литературных источников, это фиксирует развитие представлений об

изучаемой проблеме. Обзор литературы заканчивается выводами о том, что известно науке по данной теме, что является спорным, что составляет сферу научных интересов студента. Сделанный обзор является черновым вариантом 1-й главы работы.

3 этап – формулировка цели, задач и гипотезы исследования. Анализ литературы дает возможность сформулировать цель и гипотезу исследования.

Цель исследования – это решение, изучение того вопроса, который составляет проблему исследования, уточненную в процессе анализа соответствующей литературы.

Гипотеза – это логически обоснованное предположение о структуре изучаемого предмета, о характере и сущности связей между изучаемыми явлениями и факторами, их детерминирующими.

Гипотеза определяет главное направление поисков и исследования, является основным методологическим инструментом, организующим весь процесс исследования.

Формулирование гипотезы исследования – задача довольно сложная, требующая настойчивой и кропотливой работы. Отсутствие гипотезы характеризует отсутствие проблемы или крайнюю нечеткость ее формулировки.

При формулировке гипотезы следует соблюдать следующие условия:

- гипотеза не должна содержать понятий, которые не уточнены;
- она должна быть проверяема при помощи имеющихся методик.

В результате проверки гипотезу доказывают или опровергают. Проверить гипотезу – значит проверить те следствия, которые логически из нее вытекают. Предположение, сформулированное в гипотезе, носит вероятностный характер; это означает, что сделанное предположение справедливо лишь с определенной долей вероятности. В ходе исследования необходимо доказать достоверность вероятностного предположения.

Задачи исследования конкретизируют цель и служат для проверки гипотезы. Задача выдвигается столько, сколько необходимо для проверки гипотезы.

4 этап – выбор методов исследования. Для проверки выдвинутой гипотезы (или нескольких гипотез) подбирают методы и методики, адекватные задачам исследования.

Методы исследования – это инструмент исследователя. Они помогают четко регламентировать процедуру исследования, достаточно четко фиксировать изучаемые явления, открывают путь к достижению цели и позволяют экономить силы и время. Однако не следует забывать, что методики наиболее эффективны, когда ими пользуется человек, способный творчески мыслить и самостоятельно анализировать и синтезировать полученный материал.

Успех исследования повышается при сочетании различных методов, что позволяет раскрыть различные стороны изучаемого явления и обеспечить взаимопроверку объективности получаемых результатов.

5 этап – сбор фактического материала. Прежде чем осуществлять сбор необходимой информации, нужно научиться хорошо владеть выбранными методиками. Для этого полезно проверить их на объекте, не входящем в исследование (пилотажное, пробное исследование), что позволит учесть проблемы, как самой методики, так и работы с ней. После этого проводятся необходимые процедуры по сбору первичной информации, учитываются этические критерии при работе с людьми, обращается внимание на правильное и точное применение методик, что повышает объективность результатов.

Сбор фактического материала осуществляется, как правило, в процессе производственной и научно-исследовательской практики и является ответственным этапом подготовки курсовой работы. Ее качество, объективность выводов во многом будут зависеть от того, насколько правильно и полно подобран и проанализирован фактический материал.

Изучение многих (порой противоречивых) фактов, их сопоставление и анализ позволяет выявить закономерности, основные тенденции развития исследуемого явления, его логические взаимосвязи, а также экономическое и правовое значение. Приводимые факты и цифровой материал должны быть достоверны.

В работе студенту необходимо выявить и изложить основные тенденции изучаемых процессов, подкрепить их наиболее типичными примерами и цифровыми расчетами, а также обосновать применяемые методы исследования и выбрать наиболее эффективные методы математического анализа.

6 этап – обработка результатов исследования и их интерпретация. На этом этапе проводят обработку собранных материалов, пользуясь существующими в данной области науки методами (статистический анализ, графическое, математическое и иное моделирование и др.). Полученные данные группируют, представляя в виде таблиц, графиков и диаграмм.

Теоретическая интерпретация – самый ответственный шаг в деятельности исследователя. Для этого он должен иметь хорошую теоретическую подготовку по соответствующей дисциплине. Именно на этом этапе исследователь вновь возвращается к гипотезе, выясняет степень ее подтверждения или не подтверждения.

Полный анализ полученных результатов позволяет сформулировать практические рекомендации по данной проблеме.

Систематизация, анализ и обработка фактического материала предлагают широкое использование в курсовой работе таблиц, диаграмм, графиков, схем, которые не только содействуют наглядности приводимого на страницах работы материала, но и убедительно раскрывают суть исследуемых явлений.

Сбор и обработка фактического материала являются самым трудоемким этапом в подготовке курсовых работ, поэтому этот этап должен быть под особым вниманием студента и научного руководителя.

В целях ускорения обработки и систематизации фактического материала рекомендуется широко использовать современную вычислительную технику с соответствующими статистическими программами (например, Excel, SPSS, STATISTICA и др.). На этом заканчивается само исследование и начинается его оформление.

Вопросы для самоконтроля

1. Этапы научного исследования.
2. Методы научного исследования?
3. Кто основоположник гельминтологии в России?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Лекция №2

Современные проблемы иммунологии гельминтозов

Современные проблемы иммунологии гельминтозов

Белорусский НИИ экспериментальной ветеринарии, Минский медицинский институт, Республиканский центр гигиены и эпидемиологии

Иммунология гельминтозов — это сравнительно новое научное направление, становление и развитие которого началось 3—4 десятилетия тому назад. Постепенно накапливаются сведения о механизмах противогельминтозного иммунитета [37, 41, 42], определяются возможности практического применения иммунологических методов в профилактике и борьбе с гельминтозами [11, 12]. Важность и необходимость последнего аспекта определяются, с одной стороны, широким распространением гельминтозов, а с другой — необходимостью поиска новых противогельминтозных мероприятий, так как традиционные не всегда дают желаемый результат.

Антигенная структура гельминтов. Антигенными свойствами обладают ткани тела гельминтов и их секреты. Гельминтозные антигены неоднородны по своей структуре и состоят из множества компонентов. Установлено, что видоспецифическими свойствами обладает меньшая часть антигенов гельминтов, большинство же антигенов идентично другим видам гельминтов, простейшим и бактериям (так называемые перекрестно реагирующие антигены). Показано, что антигены, приготовленные из аскарид, по своим биологическим эффектам сходны с антигенами бактериальной природы [22]. У многих гельминтов обнаружены антигены, общие с хозяином. Это обстоятельство может повышать патогенность паразитов, поскольку хозяин в этом случае не распознает их как "не свое" и не отвечает на них выработкой иммунитета и другими защитными реакциями. Общие антигены являются также причиной развития при определенных условиях аутоиммунных процессов при гельминтозах.

Механизмы противогельминтозного иммунитета. Иммунный ответ при гельминтозах, так же как и при бактериальных и вирусных инфекциях, представляет собой цепь дифференцировок иммунокомпетентных клеток организма хозяина под влиянием антигенов, выделяемых паразитом. Одна популяция клеток — В-лимфоциты — формирующаяся под влиянием костного мозга, трансформируется в плазматические клетки, продуцирующие антитела (гуморальный иммунитет), а другая — Т-лимфоциты — формирующаяся под контролем тимуса, трансформируется в иммунные малые лимфоциты, участвующие в реакциях клеточного иммунитета. Иммунные малые лимфоциты выделяют в кровь множество медиаторов, представляющих собой гуморальные факторы клеточного иммунитета.

Антитела при гельминтозах относятся в основном к четырем классам иммуноглобулинов — IgG, IgM, IgE, IgA [16, 17]. Качественное и количественное содержание антител зависит от вида и стадии развития гельминтов. В ранний период заболевания в сыворотке крови обычно преобладают IgM, которые постепенно вытесняются IgG [3]. Очень мало пока известно о противопаразитарных антителах класса IgA. Их титры в сыворотке крови, как правило, невысоки. Имеются сведения, что эти антитела выделяются слизистыми оболочками кишечника, бронхов, влагалища. Сообщается о снижении содержания IgA в сыворотке крови при гименолепидозе, однако окончательно их функция пока не установлена [3, 13]. У хозяев, инвазированных гельминтами, особенно высока концентрация IgE. Полагают, что воспалительная реакция, обусловленная IgE, — это эволюционно сформировавшаяся форма противопаразитарной защиты позвоночных. Иммуноглобулины класса IgE, по-видимому, создают в коже, слизистых оболочках кишечного тракта и респираторных органах хозяина барьер, препятствующий свободной миграции личинок. В связи с усиленной местной продукцией IgE и их концентрацией непосредственно в зоне обитания гельминтов можно предполагать важное значение реакций местного иммунитета. В частности, сообщается о протективной активности местных воспалительных реакций в неосложненной стадии альвеолярного эхинококка [17, 26].

Протективным действием обладают гуморальные антитела, относящиеся к классам IgG и IgM, способные повреждать тело гельминтов; формировать преципитаты вокруг

их выводных отверстий, нарушающие нормальное течение физиологических процессов паразита; связывать выделяемые ими ферменты [11].

Помимо специфического ответа гельминты способны стимулировать продукцию неспецифических иммуноглобулинов всех классов (до 80% общего количества). При этом наблюдаются очень высокие уровни неспецифических IgE, особенно при аскаридозе, токсокарозе, трихинеллезе, шистосомозе, филяриидозах. С диагностической точки зрения высокие уровни IgE при отсутствии атопии с большой степенью вероятности свидетельствуют о наличии гельминтоза [17].

Выявлена также важная роль тучных клеток, выделяющих вазоамины, усиливающие проницаемость стенок сосудов, что способствует проникновению антител в пораженную зону, а также обуславливает развитие аллергических воспалительных реакций немедленного типа, участвующих в защитных реакциях организма хозяина. В настоящее время имеются все основания считать, что протективным эффектом при гельминтозах обладают аллергические реакции не только немедленного, но и замедленного типа (клеточный иммунитет). К их числу следует отнести формирование гранулем вокруг личинок и яиц гельминтов в тканях [3, 11, 17]. В механизмах иммунологической защиты и освобождении хозяина от паразитов важное место отводится эозинофилам и цитокинам [38, 39].

Напряженность и проявления иммунитета при гельминтозах. Иммунный ответ хозяина существенно зависит от особенностей морфологии и биологии гельминтов. К числу этих особенностей следует отнести крупные размеры гельминтов; их межклеточную, а не внутриклеточную, как у вирусов, локализацию; чрезвычайную сложность структуры и разнообразие жизненных функций; отсутствие размножения в теле хозяина; выраженную цикличность развития и смену сред обитания, а также значительные различия морфологической структуры, характера обмена, антигенных и иммунных свойств разных стадий развития [3]. Вследствие этого при большинстве гельминтозов иммунитет характеризуется относительно слабой степенью напряженности, особенно при однократном заражении малым количеством инвазионного материала. Наиболее напряженный иммунитет вырабатывается при так называемых тканевых гельминтозах — трихинеллезе, филяриидозах, шистосомозах. Относительно напряженный иммунитет развивается также при кишечных мигрирующих гельминтозах — аскаридозе, анкилостомидозах и при инвазиях, возбудители которых определенный период времени проводят в толще слизистой оболочки кишечника (гименолепидоз, трихоцефалез). При гельминтозах, вызываемых кишечными немигрирующими гельминтами (тениаринхоз, энтеробиоз), иммунитет выражен слабо.

Состояние иммунитета при гельминтозах характеризуется непродолжительными сроками его сохранения, которые в большинстве случаев ограничены периодом пребывания гельминта в организме инвазированного хозяина.

В соответствии со стадийностью развития гельминтов иммунный ответ хозяина также характеризуется стадийностью. Наблюдения многих авторов показали, что напряженность иммунитета в большинстве случаев выше в период паразитирования личиночной стадии по сравнению с кишечной стадией возбудителя, что обусловлено высокой антигенной активностью секретов и экскретов личинок, особенно в период линьки [3, 11, 17].

Особенностью иммунного ответа при гельминтозах является также его слабая специфичность, обусловленная гетерогенностью антигенов гельминтов и наличием у них наряду с видо- и стадийспецифическими антигенами, составляющими лишь незначительную часть антигенной мозаики, множества антигенов, перекрестно реагирующих с антигенами других, таксономически не только близких, но и далеких по систематическому положению видов, а также с антигенами хозяина. Это, с одной стороны, затрудняет специфическую иммунологическую диагностику гельминтозов, а с другой — обуславливает возможность неспецифической защиты, когда присутствие в организме хозяина паразитов одного вида ограничивает восприимчивость к другому виду. Показано, например, что у мышей, инвазированных трихинеллами, развивался иммунитет к аскаридам, и наоборот [11].

При заражении гельминтами иммунного хозяина наиболее типичными особенностями противогельминтозного иммунитета являются:

— **снижение интенсивности инвазии;**

- замедленное и неравномерное развитие гельминтов;
- длительное пребывание гельминтов в личиночной стадии, обуславливающее феномен "латентных" гельминтозов;
- сокращение сроков жизни гельминтов;
- угнетение репродуктивной активности гельминтов;
- преждевременное выведение гельминтов из организма хозяина.

Кроме того, известно, что гельминты обладают и иммуносупрессивным действием на организм хозяина [4, 7, 10]. В основе этого явления лежит способность гельминтов подавлять защитные реакции хозяина к другим инфицирующим его агентам. Одним из механизмов этой гетерологичной иммуносупрессии может быть феномен конкуренции антигенов, при котором Т-лимфоциты, активированные антигенами гельминтов, подавляют способность В-лимфоцитов вырабатывать антитела к антигенам второго инфицирующего агента. При появлении в организме хозяина под влиянием антигенов гельминтов большого количества Т-лимфоцитов-супрессоров, подавляющих метаболизм других субпопуляций Т-лимфоцитов, может развиваться иммунологическая толерантность, которая является вторым механизмом иммуносупрессии. Важный механизм иммуносупрессии, как теперь установлено, — подавление пролиферации Т- и В-лимфоцитов особыми цитотоксическими веществами, продуцируемыми гельминтами [8, 9].

Иммунологические методы в борьбе с гельминтозами. Можно выделить три основных иммунологических направления в борьбе с гельминтозами: 1) иммунодиагностика; 2) иммунотерапия; 3) иммунопрофилактика.

В рамках **иммунодиагностического** направления разработан ряд иммунологических тестов, используемых для индивидуального обследования больных и лиц с подозрением на ту или иную инвазию, а также для массового обследования населения эндемичных районов. Набор этих тестов включает не менее 15 иммунологических реакций, но наиболее перспективными в настоящее время можно считать Две: РПГА (реакция пассивной гемагглютинации) и ИФА (иммуноферментный анализ). Обе реакции обладают высокой степенью чувствительности и специфичности и удобны для массового применения [20, 23, 28, 40].

Массовые иммунологические обследования населения могут быть использованы для решения четырех важнейших задач в области профилактики и борьбы с гельминтозами [11, 19].

1. Уточнение паразитологической ситуации. В результате иммунологических обследований осуществляется раннее и полное выявление лиц, инвазированных гельминтами. Такая возможность обусловлена тем, что гуморальные антитела в организме инвазированного человека появляются уже на стадии паразитирования личинок гельминта. Например, антитела к аскаридам обнаруживаются в сыворотке крови уже через 5—10 дней после заражения, к трихинеллам — через 2—3 недели. Возможна также ранняя диагностика описторхоза [15, 21, 32].

Проведенные нами в Минске исследования с использованием ИФА среди страдающих различными инфекционными и соматическими заболеваниями позволили выявить 19,55% лиц, инвазированных личинками токсокар. Наиболее часто антитела к токсокарозному антигену обнаруживали у лиц с длительной лихорадкой неясной этиологии [29].

Иммунологическое обследование населения может быть проведено для уточнения этиологии и истинного размера вспышек трихинеллеза [12], разграничения острой и хронической стадии описторхоза [18, 21].

2. Оценка эффективности лечения. Установлено, что после радикального удаления паразита титры антител снижаются и реакции постепенно переходят из положительных в отрицательные. Применение иммунодиагностических тестов особенно важно для оценки эффективности терапии тканевых гельминтозов, в частности токсокароза [5]. После хирургического вмешательства при эхинококкозе титры антител снижались уже через 2-3 мес, а через 1-1,5 года после операции реакция становилась отрицательной. В случае рецидива болезни, связанного с неполным удалением паразитарного пузыря при альвеококкозе или с удалением не всех ларвоцист эхинококка, титры реакции оставались высокими в течение всего периода наблюдения, длившегося 3—5 лет [11]. Сообщается о нормализации основных показателей Т-системы иммунитета после излечения анкилостомидозов [25].

3. Оценка эффективности комплекса противогельминтных

мероприятий. Иммунологическое обследование может дать более правильное представление об эпидемиологическом эффекте работы, чем копрологические методы. Объясняется это тем, что с помощью копрологических анализов невозможно выявить лиц, у которых в момент обследования паразиты не достигли половой зрелости, а также лиц, пораженных тканевыми гельминтами [12].

4. *Сероэпидемиологический надзор за паразитарными заболеваниями.* Система сероэпидемиологического надзора позволяет постоянно владеть паразитологической ситуацией, своевременно и целенаправленно проводить противогельминтные мероприятия. В данном случае иммунологические методы применяются для определения уровня эндемии; выявления контингентов лиц, находящихся в условиях высокого риска заражения; районирования территории; определения границ очага и ареала инвазии; установления интенсивности ее передачи и величины иммунной прослойки, а при гельминтозах с коротким течением инвазии — для определения сроков и длительности сезона массового заражения [14, 27, 30, 31].

Вопросы **иммунотерапии** гельминтозов только начинают изучаться. Большинство специалистов это направление оценивается как перспективное, особенно в связи с проблемой лечения тканевых гельминтозов, в частности таких, в отношении которых эффективно пока лишь хирургическое лечение (эхинококкоз, альвеококкоз, цистицеркоз мозга).

В терапии гельминтозов целесообразно использование иммуностимуляторов. В медицинской практике препараты, стимулирующие функции иммунной системы, при гельминтозах находят пока ограниченное применение. Гораздо шире иммуностимуляторы при гельминтозах используются в ветеринарной медицине. Имеющиеся данные свидетельствуют о высокой эффективности метилурацила при гельминтозах овец [8]. Применение в качестве иммуностимулятора фумаровой кислоты усиливало иммунитет у телят и на 20,40—39,17% снижало пораженность гельминтами желудочно-кишечного тракта без назначения антигельминтных препаратов [2, 35]. При применении тималина у овец, инвазированных гельминтами, на фоне увеличения содержания Т- и В-лимфоцитов в 46—58% случаев происходило освобождение от легочных и желудочно-кишечных нематодозов [36]. Тималин также стимулирует иммунный ответ у зараженных альвеококкозом мышей и крыс [1].

В системе профилактики и борьбы со многими инфекционными болезнями ведущая роль принадлежит **иммунопрофилактике** [24]. Гельминтозы, по масштабам распространенности уступающие лишь острым респираторным заболеваниям и гриппу, могли бы явиться очень важным объектом иммунопрофилактики. Однако уникальность противогельминтного иммунитета столь велика, что, несмотря на большое количество исследований, вакцины, пригодные для профилактики гельминтозов у человека, пока не созданы. В этом отношении успехи ветеринарной гельминтологии более заметны. Многие годы проводилось изучение вакцинации животных яйцами и личинками гельминтов, ослабленных воздействием рентгеновских лучей. В Великобритании, Австралии, Польше и других странах таким способом вакцинируют жвачных против диктиокаулеза. Аналогичным образом приготовлена вакцина из эзофагостом [43]. Применялась иммунизация овец вакцинами из облученных личинок остертагий [44], гемонхов [45], буностом [46]. Протективными и иммуногенными свойствами при 2-3-кратном введении ягнятам обладает поливалентная гельминтозная вакцина [6]. В Белорусском НИИ экспериментальной ветеринарии создана вакцина против стронгилоидоза. В лабораторных и производственных условиях установлено, что протективная эффективность вакцины на основе неполного адьюванта Фрейнда составила 79,13%, а на основе гидроокиси алюминия — 75,66% [33, 34].

Таким образом, в последние годы изучены многие аспекты проблемы иммунологии гельминтозов. Теоретическая значимость полученных результатов несомненна. Их практическая реализация открывает перспективы существенного повышения эффективности мер профилактики и борьбы с гельминтозами. Дальнейший прогресс в этом направлении во многом будет зависеть от реализации комплексности в работе специалистов медицинского, ветеринарного и биологического профиля.

1. Иммунодиагностика гельминтозов.
2. Как оценить эффективность лечения?
3. Иммунотерапия гельминтозов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Лекция №3

Библиография: Правила оформления списка литературных источников и ссылок на литературу.

Список использованной литературы и источников

Общие требования

Список использованной литературы:

- является органической частью любой учебной или научно-исследовательской работы и помещается после основного текста работы;
- позволяет автору документально подтвердить достоверность и точность приводимых в тексте заимствований: таблиц, иллюстраций, формул, цитат, фактов, текстов памятников и документов;
- характеризует степень изученности конкретной проблемы автором;
- представляет самостоятельную ценность, так как может служить справочным аппаратом для других исследователей;
- является простейшим библиографическим пособием, поэтому каждый документ, включенный в список, должен быть описан в соответствии с требованиями ГОСТ 7.1 – 2003. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления; ГОСТ 7.12 – 93. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке; ГОСТ 7.80 – 2000. Библиографическая запись. Заголовок. Общие требования и правила составления; ГОСТ 7.82 – 2001. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Библиографическое описание электронных ресурсов; ГОСТ 7.83 – 2001. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Электронные издания. Основные виды и выходные сведения.

Каждая библиографическая запись в списке получает порядковый номер и начинается с красной строки.

Выбор заглавия списка

Рекомендуются следующие варианты заглавия списка:

- библиографический список;
- литература;
- список использованной литературы;
- список использованных источников и литературы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК – если включаются библиографические описания использованных, цитируемых, рассматриваемых, упоминаемых и (или) рекомендуемых документов;

ЛИТЕРАТУРА – если включается вся изученная автором литература, независимо от того, использовалась она в работе или нет;

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ – если включается только та литература, которая анализировалась или использовалась в тексте в виде заимствований;

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ – если включаются, кроме изученной литературы, и источники (памятники литературы, документы и т.д.).

Расположение литературы в списке

Расположение литературы в списке избирается автором в зависимости от характера, вида и целевого назначения работы.

Наиболее известны способы расположения литературы:

- алфавитный;
- систематический;
- по главам работы;
- хронологический;
- по видам источников;
- в порядке упоминания литературы в тексте.

АЛФАВИТНОЕ РАСПОЛОЖЕНИЕ – по фамилиям авторов, заглавиям книг и статей, если фамилия автора не указана. В начало алфавитного списка можно вынести, если таковые

имеются, нормативно-правовые акты. Иностранные источники обычно размещают по алфавиту после перечня всех источников на языке работы. Не следует смешивать разные алфавиты.

СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ РАСПОЛОЖЕНИЕ – все книги, статьи и другие материалы подбираются по отраслям знаний, отдельным вопросам, темам в логическом соподчинении отдельных рубрик. В начале указывается литература общего характера, охватывающая широкий круг вопросов, а затем следует материал по отдельным темам, вопросам.

РАСПОЛОЖЕНИЕ ПО ГЛАВАМ РАБОТЫ – близко к систематическому расположению. В начале так же указывается литература общего характера, имеющая отношение ко всей теме, затем по главам (в пределах глав литература подбирается по алфавиту или в хронологии опубликования книг и статей).

ХРОНОЛОГИЧЕСКОЕ РАСПОЛОЖЕНИЕ – в порядке хронологии (прямой или обратной) опубликования документов. Используется для работ по истории науки, истории изучения какого-либо вопроса, в работах, посвященных деятельности определенного лица. В хронологическом порядке часто подбираются произведения одного автора.

РАСПОЛОЖЕНИЕ ПО ВИДАМ ИСТОЧНИКОВ:

- нормативные акты международного уровня (в порядке обратной хронологии опубликования документов):

а) Конституция;

б) кодексы;

в) нормативные акты федерального уровня:

1) Федеральные Законы;

2) Указы Президента;

3) Постановления Правительства;

4) инструкции министерств и ведомств.

г) нормативные акты регионального уровня:

1) законы законодательных органов субъектов Федерации;

2) указы губернаторов краев, областей, президентов республик;

3) постановления администрации краев, областей, правительств республик.

г) нормативные акты местного уровня:

1) решения органов местного самоуправления;

2) корпоративные акты (внутриорганизационные, внутрифирменные).

- документальные материалы, составляющие источниковую базу исследования (архивные документы, летописи, письма, дневники, воспоминания, статистические сборники, ежегодники, материалы социологических исследований и т.п.) – в хронологическом порядке;

- перечень отечественной и зарубежной литературы по теме (книги, статьи, сообщения, тезисы докладов, депонированные рукописи, препринты, нормативно-техническая докумен-

2
тация, электронные ресурсы и пр.) – по алфавиту того языка, на котором дается библиографическая запись документа.

РАСПОЛОЖЕНИЕ В ПОРЯДКЕ УПОМИНАНИЯ ЛИТЕРАТУРЫ В ТЕКСТЕ – применяется в небольших по объему работах: авторефератах диссертаций, статьях, тезисах докладов и др.

Все отступления от этих правил должны оговариваться особо.

Библиографическая запись

Библиографическая запись содержит библиографические сведения о документе, приведенные по определенным правилам, устанавливающим наполнение и порядок следования областей и элементов, и предназначенные для идентификации и общей характеристики документа. Пунктуация в библиографической записи выполняет две функции – обычных грамматических знаков препинания и знаков предписанной пунктуации, т. е. знаков, имеющих опознавательный характер для областей и элементов библиографической записи. Предписанная пунктуация (условные разделительные знаки) способствует распознаванию отдельных элементов в описаниях на разных языках.

Предписанная пунктуация предшествует элементам и областям или заключает их. Ее

употребление не связано с нормами языка. Каждой области описания, кроме первой, предшествует знак точка и тире, который ставится перед первым элементом области.

Для более четкого разделения областей и элементов, а также для различения предписанной и грамматической пунктуации применяют пробел в один печатный знак до и после предписанного знака. Исключение составляют точка и запятая – пробелы оставляют только после них.

В конце библиографической записи ставится точка. В списке литературы следует приводить все обязательные, а иногда факультативные сведения о документе.

Общая схема библиографической записи отдельно изданного документа, включающая обязательные элементы:

Заголовок (фамилия, имя, отчество одного автора, как правило, первого, если их не более 3-х)

Заглавие (название книги, указанное на титульном листе)

: сведения, относящиеся к заглавию (раскрывают тематику, вид, жанр, назначение документа и т.д.)

/ сведения об ответственности (содержат информацию об авторах, составителях, редакторах, переводчиках и т.п. ; об организациях, от имени которых опубликован документ)

. – сведения об издании (содержат данные о повторности издания, его переработке и т.п.)

. – Место издания

: Издательство или издающая организация, дата издания

. – Объем (сведения о количестве страниц, листов).

Источником сведений для библиографической записи является титульный лист или иные части документа, заменяющие его. Запись составляется под фамилией первого автора, если авторов не более 3-х, и под заглавием, если авторов 4 и более, и авторы указаны не на титульном листе.

3

ПРИМЕРЫ БИБЛИОГРАФИЧЕСКОЙ ЗАПИСИ НЕКОТОРЫХ ДОКУМЕНТОВ **КНИГИ (однотомники)**

Книга с одним автором

Балабанов, И.Т. Валютные операции / И.Т. Балабанов. – М. : Финансы и статистика, 1993. – 144 с.

Книга с двумя авторами

Корнелиус, Х. Выиграть может каждый : как разрешать конфликты / Х. Корнелиус, Ш. Фэйр ; пер. П. Е. Патрушева. - М. : Стрингер, 1992. – 116 с.

Книга с тремя авторами

Киселев, В.В. Анализ научного потенциала / В.В. Киселев, Т.Е. Кузнецова, Б.В. Кузнецов. – М. : Наука, 1991. – 126 с.

Книга с четырьмя и более авторами

Теория зарубежной судебной медицины : учеб. пособие / В.И. Алисиевич, Ю.С. Пурдяев, Ю.В. Павлов [и др.]. – М. : Изд-во Ун-та дружбы народов, 1990. – 40 с.

Сборник

Малый бизнес: перспективы развития : сб. обзоров / отв. ред. В.С. Ажаева. – М. : ИНИОН, 1991. – 147 с.

МНОГОТОМНИКИ

Под именем индивидуального автора

Издание в целом:

Самойлов, Д.С. Избранные произведения : в 2 т. / Д.С. Самойлов ; вступ. ст. И. Шайтанова. – М. : Худож. лит., 1989. – Т. 1 – 2.

Отдельный том:

Самойлов, Д.С. Избранные произведения. В 2 т. Т. 2 : Поэмы / Д.С. Самойлов. – М. : Худож. лит., 1989. – 333 с.

Под заглавием

Издание в целом:

Практикум по гражданскому праву : учеб. пособие для студентов вузов : в 2 ч. / под ред. Н.И. Коваленко. – М. : Изд-во БЕК, 1993. – Ч. 1 – 2.

4

Отдельный том:

Практикум по гражданскому праву : учеб. пособие для студентов вузов. Ч. 2 / под ред. Н.И. Коваленко. – М. : Изд-во БЕК, 1993. – 202 с.

СЕРИАЛЬНЫЕ ИЗДАНИЯ

К сериальным изданиям относятся периодические, продолжающиеся и сериальные издания (газеты, журналы, труды, ученые записки, книжные серии и т.п.).

В списках литературы применяют сводную запись.

Журналы

Издания в целом:

Государство и право : ежемес. журн. / РАН, Ин-т государства и права. – М., 1968 – 1979.

Вопросы экономики : ежемес. журн. / РАН. – М., 1989 – 1993.

Отдельный выпуск журнала:

Новый мир : ежемес. журн. худож. лит. и обществ. мысли. – № 4 (796). – М., 1991. – 256 с.

Газеты

Московский комсомолец : обществ.-полит. молодеж. газ. – М., 1991.

Деловой мир : ежедн. газ. СНГ. – М., 1990 – 1993.

Труды

Издания в целом:

Труды / Рос. гос. б-ка. – М., 1957 – 1987.

Отдельный выпуск трудов:

Вопросы гидрологии болот / под ред. С.М. Новикова. – Л. : Гидрометеиздат, 1988. – 152 с. : ил. – (Тр. Гос. гидрол. ин-та ; вып. 333).

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Конституция (Основной Закон) Российской Федерации – России : принята на внеочеред. седьмой сес. Верхов. Совета РСФСР девятого созыва 12 апр. 1978 г. с изм. и доп. – М. : Верхов. Совет РФ : Известия, 1992. – 110 с.

Об охране окружающей среды : закон Российской Федерации. – М. : Республика : Верховный Совет Российской Федерации, 1982. – 62 с.

Российская Федерация. Президент (1991 – ; Б.Н. Ельцин). Сборник распоряжений Президента Российской Федерации, ноябрь 1991 г. – март 1992 г. – М. : Известия, 1992. – 110 с.

5

ДИССЕРТАЦИИ

Медведева, Е.А. Высшее библиотечное образование в СССР: проблемы формирования профиля: (история, современное состояние, перспективы) : дис. ... канд. пед. наук : 05.25.03 / Е.А. Медведева ; Моск. гос. ин-т культуры. – М., 1986. – 151 с.

Стародубцева, И.Н. Специфика реферативной библиографической информации по стыковым наукам: (на прим. кристаллографии) : автореф. дис. ... канд. пед. наук : 05.25.03 / И.Н. Стародубцева ; Моск. гос. ин-т культуры. – М., 1989. – 16 с.

СТАНДАРТЫ

ГОСТ 7.9 – 95. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. – Взамен ГОСТ 7.9 – 77 ; введ. 01.07.95. – Минск : ИПК Изд-во стандартов, 1996. – 7 с.

Кабели радиочастотные : сборник : ГОСТ 11326.0 – 78, ГОСТ 11326.1 – 79, ГОСТ 11326.92 – 79. – М. : Изд-во стандартов, 1982. – 447 с. : ил.

ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКИЕ НОРМАТИВЫ, ПРЕЙСКУРАНТЫ, ИНСТРУКЦИИ

Нормы времени на холодную штамповку, пробивку отверстий, резку сортового и профильного проката на прессах : утв. науч.-произв. об-нием "Строймаш" 02.03.90. – Киев : ВНИПИ труда, 1990. – 105 с.

Прейскурант № 19 – 08. Оптовые цены на редукторы и муфты соединительные : утв.

Госкомцен СССР 12.08.80 : ввод в действие 01.01.82. – М. : Прейскурантиздат, 1980. – 60 с.
Типовая инструкция по эксплуатации теплоотдачи тепловых электростанций : ТИ 34-70-044 – 85 : утв. Гл. техн. упр. по эксплуатации энергосистем 01.10.85 : срок действия установлен с 01.01.86 до 01.01.95 / М-во энергетики и электрификации СССР. – М., 1986. – 43 с.

ПАТЕНТНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

А. с. 1005822 СССР. Сгуститель пульпы / Д.А. Калиновский, Г.М. Золотарев. – № 2569116/23 – 26 ; заявл. 16.01.78 ; опубл. 23.05.85, Бюл. № 11. – 2 с.

А. с. 1214497 СССР. Циркуль / В.А. Плейкинс, В.А. Селезнев, А.Е. Носов [и др.]. – № 3784751/28 – 12 ; заявл. 30.08.84 // Открытия. Изобретения. – 1986. – № 8. – С. 105.

НЕОПУБЛИКОВАННЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Унификация и аттестация методов контроля основных параметров щелоков сульфатного производства : отчет о НИР (заключит.) / Всесоюз. науч.-произв. объединение бум. пром-сти ; рук. работы М. Генова ; исполн. В.Г. Тимофеева. – М., 1985. – 75 с. – 09-026.01.86 ; № ГР 01810075357 ; инв. № 02850010004.

АРХИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Материалы следственной комиссии, учрежденной в связи с распространением в воскресных школах антиправительственной пропаганды. – Центр. гос. архив Моск. обл., ф. 1282, оп. 1, д. 74, л. 73.

6

ПРЕПРИНТЫ

Костюк, Г.Я. Математическое моделирование биомеханизма / Г.Я. Костюк, А.П. Жученко, Б.Б. Нестеренко. – Киев, 1988. – 58 с. – (Препринт / АН УССР, Ин-т математики ; 86.15).

ДЕПОНИРОВАННЫЕ РУКОПИСИ

Васильева, И.И. Структура деятельности коллектива и задачи руководителя / И.И. Васильева ; Рост. гос. ун-т. – Ростов-н/Д, 1995. – 10 с. – Деп. в ИНИОН РАН 25.05.95, № 41920.

ЭЛЕКТРОННЫЕ РЕСУРСЫ

Схема записи электронного ресурса

Основное заглавие = Параллельное заглавие : сведения, относящиеся к заглавию / сведения об ответственности. – Сведения об издании / сведения об ответственности, относящиеся к изданию, дополнительные сведения об издании. – Обозначение вида ресурса. – Место издания : имя издателя, дата издания. – Специфическое обозначение материала и количество физических единиц : другие физические характеристики ; размер. – Примечание. – Стандартный номер = Ключевое заглавие : режим доступа.

ПРИМЕРЫ БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ЗАПИСЕЙ

ЭЛЕКТРОННЫХ РЕСУРСОВ

Ресурсы локального доступа

Даль, В.И. Толковый словарь живого русского языка Владимира Даля [Электронный ресурс] : подгот. по 2-му печ. изд. 1880 – 1882 гг. / В.И. Даль. – Электрон. дан. – М. : АСТ [и др.], 1998. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Загл. с экрана.

Сидыганов, В.У. Модель Москвы [Электронный ресурс] : электронная карта Москвы и Подмосковья / В.У. Сидыганов, С.Ю. Толмачев, Ю.Э. Цыганков. – Версия 2.0. – Электрон. дан. и прогр. – М. : FORMOZA, 1998. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Загл. с экрана.

Библиография по социальным и гуманитарным наукам, 1993 – 1995 [Электронный ресурс] / Ин-т науч. информ. по обществ. наукам (ИНИОН). – Электрон. дан. и прогр. – М., 1995. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Загл. с вкладыша контейнера.

Ресурсы удаленного доступа

Исследовано в России [Электронный ресурс] : многопредмет. науч. журн. / Моск. физ.-тех. ин-т. – Электрон. журнал. – Долгопрудный : МФТИ, 1998. – Режим доступа к журн. : <http://zhurnal.mipt.rssi.ru>. – Загл. с экрана.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ БИБЛИОГРАФИЧЕСКАЯ ЗАПИСЬ

Объектом аналитической библиографической записи является составная часть документа, для идентификации и поиска которой необходимы сведения о документе, в котором она

7

помещена. Перед сведениями о документе, в котором помещена составная часть, применяют соединительный элемент: знак две косые черты с пробелами до и после него. Аналитическая библиографическая запись – это запись составной части документа (статьи, главы, параграфа и т.п.), и выглядит она следующим образом:

Сведения о составной части документа // Сведения о документе, в котором помещена составная часть.

ПРИМЕРЫ АНАЛИТИЧЕСКОЙ БИБЛИОГРАФИЧЕСКОЙ ЗАПИСИ

Произведение из собрания сочинений

Герцен, А.И. Тиранство сибирского Муравьева / А.И. Герцен // Собр. соч. : в 30 т. – М., 1968. – Т. 14. – С. 315 – 316.

Статья из сборника

Строганов, М.В. Читатели Пушкина / М.В. Строганов // О литературе, писателях, читателях : сб. ст. / Тверской гос. ун-т. – Тверь, 1994. – С. 52 – 58.

Сахаров, В. Возвращение замечательной книги: заметки о романе М.А. Булгакова "Мастер и Маргарита" / В. Сахаров // За строкой учебника : сб. ст. – М., 1989. – С. 216 – 229.

Статья из словаря

Яновский, А.Е. Библиография / А.Е. Яновский // Энциклопедический словарь / Ф.А. Брокгауз, И.А. Ефрон. – СПб., 1891. – Т. 3, полут. 6. – С. 709 – 785.

Аналитическая библиографическая запись законодательного документа

О бюджете фонда социального страхования Российской Федерации на 1998 год : федеральный закон от 14 июля 1999 года № 164 – ФЗ // Российская газета. – 1999. – 21 июля. – С. 6.

Глава или раздел из книги

Костиков, В. Не будем проклинать изгнание / В. Костиков // Пути русской эмиграции. – М., 1990. – Ч. 1, гл. 3 : В центре Европы. – С. 59 – 86.

Муравьев, А.В. Культура Руси IX – первой половины XII вв. / А.В. Муравьев, А.М. Сахаров // Муравьев, А.В. Очерки истории русской культуры IX – XVII вв. : кн. для учителя / А.В. Муравьев, А.М. Сахаров. – М., 1984. – Гл. 1. – С. 7 – 74.

Статья из журнала

Статья с одним автором

Тренин, Д. Надеяться следует осторожно / Д. Тренин // Новое время. – 1996. – № 4. – С. 34 – 35.

8

Статья с двумя авторами:

Алексеева, Д.Г. Инвестиционный кредит / Д.Г. Алексеева, С.В. Пыхтин // Закон. – 2006. – № 3. – С. 56 – 61.

Статья с тремя авторами

Эдельштейн, К.К. Экспериментальная оценка погрешности модельного расчета стратификации водной толщи в водохранилище / К.К. Эдельштейн, Ю.С. Даценко, В.В. Пуклаков // Вестник Московского университета. Серия 5, География. – 2005. – № 6. – С. 20 – 25.

Статья с четырьмя и более авторами

О потенциальной алмазоносности гранатовых амфиболитов п-ова Камчатский Мыс (Восточная Камчатка) / Е.Г. Сидоров, А.Б. Осипенко, А.П. Козлов [и др.] // Записки Российского минералогического общества. – 2006. – Ч. 135, № 1. – С. 3 – 20. – Библиогр.: с. 18 – 20.

Статья из газеты

Антонова, С. Урок на траве : заметки из летнего лагеря скаутов / С. Антонова // Известия. – 1990. – 3 сент. – С. 3.

Горн, Р. Скауты вышли из подполья / Р. Горн // Учительская газета. – 1991. – № 38. – С. 9.

Статья из продолжающегося издания

Абраменко, И.А. Создание коммунистических отрядов особого назначения в Западной Сибири (1920 г.) / И.А. Абраменко // Ученые записки / Том. ун-т. – 1962. – № 43. – С. 83 – 96.

Грунов, В.И. Испытание триаида фосфорной кислоты в качестве азотного и фосфорного удобрений / В.И. Грунов // Труды / Казан. с.-х. ин-т. – 1971. – Вып. 66. – С. 55 – 63.

Статья из электронных ресурсов

Петрова, И.Н. Оформление библиографических ссылок на электронные информационные ресурсы / И.Н. Петрова // Вестник АлтГУ [Электронный ресурс] / АлтГУ. – Электрон. дан. – Барнаул, 2000. – Заглавие с экрана. – Режим доступа : <http://www.lib.dsn-asu.ru>.

Рецензии и рефераты

Черкасов, П. Три цвета времени / П. Черкасов // Новый мир. – 1989. – № 5. – С. 262 – 265. – Рец. на кн.: Смирнов, В.П. Франция: страна, люди, традиции / В.П. Смирнов. – М. : Мысль, 1988. – 287 с.

Пискунов, В. Евангелие от компьютера / В. Пискунов // Литературное обозрение. – 1988. – № 1. – С. 43 – 47. – Рец. на кн.: Тендряков, В.Ф. Покушение на миражи : роман / В.Ф. Тендряков // Новый мир. – 1987. – № 4. – С. 59 – 116.; №5. – С. 89 – 164.

Шахматы древних // Наука и жизнь. – 1981. – № 1. – С. 37. – Реф. ст.: Буряков, Ю.Ф. К датировке и атрибуции некоторых шахматных наборов: (В свете находок 1977 г. на Афрасиабе) / Ю.Ф. Буряков // Советская археология. – 1980. – № 3. – С. 162 – 172.

9

ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА ЦИТИРОВАНИЯ

Цитата – точная, буквальная выдержка из какого-нибудь текста.

Цитаты должны применяться тактично по принципиальным вопросам и положениям.

Не рекомендуется слишком обильное цитирование (употребление двух и более цитат подряд).

Не допускается соединять две цитаты в одну. Это равносильно подделке.

Цитировать авторов необходимо только по их произведениям. Когда источник не доступен, разрешается воспользоваться цитатой этого автора, опубликованной в каком-либо другом издании. В этом случае ссылке должны предшествовать слова: Цит. по кн.: ...; Цит. по ст.: Например:

Цит. по кн.: Шимони К. Физическая электроника. – М., 1977. – С. 52.

При цитировании нужно соблюдать точное соответствие цитаты источнику. Допустимы лишь следующие отклонения:

- могут быть модернизированы орфография и пунктуация по современным правилам, если это не индивидуальная орфография или пунктуация автора;
- могут быть пропущены отдельные слова, словосочетания, фразы в цитате при условии, что, во-первых, мысль автора не будет искажена пропуском, во-вторых, этот пропуск будет обозначен многоточием.

Цитаты, точно соответствующие источнику, обязательно берутся в кавычки. Кавычки не ставят в стихотворной цитате, выключенной из текста, в цитате, взятой эпиграфом к книге или статье, в перефразированной цитате.

На каждую цитату, оформленную в кавычках или без кавычек, а также любое заимствование из чужой работы (таблицу, схему, карту и т. п.) должна быть дана библиографическая ссылка. Применение чужих идей, фактов, цитат без ссылки на источник заимствования является нарушением авторского права и расценивается как плагиат, т.е. присвоение чужого авторства, выдача чужого произведения или изобретения за собственное.

Вопросы для самоконтроля

1. Виды библиографических записей.
2. Состав библиографической записи.
3. Оформление ссылок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7

3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Лекция №4
Научный эксперимент:
Понятие, правила планирования и постановки эксперимента, подбора животных и оформления протоколов исследований.

Современные методы исследования не только позволяют изучать ткани как единое целое, но и выделять из них отдельные типы клеток для изучения их жизнедеятельности в течение длительного времени, выделять отдельные клеточные органеллы и составляющие их макромолекулы (например, молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты - ДНК), исследовать их функциональные особенности.

Такие возможности открылись в связи с созданием новых приборов и технологий - различных типов микроскопов, компьютерной техники, рентге-ноструктурного анализа, применения метода ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), радиоактивных изотопов и автордиографии, электрофореза и хроматографии, фракционирования клеточного содержимого с помощью ультрацентрифугирования, разделения и культивирования клеток, получения гибридов; использования биотехнологических методов - получения гибридом и моноклональных антител, рекомбинантных ДНК и др.

Таким образом, биологические объекты можно изучать на тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Несмотря на внедрение в естественные науки разнообразных биохимических, биофизических, физических и технологических методов, необходимых для решения многих вопросов, связанных с жизнедеятельностью клеток и тканей, гистология в своей основе остается морфологической наукой с присущим ей набором методов. Последние позволяют охарактеризовать процессы, происходящие в клетках и тканях, их структурные особенности.

Главными этапами цитологического и гистологического анализа являются выбор объекта исследования, его подготовка для изучения под микроскопом, качественный и количественный анализ изображений гистологических элементов.

Объектами исследования служат живые и фиксированные клетки и ткани, их изображения, полученные при использовании световых и электронных микроскопов или на экране дисплея. Существует ряд методов, позволяющих проводить анализ указанных объектов.

2.1. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Основным методом изучения биологических микрообъектов являются световая и электронная микроскопия, которые широко используются в экспериментальной и клинической практике.

Микроскопирование - главный метод изучения микрообъектов, используемый в биологии более 300 лет. Для изучения гистологических препаратов применяют разнообразные виды световых микроскопов и электронные микроскопы. С момента создания и применения первых микроскопов они постоянно совершенствовались. Современные микроскопы представляют собой сложные оптические системы, обладающие высокой разрешающей способностью. Размер самой маленькой структуры, которую можно видеть с помощью микроскопа, определяется наименьшим разрешаемым расстоянием (d), которое в основном зависит от длины волны света (λ) и длины волн электромагнитных колебаний потока электронов и др. Эта зависимость приближенно определяется формулой $d = \lambda/2$. Таким образом, чем меньше длина волны, тем меньше разрешаемое расстояние, и тем меньше по размерам микроструктуры можно видеть в препарате.

Световая микроскопия. Для изучения гистологических микрообъектов применяют обычные световые микроскопы и их разновидности, в которых используются источники света с волнами различной длины. В обычных световых микроскопах источником освещения служит естественный или искусственный свет (рис. 2.1). Минимальная длина волны видимой части спектра примерно 0,4 мкм. Следовательно, для обычного светового микроскопа наименьшее разрешаемое расстояние приблизительно составляет 0,2 мкм, а общее увеличение (произведение увеличения объектива на увеличение окуляра) может быть 1500-2500.

Таким образом, с помощью светового микроскопа можно увидеть не только отдельные клетки размером от 4 до 150 мкм, но и их внутриклеточные структуры - органеллы, включения. Для усиления контрастности микрообъектов применяют их окрашивание.

Ультрафиолетовая микроскопия. Это разновидность световой микроскопии. В ультрафиолетовом микроскопе используют более короткие ультрафиолетовые лучи с длиной волны около 0,2 мкм. Разрешаемое расстояние здесь в 2 раза меньше, чем в обычных световых микроскопах, и составляет приблизительно 0,1 мкм. Полученное в ультрафиолетовых лучах невидимое глазом изображение преобразуется в видимое с помощью регистрации на фотопластинке или путем применения специальных устройств (люминесцентный экран, электронно-оптический преобразователь).

Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия. Явления флюоресценции заключаются в том, что атомы и молекулы ряда веществ, поглощая коротко-

а - световой биологический микроскоп «Биолам-С»: 1 - основание; 2 - тубусодержатель; 3 - наклонный тубус; 4 - окуляр; 5 - револьвер; 6 - объективы; 7 - столик; 8 - конденсор с ирисовой диафрагмой; 9 - винт конденсора; 10 - зеркало; 11 - микрометрический винт; 12 - макрометрический винт; б - электронный микроскоп ЭМВ-100АК с автоматизированной системой обработки изображений: 1 - колонка микроскопа (с электронно-оптической системой и камерой для образцов); 2 - пульт управления; 3 - камера с люминесцентным экраном; 4 - блок анализа изображений; 5 - датчик видеосигнала; в - конфокальный микроскоп: 1 - световой микроскоп; 2 - регистратор изображения (фотоэлектронный умножитель);

3 - сканирующее устройство для перемещения светового луча по оси X, Y, Z;

4 - блок питания и стойка управления лазерами; 5 - компьютер для обработки изображений

волновые лучи, переходят в возбужденное состояние. Обратный переход из возбужденного состояния в нормальное происходит с испусканием света, но с большей длиной волны. В флюоресцентном микроскопе в качестве источников света для возбуждения флюоресценции применяют ртутные или ксе-ноновые лампы сверхвысокого давления, обладающие высокой яркостью в области спектра 0,25-0,4 мкм (ближние ультрафиолетовые лучи) и 0,4-0,5 мкм (сине-фиолетовые лучи). Длина световой волны флюоресценции всегда больше длины волны возбуждающего света, поэтому их разделяют с помощью светофильтров и изучают изображение объекта только в свете флюоресценции. Различают собственную, или первичную, и наведенную, или вторичную, флюоресценцию. Любая клетка живого организма обладает собственной флюоресценцией, однако она часто бывает чрезвычайно слабой.

Первичной флюоресценцией обладают серотонин, катехоламины (адреналин, норадреналин), содержащиеся в нервных, тучных и других клетках, после фиксации тканей в парах формальдегида при 60-80 °С (метод Фалька).

Вторичная флюоресценция возникает при обработке препаратов специальными красителями - флюорохромами.

Существуют различные флюорохромы, которые специфически связываются с определенными макромолекулами (акридиновый оранжевый, родамин, флюоресцеин и др.). Например, при обработке препаратов акридиновым оранжевым ДНК и ее соединения в клетках имеют ярко-зеленое, а РНК и ее производные - ярко-красное свечение. Существует много красителей, с помощью которых можно выявить белки, липиды, внутриклеточные ионы кальция, магния, натрия и др. Таким образом, спектральный состав излучения несет информацию о внутреннем строении объекта и его химическом составе. Вариант метода флюоресцентной микроскопии, при котором и возбуждение, и излучение флюоресценции происходят в ультрафиолетовой области спектра, получил название метода ультрафиолетовой флюоресцентной микроскопии.

Для повышения контрастности флюорохромированных объектов применяется конфокальный вариант оптического микроскопа (см. рис. 2.1, в). В качестве освещения используется пучок монохроматического света малого диаметра, который создает лазерный источник. В каждый момент времени в фокусе микроскопа находится небольшой участок (объем) клетки. Пучок света перемещается по объекту (сканирует объект по осям X, Y, Z). При каждом перемещении пучка света по одной из линий сканирования получается

информация об исследуемой структуре, находящейся в данной точке (объеме) по линии сканирования (оптическом срезе клетки), например о локализации белков в составе микротрубочек в клетке. Вся полученная информация от каждой точки сканирования клетки передается на компьютер, объединяется с помощью специальной программы и выдается на экран монитора в виде контрастного изображения. С помощью данного метода микроскопии получается информация о форме клеток, цитоскелете, структуре ядра, хромосом и др. С помощью программы компьютер на основе полученной информации по каждой линии сканирования создает объемное изображение клетки, что позволяет рассматривать клетку под разными углами зрения.

Фазово-контрастная микроскопия. Этот метод служит для получения контрастных изображений прозрачных и бесцветных живых объектов, невидимых при обычных методах микроскопирования. Метод основан на том, что свет, проходя структуры с различным коэффициентом преломления, изменяет свою скорость. Используемая конструкция оптики микроскопа дает возможность преобразовать не воспринимаемые глазом фазовые изменения прошедшего через неокрашенный препарат света в изменения его амплитуды, т. е. яркости получаемого изображения. Метод фазового контраста обеспечивает контрастность изучаемых неокрашенных структур за счет специальной кольцевой диафрагмы, помещаемой в конденсоре, и так называемой фазовой пластинки, находящейся в объективе. Разновидностью метода фазового контраста является метод фазово-темнопольного контраста, дающий негативное по сравнению с позитивным фазовым контрастом изображение.

Микроскопия в темном поле. В темнопольном микроскопе только свет, который дает дифракцию (огибание волнами) структур в препарате, достигает объектива. Происходит это благодаря наличию в микроскопе специального конденсора, который освещает препарат строго косым светом; лучи от осветителя направляются сбоку. Таким образом, поле выглядит темным, а мелкие частицы в препарате отражают свет, который далее попадает в объектив. В клинике этот метод применяют для изучения кристаллов в моче (мочевая кислота, оксалаты), для демонстрации спирохет, в частности *Treponema pallidum*, вызывающей сифилис, и др.

Интерференционная микроскопия. Разновидностями фазово-контрастного микроскопа являются интерференционный микроскоп, который предназначен для количественного определения массы ткани. Дифференциальный интерференционный микроскоп (с оптикой Номарского) используют для изучения рельефа поверхности клеток и других биологических объектов.

В интерференционном микроскопе пучок света от осветителя разделяется на два потока: один проходит через объект и изменяется по фазе колебания, второй идет, минуя объект. В призмах объектива оба пучка накладываются друг на друга. В результате строится изображение, в котором участки микрообъекта разной толщины и плотности различаются по степени контрастности. Проведя количественную оценку изменений, определяют концентрацию и массу сухого вещества.

Фазово-контрастный и интерференционный микроскопы позволяют изучать живые клетки. В них используется интерференция, возникающая при комбинации двух наборов волн и создающая изображение микроструктур. Преимуществом фазово-контрастной, интерференционной и темно-польной микроскопии является возможность наблюдать клетки в процессе движения и митоза. При этом регистрация движения клеток может производиться с помощью цейтраферной (покадровой) микровидеосъемки.

Поляризационная микроскопия. Поляризационный микроскоп является модификацией светового микроскопа, в котором установлены два поляризационных фильтра: первый (поляризатор) - между пучком света и объектом, а второй (анализатор) - между линзой объектива и глазом. Через первый фильтр свет проходит только в одном направлении, второй фильтр имеет главную ось,

которая располагается перпендикулярно первому фильтру, и он не пропускает свет. Получается эффект темного поля. Структуры, содержащие продольно ориентированные молекулы (коллаген, микротрубочки, микрофиламенты), и кристаллические структуры, обладают свойством вращать ось световых лучей, исходящих из поляризатора. При изменении оси вращения данные структуры проявляются как светящиеся на темном фоне. Способность

кристаллов или паракристаллических образований к раздвоению световой волны на обыкновенную и перпендикулярную к ней называется двойным лучепреломлением. Такой способностью обладают фибриллы поперечнополосатых мышц.

Электронная микроскопия. Большим шагом вперед в развитии техники микроскопии было создание и применение электронного микроскопа (см. рис. 2.1). В электронном микроскопе используется поток электронов с волнами более короткими, чем в световом микроскопе. При напряжении 50 000 В длина волны электромагнитных колебаний, возникающих при движении потока электронов в вакууме, равна 0,0056 нм. Теоретически рассчитано, что разрешаемое расстояние в этих условиях может быть около 0,002 нм, или 0,000002 мкм, т. е. в 100 000 раз меньше, чем в световом микроскопе. Практически в современных электронных микроскопах разрешаемое расстояние составляет около 0,1-0,7 нм.

В гистологии используются трансмиссионные (просвечивающие) электронные микроскопы (ТЭМ), сканирующие (растровые) электронные микроскопы (СЭМ) и их модификации. С помощью ТЭМ можно получить лишь плоскостное изображение изучаемого микрообъекта. Для получения пространственного представления о структурах применяют СЭМ, способные создавать трехмерное изображение. Растровый электронный микроскоп работает по принципу сканирования электронным микрозондом исследуемого объекта, т. е. последовательно «ощупывает» остро сфокусированным электронным пучком отдельные точки поверхности. Такое исследование объекта называется сканированием (считыванием), а рисунок, по которому движется микрозонд, - растром. Полученное изображение выводится на телевизионный экран, электронный луч которого движется синхронно с микрозондом.

Главными достоинствами растровой электронной микроскопии являются большая глубина резкости, широкий диапазон непрерывного изменения увеличения (от десятков до десятков тысяч раз) и высокая разрешающая способность. Современными вариантами приборов для изучения поверхности объекта является атомно-силовой микроскоп и сканирующий туннельный микроскоп.

Электронная микроскопия с использованием метода замораживания - скалывания применяется для изучения деталей строения мембран и межклеточных соединений. Для изготовления сколов клетки замораживают при низкой температуре (-160 °С). При исследовании мембраны плоскость скола проходит через середину бислоя липидов. Далее на внутренние поверхности полученных половинок мембран напыляют металлы (платина, палладий, уран), изучают их с помощью ТЭМ и микрофотографии.

Метод криоэлектронной микроскопии. Быстро замороженный тонкий слой (около 100 нм) образца ткани помещают на микроскопическую решетку и исследуют в вакууме микроскопа при -160 °С.

Метод электронной микроскопии «замораживание - травление» применяют для изучения внешней поверхности мембран клеток. После быстрого замораживания клеток при очень низкой температуре блок раскалывают лезвием ножа. Образующиеся кристаллы льда удаляют путем возгонки воды в вакууме. Затем участки клеток оттеняют, напыляя тонкую пленку тяжелого металла (например, платины). Метод позволяет выявлять трехмерную организацию структур.

Таким образом, методы замораживания - скалывания и замораживания - травления позволяют изучать нефиксированные клетки без образования в них артефактов, вызываемых фиксацией.

Методы контрастирования солями тяжелых металлов позволяют исследовать в электронном микроскопе отдельные макромолекулы - ДНК, крупных белков (например, миозин). При негативном контрастировании изучают агрегаты макромолекул (рибосомы, вирусы) либо белковые филаменты (актиновые нити).

Электронная микроскопия ультратонких срезов, полученных методом криоультрамикротомии. При этом методе кусочки тканей без фиксации и заливки в твердые среды быстро охлаждают в жидком азоте при температуре -196 °С. Это обеспечивает торможение метаболических процессов клеток и переход воды из жидкой фазы в твердую. Далее блоки режут на ультрамикротоме при низкой температуре. Такой метод приготовления срезов обычно используют для определения активности ферментов, а также для проведения

иммунохимических реакций. Для выявления антигенов применяют антитела, связанные с частицами коллоидного золота, локализацию которого легко выявить на препаратах.

Методы сверхвысоковольтной микроскопии. Используют электронные микроскопы с ускоряющим напряжением до 3 000 000 В. Преимущество этих микроскопов в том, что они позволяют исследовать объекты большой толщины (1-10 мкм), так как при высокой энергии электронов они меньше поглощаются объектом. Стереоскопическая съемка позволяет получать информацию о трехмерной организации внутриклеточных структур с высоким разрешением (около 0,5 нм).

2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИКСИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Основным объектом исследования являются гистологические препараты, приготовленные из фиксированных тканей и органов. Препарат может представлять собой мазок (например, мазок крови, костного мозга, слюны, цереброспинальной жидкости и др.), отпечаток (например, селезенки, тимуса, печени), пленку из ткани (например, брюшины, плевры, мягкой оболочки мозга), тонкий срез. Гистологические препараты могут изучаться без специальной обработки, например с применением фазово-контрастного микроскопа. Наиболее часто для световой микроскопии используются срезы ткани или органа с последующей их окраской.

Процесс изготовления гистологического препарата для световой и электронной микроскопии включает следующие основные этапы: 1) взятие материала и его фиксация; 2) уплотнение материала; 3) приготовление срезов; 4) окрашивание или контрастирование срезов. Для световой микроскопии необходим еще один этап - заключение срезов в бальзам или другие

прозрачные среды (5). Фиксация обеспечивает предотвращение процессов разложения, что способствует сохранению целостности структур. Это достигается тем, что взятый из органа маленький образец либо погружают в фиксатор (спирт, формалин, растворы солей тяжелых металлов, осмиевая кислота, специальные фиксирующие смеси), либо подвергают термической обработке. Под действием фиксатора в тканях и органах происходит необратимая коагуляция белков, вследствие которой жизнедеятельность прекращается, а структуры становятся мертвыми, фиксированными.

Уплотнение кусочков, необходимое для приготовления срезов, производится путем обезвоживания спиртами возрастающей концентрации и пропитывания парафином, целлоидином, органическими смолами. Более быстрое уплотнение достигается применением метода замораживания кусочков, например в жидкой углекислоте.

Приготовление срезов производится с помощью специальных приборов - микротомов и замораживающих микротомов, или криостатов (для световой микроскопии) и ультрамикротомов (для электронной микроскопии). Толщина среза для светооптического исследования колеблется от 5 до 20 мкм, а для электронной микроскопии - от 40 до 100 нм. Для сравнения 1 мм равен 1000 мкм и 1 000 000 нм.

Окрашивание срезов (для световой микроскопии) или напыление их солями металлов (для электронной микроскопии) применяют для увеличения контрастности изображения отдельных структур. Методы окраски гистологических структур очень разнообразны и выбираются в зависимости от задач исследования. Гистологические красители подразделяют на кислые, основные и нейтральные. В качестве примера можно привести наиболее известный основной краситель гематоксилин, который окрашивает ядра в фиолетовый цвет, и кислый краситель - эозин, окрашивающий цитоплазму в розово-оранжевый цвет. Избирательное сродство структур к определенным красителям обусловлено их химическим составом и физическими свойствами. Структуры, хорошо окрашивающиеся кислыми красителями, называются оксифильными (ацидофильными, эозинофильными), а окрашивающиеся основными - базофильными. Структуры, воспринимающие как кислые, так и основные красители, являются нейтрофильными (гетерофильными). Существуют структуры клетки, которые окрашиваются в цвет, отличный от цвета используемого красителя. Это явление называется метахромазия. Окрашенные препараты обычно обезвоживают в спиртах возрастающей крепости и просветляют в ксилоле, бензоле, толуоле или некоторых маслах. Для длительного сохранения обезвоженный гистологический срез заключают между предметным и покровным стеклами в канадский бальзам или другие вещества. Готовый гистологический

препарат может быть использован для изучения под микроскопом в течение многих лет. Для электронной микроскопии срезы, полученные с помощью ультрамикротомы, помещают на специальные сетки, контрастируют солями свинца, кобальта, после чего просматривают в микроскопе и фотографируют. Полученные микрофотографии служат объектом изучения наряду с гистологическими препаратами.

2.3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Изучение живых клеток и тканей позволяет получить наиболее полную информацию об их жизнедеятельности - проследить движение, процессы деления, разрушения, роста, дифференцировки и взаимодействия клеток, продолжительность их жизненного цикла, реактивные изменения в ответ на действие различных факторов.

Прижизненные исследования клеток в организме (*in vivo*). Одним из прижизненных методов исследования является наблюдение структур в живом организме. С помощью специальных просвечивающих микроскопов-иллюминаторов, например, можно изучать в динамике циркуляцию крови в микрососудах. После проведения анестезии у животного объект исследования (например, брыжейка кишки) выводят наружу и рассматривают с помощью микроскопа, при этом ткани должны постоянно увлажняться изотоническим раствором натрия хлорида. Однако длительность такого наблюдения ограничена. Лучшие результаты дает метод вживления прозрачных камер в организм животного.

Наиболее удобным органом для вживления таких камер и последующего наблюдения является ухо какого-либо животного (например, кролика). Участок уха с прозрачной камерой помещают на предметный столик микроскопа и в этих условиях изучают динамику изменения клеток и тканей в течение продолжительного времени. Так могут изучаться процессы выселения лейкоцитов из кровеносных сосудов, различные стадии образования соединительной ткани, капилляров, нервов и другие процессы. В качестве естественной прозрачной камеры можно использовать глаз экспериментальных животных. Клетки, ткани или образцы органов помещают в жидкость передней камеры глаза в угол, образованный роговицей и радужкой, и наблюдение ведут через прозрачную роговицу. Таким образом была проведена трансплантация оплодотворенной яйцеклетки и прослежены ранние стадии развития зародыша. Обезьянам были пересажены небольшие кусочки матки и изучены изменения ее слизистой оболочки в различные фазы менструального цикла.

Широкое применение нашел метод трансплантации клеток крови и костного мозга от здоровых животных-доноров животным-реципиентам, подвергнутым смертельному облучению. Животные-реципиенты после трансплантации оставались живыми вследствие приживания донорских клеток, образующих в селезенке колонии кроветворных клеток. Исследование числа колоний и их клеточного состава позволяет выявлять количество родоначальных кроветворных клеток и различные стадии их дифференцировки. С помощью метода колониеобразования установлены источники развития всех клеток крови.

Витальное и суправитальное окрашивание. При витальном (прижизненном) окрашивании клеток и тканей краситель вводят в организм животного, при этом он избирательно окрашивает определенные клетки, их органеллы или межклеточное вещество. Например, с помощью трипанового синего или литиевого кармина выявляют фагоциты, а с помощью ализарина - новообразованный матрикс кости.

Суправитальным окрашиванием называют окрашивание живых клеток, выделенных из организма. Таким способом выявляют молодые формы эритроцитов - ретикулоциты крови (краситель бриллиантовый крезиловый голубой), митохондрии в клетках (краситель зеленый янус), лизосомы (краситель нейтральный красный).

Исследования живых клеток и тканей в культуре (*in vitro*). Этот метод является одним из самых распространенных. Выделенные из организма человека или животных клетки, маленькие образцы тканей или органов помещают в стеклянные или пластмассовые сосуды, содержащие специальную питательную среду - плазму крови, эмбриональный экстракт, а также искусственные среды.

Различают суспензионные культуры (клетки взвешены в среде), тканевые, органные и монослойные культуры (эксплантированные клетки образуют на стекле сплошной слой).

Обеспечиваются стерильность среды и температура, соответствующая температуре тела. В этих условиях клетки в течение длительного времени сохраняют основные показатели жизнедеятельности - способность к росту, размножению, дифференцировке, движению. Такие культуры могут существовать многие дни, месяцы и даже годы, если обновлять среду культивирования и пересаживать жизнеспособные клетки в другие сосуды. Некоторые виды клеток благодаря изменениям в их геноме могут сохраняться и размножаться в культуре, образуя непрерывные клеточные линии. В разработку методов культивирования клеток и тканей большой вклад внесли А. А. Максимов, А. В. Румянцев, Н. Г. Хлопин, А. Д. Тимофеевский, Ф. М. Лазаренко. В настоящее время получены клеточные линии фибробластов, миоцитов, эпителиоцитов, макрофагов, которые существуют многие годы.

Использование метода культивирования позволило выявить ряд закономерностей дифференцировки, злокачественного перерождения клеток, взаимодействий клеток с вирусами и микробами. Особую значимость метод культивирования тканей имеет для проведения экспериментальных наблюдений. Взятые из организма человека клетки при пункции или биопсии могут в культуре тканей использоваться для определения пола, наследственных заболеваний, злокачественного перерождения, выявления действия ряда токсичных веществ.

Клеточные культуры широко применяются для гибридизации клеток.

Разработаны методы разделения тканей на клетки, выделение отдельных типов клеток и их культивирования. Вначале ткань превращают в суспензию клеток путем разрушения межклеточных контактов и внеклеточного матрикса с помощью протеолитических ферментов (трипсин, коллагеназа) и соединений, связывающих Ca^{2+} (с помощью ЭДТА - этилендиаминтетраацетата). Далее полученную суспензию разделяют на фракции клеток различных типов с помощью центрифугирования, позволяющего отделить более тяжелые клетки от легких, большие от малых, или путем прилипания клеток к стеклу или пластмассе, способность к которому у различных типов клеток неодинакова. Для обеспечения специфического прилипания клеток к поверхности стекла используют антитела, специфически связывающиеся с клетками одного типа. Прилипшие клетки затем отделяют, разрушая

матрикс ферментами, при этом получают взвесь однородных клеток. Более тонким методом разделения клеток является мечение антителами, связанными с флюоресцирующими красителями. Меченые клетки отделяются от немеченых с помощью сортера (электронного флюоресцентно-активируемого клеточного анализатора). Клеточный анализатор сортирует в 1 секунду около 5000 клеток. Выделенные клетки можно изучать в условиях культивирования.

Метод культивирования клеток позволяет изучать их жизнедеятельность, размножение, дифференцировку, взаимодействие с другими клетками и др.

Культуры обычно готовят из суспензии клеток, полученной вышеописанным методом диссоциации ткани. Большинство клеток не способны расти в суспензии, им необходима твердая поверхность, в качестве которой используют поверхность пластиковой культуральной чашки, иногда с компонентами внеклеточного матрикса, например коллагена. Первичными культурами называют культуры, приготовленные непосредственно после первого этапа фракционирования клеток, вторичными - культуры клеток, пересаженные из первичных культур в новую среду. Можно последовательно перевивать клетки в течение недель и месяцев, при этом клетки сохраняют характерные для них гистогенетические признаки (например, клетки эпителия образуют пласты). Исходным материалом для клеточных культур обычно служат эмбриональные ткани и ткани новорожденных.

В качестве питательных сред используют смеси солей, аминокислот, витаминов, сыворотки крови, экстракт куриных эмбрионов, эмбриональную сыворотку и др. В настоящее время разработаны специальные среды для культивирования различных типов клеток. Они содержат один или несколько белковых факторов роста, необходимых клеткам для жизнедеятельности и размножения. Например, для роста нервных клеток необходим фактор роста нервов.

У большинства клеток в культуре наблюдается определенное число делений (50-100), а затем они погибают. Иногда в культуре появляются мутантные клетки, которые размножаются бесконечно и образуют клеточную линию (фибробла-сты, эпителиоциты, миобласты и др.). Мутантные клетки отличаются от раковых клеток, также способных к непрерывному делению,

но клетки растут без прикрепления к твердой поверхности. Раковые клетки в культуральных чашках образуют более плотную популяцию, чем популяции обычных клеток. Аналогичное свойство можно вызвать экспериментально у нормальных клеток путем трансформации их опухолеродными вирусами или химическими соединениями, при этом образуются неопластически трансформированные клеточные линии. Клеточные линии нетрансформированных и трансформированных клеток можно длительно сохранять при низких температурах (-70 °С). Генетическую однородность клеток усиливают клонированием, когда из одной клетки при ее последовательном делении получают большую колонию однородных клеток. Клон - это популяция клеток, происходящих из одной клетки-предшественника.

Клеточные гибриды. При слиянии двух клеток различных типов образуется гетерокарион - клетка с двумя ядрами. Для получения гетерокариона суспензию клеток обрабатывают полиэтиленгликолем или инактивированными вирусами для повреждения плазмолемм клеток, после чего клетки способны к слиянию. Например, неактивное ядро эритроцита курицы становится активным (синтез РНК, репликация ДНК) при слиянии клеток и переносе в цитоплазму другой клетки, растущей в культуре ткани. Гетерокарион способен к митозу, в результате чего образуется гибридная

клетка. Оболочки ядер у гетерокариона разрушаются, и их хромосомы объединяются в одном большом ядре.

Клонирование гибридных клеток приводит к образованию гибридных клеточных линий, которые используются для изучения генома. Например, в гибридной клеточной линии «мышь-человек» установлена роль хромосомы 11 человека в синтезе инсулина.

Гибридомы. Клеточные линии гибридом используют для получения моно-клональных антител. Антитела вырабатываются плазмочитами, которые образуются из В-лимфоцитов при иммунизации. Определенный вид антител получают при иммунизации мышей конкретными антигенами. Если клонировать такие иммунизированные лимфоциты, то можно получить большое количество однородных антител. Однако время жизни В-лимфоцитов в культуре ограничено. Поэтому производят их слияние с «бессмертными» опухолевыми клетками (В-лимфомы). В результате образуются гибридомы (гибрид-клетка с геномом от двух разных клеток; ома - окончание в названиях опухолей). Такие гибридомы способны размножаться длительно в культуре и синтезировать антитела определенного вида. Каждый клон гибридомы является источником моноклональных антител. Все молекулы антител данного вида обладают одинаковой специфичностью связывания антигенов. Можно получать моноклональные антитела против любого белка, содержащегося в клетке, и использовать их для установления локализации белков в клетке, а также для выделения белка из смеси (очистка белков), что позволяет исследовать структуру и функцию белков. Моноклональные антитела применяют также в технологии клонирования генов.

Антитела можно использовать для изучения функции различных молекул, вводя их через плазмолемму непосредственно в цитоплазму клеток тонкой стеклянной пипеткой. Например, введение антител к миозину в цитоплазму оплодотворенной яйцеклетки морского ежа останавливает деление цитоплазмы.

Технология рекомбинантных ДНК. Классические генетические методы позволяют изучать функцию генов, анализируя фенотипы мутантных организмов и их потомства. Технология рекомбинантных ДНК дополняет эти методы, позволяет проводить детальный химический анализ генетического материала и получать в больших количествах клеточные белки.

Методы гибридизации широко используют в современной биологии для изучения структуры генов и их экспрессии.

2.4 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Для изучения химического состава биологических структур - локализации веществ, их концентрации и динамики в процессах метаболизма применяют специальные методы исследования.

Цито- и гистохимические методы. Эти методы позволяют выявлять локализацию различных химических веществ в структурах клеток, тканей и орга-

нов - ДНК, РНК, белков, углеводов, липидов, аминокислот, минеральных веществ, витаминов, активность ферментов. Эти методы основаны на специфичности реакции между химическим реактивом и субстратом, входящим в состав клеточных и тканевых структур, и окрашивании продуктов химических реакций. Для контроля специфичности реакции часто применяют соответствующие ферменты. Например, для выявления в клетках рибонуклеиновой кислоты (РНК) часто используют галлоцианин - краситель с основными свойствами, а наличие РНК подтверждают контрольной обработкой рибонуклеазой, расщепляющей РНК. Галлоцианин окрашивает РНК в сине-фиолетовый цвет. Если срез предварительно обработать рибонуклеазой, а затем окрасить галлоцианином, то отсутствие окрашивания подтверждает наличие в структуре рибонуклеиновой кислоты. Описание многочисленных цито- и гистохимических методов дается в специальных руководствах.

Сочетание гистохимических методов с методом электронной микроскопии привело к развитию нового перспективного направления - электронной гистохимии. Этот метод позволяет изучать локализацию различных химических веществ не только на клеточном, но и на субклеточном и молекулярном уровнях. Для изучения макромолекул клеток используют очень чувствительные методы с применением радиоактивных изотопов и антител, позволяющие обнаружить даже небольшое содержание молекул (менее 1000).

Радиоактивные изотопы при распаде ядра испускают заряженные частицы (электроны) или излучение (например, гамма-лучи), которые можно зарегистрировать специальными приборами. Радиоактивные изотопы используют в методе радиоавтографии. Например, с помощью радиоизотопов ³H-тимидина исследуют ДНК ядра, с помощью ³H-уридина - РНК.

Метод радиоавтографии. Этот метод дает возможность наиболее полно изучить обмен веществ в разных структурах. В основе метода лежит использование радиоактивных элементов (например, фосфора ³²P, углерода ¹⁴C, серы ³⁵S, водорода ³H) или меченных ими соединений. Радиоактивные вещества в гистологических срезах обнаруживают с помощью фотоэмульсии, которую наносят на препарат и затем проявляют. В участках препарата, где фотоэмульсия соприкасается с радиоактивным веществом, происходит фотореакция, в результате которой образуются засвеченные участки (треки). Этим методом можно определять, например, скорость включения меченых аминокислот в белки, образование нуклеиновых кислот, обмен йода в клетках щитовидной железы и др.

Методы иммунофлюоресцентного и иммуноцитохимического анализа. Применение антител. Антитела - защитные белки, вырабатываемые плазм-клетками (производными В-лимфоцитов) в ответ на действие чужеродных веществ (антигенов). Количество различных форм антител достигает миллиона. Каждое антитело имеет участки для «узнавания» молекул, вызвавших синтез этого антитела. В связи с высокой специфичностью антител в отношении антигенов они могут быть использованы для выявления любых белков клетки. Метод основан на реакциях антиген-антитело. Каждая клетка организма имеет специфический антигенный состав, который глав-

ным образом определяется белками. Для усиления специфичности реакции применяют моноклональные антитела, образуемые линией клеток, - клонами (одна линия - один клон), полученной методом гибридизации из одной клетки. Метод гибридом позволяет получать моноклональные антитела с одинаковой специфичностью и в неограниченных количествах. Антитела можно использовать для изучения антигенов как на световом, так и на ультраструктурном уровнях с помощью электронного микроскопа. В клинической диагностике широкое применение получили методы иммуногистохимии на парафиновых срезах. Предложено большое количество молекулярных маркеров и методов обнаружения белков промежуточных филаментов, пролиферативных, дифференцировочных и апоптозных белков в клетках. Для стандартизации обработки препаратов используется иммуностейнер - устройство, с помощью которого все операции проводятся без вмешательства со стороны исследователя.

Методы иммунофлюоресцентного и иммуногистохимического анализов широко и эффективно используются в научных исследованиях и в лабораторной диагностике. Продукты реакции можно окрашивать флюоресцирующими красителями и выявлять в люминесцентном микроскопе или использовать специальные наборы реактивов, которые окрашивают

исследуемые белки, и анализировать препараты с помощью светового микроскопа. Эти методы применяются для изучения процессов дифференцировки клеток, выявления в них специфических химических соединений и структур. Методы позволяют с высокой точностью охарактеризовать функциональное состояние клеток, выявить гистогенетическую принадлежность и трансформацию клетки при онкологических заболеваниях.

Фракционирование клеточного содержимого. Фракционировать структуры и макромолекулы клеток можно различными методами - ультрацентрифугированием, хроматографией, электрофорезом. Подробнее эти методы описаны в учебниках биохимии.

Ультрацентрифугирование. С помощью этого метода клетки можно разделить на органеллы и макромолекулы. Вначале разрушают клетки осмотическим шоком, ультразвуком или механическим воздействием. При этом мембраны (плазмолемма, эндоплазматическая сеть) распадаются на фрагменты, из которых формируются мельчайшие пузырьки, а ядра и органеллы (митохондрии, комплекс Гольджи, лизосомы и пероксисомы) сохраняются интактными и находятся в образующей суспензии.

Для разделения вышеуказанных компонентов клетки применяют высокоскоростную центрифугу (80 000-150 000 об./мин). Вначале оседают (седи-ментируются) на дне пробирки более крупные части (ядра, цитоскелет). При дальнейшем увеличении скоростей центрифугирования надосадочных фракций последовательно оседают более мелкие частицы - сначала митохондрии, лизосомы и пероксисомы, затем микросомы и мельчайшие пузырьки и, наконец, рибосомы и крупные макромолекулы. При центрифугировании различные фракции оседают с различной скоростью, образуя в пробирке отдельные полосы, которые можно выделить и исследовать. Фракционированные клеточные экстракты (бесклеточные системы) широко-

используют для изучения внутриклеточных процессов, например для изучения биосинтеза белка, расшифровки генетического кода и др.

Хроматография широко используется для фракционирования белков.

Электрофорез позволяет разделить белковые молекулы с различным зарядом при помещении их водных растворов (или в твердом пористом матрикс-се) в электрическом поле.

Методы хроматографии и электрофореза применяют для анализа пептидов, получаемых при расщеплении белковой молекулы, и получения так называемых пептидных карт белков. Подробно эти методы описаны в учебниках биохимии.

Изучение химического состава живых клеток. Для изучения распределения веществ и их метаболизма в живых клетках используют методы ядерного магнитного резонанса и микроэлектродную технику.

Ядерный магнитный резонанс позволяет изучать малые молекулы низкомолекулярных веществ. Образец ткани содержит атомы, которые характеризуются способностью поглощать энергию на различных резонансных частотах. Диаграмма поглощения на резонансных частотах для данного образца составит его спектр ЯМР. В биологии сигнал ЯМР от протонов (ядер водорода) широко используется для изучения белков, нуклеиновых кислот и др. Для изучения макромолекул внутри живой клетки часто применяют изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P для получения сигнала ЯМР и слежения за его изменением в процессе жизнедеятельности клетки. Так, изотоп фосфора используется для изучения мышечного сокращения - изменений содержания в тканях АТФ и неорганического фосфата. Изотоп углерода позволяет с помощью ЯМР исследовать многие процессы, в которых участвует глюкоза. Использование ЯМР ограничено его низкой чувствительностью: в 1 г живой ткани должно содержаться не менее 0,2 ммоль исследуемого вещества. Преимуществом метода является его безвредность для живых клеток.

Микроэлектродная техника. Микроэлектроды представляют собой стеклянные трубочки, заполненные электропроводящим раствором (обычно раствор KCl в воде), диаметр конца которых измеряется долями микрометра. Кончик такой трубочки можно вводить в цитоплазму клетки через плазмолемму и определять концентрацию ионов H^+ , Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , разность потенциалов на плазмолемме, а также производить инъекцию молекул в клетку. Для определения концентрации конкретного иона используют ионселективные электроды, которые заполняют ионообменной смолой, проницаемой только для данного иона. Микроэлектродную технику применяют для изучения транспорта ионов через специальные ионные каналы

(специализированные белковые каналы) в плазмолемме. При этом используют микроэлектрод, который плотно прижимают к соответствующему участку плазмолеммы. Этот метод позволяет исследовать функцию одиночной белковой молекулы. Изменение концентрации ионов внутри клетки можно определить с помощью люминесцирующих индикаторов. Например, для изучения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} используют люминесцентный белок акварин (выделен из медузы), который излучает свет в присутствии ионов Ca^{2+} и реагирует на изменение концентрации последнего в пределах 0,5-10 мкмоль. Синтезированы также флуоресцентные индикаторы, прочно связывающиеся с Ca^{2+} . Создание различных новых типов внутриклеточных индикаторов и современных способов анализа изображений позволяет точно и быстро определять внутриклеточную концентрацию многих низкомолекулярных веществ.

2.5. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ

В настоящее время наряду с качественными методами разработаны и применяются количественные гистохимические методы определения содержания различных веществ в клетках и тканях. Особенность количественных гистохимических (в отличие от биохимических) методов исследования заключается в возможности изучения концентрации химических компонентов в конкретных структурах клеток и тканей.

Цитоспектрофотометрия - метод изучения химического состава клетки, основанный на избирательном поглощении теми или иными веществами лучей с определенной длиной волны. По интенсивности поглощения монохроматического света, которая зависит от концентрации вещества, производится определение его содержания в клетке. Так, например, определяется содержание ДНК в ядре, РНК и суммарного белка в цитоплазме и др.

Цитоспектрофлуориметрия - метод количественного изучения внутриклеточных веществ по спектрам их флуоресценции или по интенсивности флуоресценции при облучении препарата заранее выбранной длиной световой волны (цитофлуориметрия). При этом используются флуорохромы, количественно связывающиеся с веществами клетки (ДНК, РНК, белками и др.).

Современные микроскопы - цитофлуориметры позволяют обнаружить в различных структурах малые количества вещества (до 10⁻¹⁴-10⁻¹⁶ г) и оценить локализацию исследуемых веществ в микроструктурах.

Интерферометрия. Этот метод позволяет оценить сухую массу и концентрацию плотных веществ в живой и фиксированной клетках. С помощью этого метода, например, можно установить суммарное содержание белков в живых и фиксированных клетках.

2.6. МЕТОДЫ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ И ТКАНЕВЫХ СТРУКТУР

Полученные изображения микрообъектов в микроскопе, на экране дисплея, на электронных микрофотографиях могут подвергаться специальному анализу - выявлению морфометрических, денситометрических параметров и их статистической обработке. Морфометрические методы позволяют определять с помощью специальных сеток (Е. Вейбеля, А. А. Глаголева, С. Б. Стефанова) число любых структур, площади их сечений, диаметры и др. В частности в клетках могут быть измерены площади ядер, цитоплазмы, их диаметры, ядерно-цитоплазматические отношения и др. Существуют ручная морфометрия и автоматизированная морфометрия, при которой все параметры измеряются и регистрируются в приборе автоматически.

Все большее распространение получают автоматизированные системы обработки изображений (АСОИЗ), позволяющие наиболее эффективно реализовать перечисленные выше количественные методы для изучения клеток и тканей. При этом аналитические возможности количественной микроскопии дополняются методами анализа и распознавания образцов, основан-

ными на обработке с помощью электронно-вычислительных машин (ЭВМ) информации, извлекаемой из изображений клеток и тканей. По существу можно говорить об устройствах, не только усиливающих оптические возможности зрительного анализатора человека, но и многократно расширяющих его аналитические возможности. Это позволяет получать новую информацию о не выявляемых ранее процессах, моделировать и прогнозировать их развитие в клетках и тканях.

Вместе с тем участие в эксперименте ЭВМ требует от исследователя нового подхода к его проведению, владения навыками составления алгоритмов процесса исследования, точности рассуждений и в конечном итоге повышения научно-методического уровня исследования.

Таким образом, применение новых методов исследований в гистологии, цитологии и эмбриологии позволяет выявить общие закономерности организации тканей и клеток, структурные основы биохимических процессов, определяющих функцию конкретных структурных компонентов клетки.

Вопросы для самоконтроля

1. Изучение тканей и их метаболизма.
2. Подготовка гистосрезов.
3. Исследование фиксированных тканей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Лекция №5
Доклинические исследования:
Виды исследования, методология и порядок проведения.

Новые антигельминтики испытывают, выявляя их терапевтические дозы. Изучают влияние этих, а также повышенных и токсических доз. Одновременно проводят клинические, патологоанатомические, гистологические исследования на зараженных и свободных от инвазии животных. Кроме того, биохимическими анализами выявляют безвредность продукции (мяса, молока), полученной от животных, подвергавшихся лечению новыми антигельминтиками.

При этом необходимо соблюдать следующие условия:

а) проверку эффективности антигельминтика проводят в период подъема или в разгар инвазии, против которой предложен препарат;

б) в опыт по испытанию нового антигельминтика включают спонтанно и экспериментально зараженных лошадей и крупный рогатый скот (20 гол.), овец и свиней (30 гол.), птиц (100 гол.), из числа которых для контроля выделяют 30%, но не менее 10 животных;

в) животных в подопытные и контрольные группы подбирают на основании показателей трехкратного гельминтокопрологического (ларвоскопического) обследования и клинического осмотра (принцип аналогов). Слабоинвазированных животных, у которых в пробах фекалий обнаруживают единичные экземпляры яиц или личинок, в опыт не включают;

г) после введения антигельминтика животных обеих групп выдерживать под наблюдением в течение 6-10, дней в зависимости от инвазии (при тканевых гельминтозах срок удлиняется). В тех случаях, когда после дачи препарата можно учесть отхождение гельминтов, сбор их производить в течение 3-4- дней;

д) терапевтическую эффективность испытываемого антигельминтика устанавливать после убоя и гельминтологического вскрытия подопытных и контрольных животных с обязательным подсчетом гельминтов отдельно от каждого животного.

Весьма желательно проводить изучение основных токсикологических и фармакологических вопросов, таких, как острая токсичность новых препаратов с определением параметров их токсичности (опыты проводить на лабораторных животных); кумуляция и привыкание (длительные опыты на лабораторных животных); влияние их на потомство - тератогенное, мутогенное, сперматогенез для веществ с длительным курсом применения (опыты на лабораторных животных); всасывание, выделение из организма и распределение, новых антигельминтиков в организме (на лабораторных и сельскохозяйственных животных); влияние новых антигельминтиков на основные системы организма - центральную нервную систему, сердечно-сосудистую и желудочно-кишечный тракт, а также выяснение аллергической природы побочных явлений, вызываемых новыми антигельминтиками (на лабораторных и сельскохозяйственных животных).

Методы изучения новых моллюскоцидов и учета их эффективности.

Изыскание новых моллюскоцидов проводят в три последовательных этапа, представляющих части единого, процесса: отбор и испытание моллюскоцидов в лабораторных, полевых и производственных условиях.

На первом этапе отбора химических веществ используют стандартизованную методику. Водных и земноводных моллюсков в количестве 10-20 экз. погружают в раствор испытуемого вещества на сутки с концентрацией от 1:1000 до 1:1000000. Эту серию испытаний проводят в химических стаканах.

Все опыты проводят в сравнении с моллюскоцидами медным купоросом и пентахлорфенолятом натрия, а также контролем, где моллюски находятся без воздействия химического вещества. Жизнеспособность устанавливают путем механического раздражения. Моллюски считаются погибшими, если они не реагируют на укол и имеют признаки разложения,

На втором этапе эксперименты проводят с веществами, убивающими моллюсков, в небольших естественных водных биотопах (стоячих, проточных и заболоченных). Работу

проводят с учетом размеров биотопа, популяции моллюсков, растительности и животных компонентов, содержания минеральных солей, рН, температуры, метеорологических условий, жесткости воды, органических веществ, солнечного света и влияния этих факторов на эффективность моллюскоцидов.

Углубленно изучают действие моллюскоцидов на различные виды моллюсков, флору и фауну. Губительность моллюскоцидов определяют по большему количеству моллюсков в опыте, на молодых моллюсках и их яйцах.

Определение токсичности моллюскоцидов для теплокровных проводят на морских свинках, кроликах, кошках, собаках, козах, телятах. ЛД₅₀ устанавливают на белых крысах.

На третьем этапе испытание моллюскоцидов в условиях производства проводят в соответствии с планом борьбы с гельминтозами в различных зонах. На данном этапе разрабатывают спецификации и технические условия для выпуска моллюскоцида промышленностью и методы их обнаружения в очень малых концентрациях.

Для разработки теоретической основы дезинвазии проводят изучение структуры и физико-химических свойств оболочек яиц гельминтов. При этом применяют (в сравнении) современные методы _светооптической микроскопии (люминесцентной, фазо-контрастной, микроскопия в темном поле и обычной). Исследования микрообъектов проводят с помощью микроманипулятора.

Разработку химического способа дезинвазии синтезом новых химических веществ осуществляют научные сотрудники-химики Центрального научно-исследовательского дезинфекционного института (ЦНИДИ) по методикам, апробированным в этом институте.

Методика отбора овоцидов включает три серии опытов: первая - на отмытых яйцах аскаридий, вторая - на яйцах в помете на дощечках, третья - на яйцах, находящиеся в естественной среде (в помещениях, в почве).

Потенциальные химические вещества - овоциды определяют на токсичность, а также на коррозионные свойства на различных металлических объектах.

Выделение яиц из помета проводят стандартизированным методом Фюллеборна, а из почвы по методике Н.А.Романенко (1967). Последний метод более простой, дешевый и ускоряет процесс выделения яиц из почвы в 2,5 раза по сравнению с методом З.Г.Васильковой и В.А.Гефтер (1948).

Жизнеспособность яиц определяют методами вторичной люминесцентной и обычной микроскопией, культивированием в термостате и в отдельных случаях постановкой биопробы.

Вопросы для самоконтроля

1. Оценка эффективности антгельминтиков.
2. Оценка эффективности моллюскоцидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Лекция №6

Клинические исследования:

Виды исследования, методология и порядок проведения.

Изучение развития гельминта в промежуточных звеньях после лабораторных исследований проводят в природных условиях, что необходимо для разработки профилактических мероприятий в борьбе с тем или иным паразитом.

Жизнь гельминта в организме дефинитивного хозяина по возможности изучают в его развитии, что помогает раскрыть динамику морфологических изменений гельминта, реакцию хозяина, а иногда открыть и новые пути в развитии паразита.

За последние годы в биологии гельминтов особое значение приобретает резервуарный паразитизм, поэтому изучение фауны беспозвоночных в микроочагах гельминтозов необходимо. Резервуарный паразитизм играет очень большую роль в эпизоотологии некоторых гельминтозов (случаи аскаридоза и гетеракидоза при наличии дождевых червей).

Новым звеном в изучении биологии гельминтов должно быть изучение экологии промежуточных, дополнительных хозяев. Из литературных данных известно, что экология моллюсков, непременных промежуточных хозяев трематод, почти не изучена, а без этого некоторые эпизоотологические моменты ускользают от исследователя.

Изучение биологических методов борьбы с гельминтами.

Работу начинают с отыскания естественных врагов гельминтов. По отношению к личиночным - стадиям (в природе) ими могут быть различные беспозвоночные (реже позвоночные) и хищные грибы, в организме дефинитивных хозяев врагов или антагонистов гельминтов следует искать среди микробов, протозоев, вирусов и хищных грибов, угнетающих наиболее патогенных паразитов. При этом необходимо изучать экологию, характер питания таких организмов, их взаимоотношения с гельминтами. Так же изучались взаимоотношения хетогастеров и моллюсков - промежуточных хозяев гельминтов, степень уничтожения личинок трематод олигохетами.

В организме дефинитивных хозяев исследуют взаимоотношения аскаридий и кокцидий, аскаридий и капиллярий, аскаридий и различных видов и штаммов микробов. У овец и свиней - взаимоотношения гельминтов при смешанных инвазиях.

Естественными врагами фитонематод являются в основном хищные грибы.

Вопросы для самоконтроля

1. Оценка эффективности антгельминтиков.
2. Оценка эффективности моллюскоцидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Лекция №7

Гельминтологические методы исследования. Алгоритм определения яиц гельминтов.

Сбор, консервирование и пересылка фекалий

Чаще всего при лабораторной диагностике гельминтозов приходится иметь дело с фекалиями, так как яйца и личинки наиболее распространенных гельминтов выделяются во внешнюю среду с фекалиями животных.

Пробы фекалий весом 10-20 г лучше всего брать из прямой кишки (рукой в резиновой перчатке), но можно и свежевыделенные, при этом снимают верхнюю часть фекальной кучи, не соприкасавшуюся с полом или почвой.

Необходимо обследовать 10 процентов поголовья, но с одной отары берут не менее 20-30 проб.

Пробы фекалий для отправки в лабораторию необходимо заворачивать в пергаментную бумагу, а если жидкие, то в стеклянной баночке или в целлофане на которых пишут номер пробы.

Исследовать фекалии необходимо как можно быстрее, так как через 16-18 часов из яиц многих нематод вылупляются личинки, которые в дальнейшем затрудняют исследования. При возникновении необходимости сохранения фекалий, существует несколько способов консервации:

1. 4-10 % раствор формалина; для прекращения развития яиц анкилостоматид раствор необходимо подогреть до $50-60\pm C$.

2. 0,2 % раствор азотнокислого натрия-1900мл, раствор Люголя-250мл, формалин-300мл, глицерин 25 мл (А.И.Шуренкова, 1960) Яйца гельминтов сохраняются в этом растворе до 8 мес.

3. 1-1,5% растворы детергентов "Лотос", "Экстра", "Тайд", "Барф" и др. яйца гельминтов сохраняются до года (А.А.Красильников, 1970). Консерванты смешивают с фекалиями в равных объемах.

При пересылке препаратов на предметных стеклах, покровное стекло окантовывают воском, парафином, лаком или клеем.

При пересылке и хранении самих гельминтов крупных нематод заливают жидкостью Барбагалло (3 мл формалина, 0,85 г поваренной соли, 100 мл дистиллированной воды), мелких цестод и трематод фиксируют в 70% спирте.

Лабораторное оборудование

Для гельминтокопрологических исследований необходимо иметь: чашки Петри, колбы, мензурки, химические или обычные стаканы, предметные стекла (обычные и большого размера 5x8 см) маленькие стеклянные стаканчики диаметром по верху 4-5 см и объемом 50 мл, металлические ситечки с ячейками 0,25-0,3 мм, стеклянные палочки, препаровальные иглы, маленькие пробирки, резиновый шланг Д 5-8 мм, стеклянные воронки с диаметром по верху 8-10 см (для аппарата Бермана), зажим Мора, часовые стекла, штативы, тазы, ванночки, кюветы, пинцеты, тонкую медную проволоку для изготовления петель, ручные лупы, покровные стекла, марля, микроскоп, желательное с осветителем.

Изготовление флотационных растворов

1. Насыщенный раствор поваренной соли: В 1 литре кипящей воды растворяют 400 г поваренной соли, охлаждают, фильтруют. Выпадение осадка кристаллов соли свидетельствует о насыщенности раствора. Удельный вес -1,18. Хранение не ограничено.

2. Насыщенный раствор аммиачной гравнулированной селитры: В 1 литре кипящей воды растворяют 1,5 кг селитры, охлаждают, фильтруют. Удельный вес -1,32 при $t +18\pm C$.

3. Насыщенный раствор натрия тиосульфата- натриевую соль серноватистой кислоты ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$). Раствор готовят из расчета 1750г технического натрия тиосульфата на 1 л кипящей воды. Удельный вес -1,4.

4. Насыщенный раствор гипосульфита натрия: В 1л горячей воды растворяют 1750 г гипосульфита натрия, охлаждают, фильтруют. Удельный вес такого раствора 1,4-1,41.

5. Насыщенный раствор сернокислого магния: В 1 литре горячей воды растворяют 920г сернокислого магния. Раствор фильтруют и охлаждают.

6. Насыщенный раствор сернокислого цинка: В 1 литре горячей воды растворяют 400г сернокислого цинка, охлаждают, фильтруют. Удельный вес 1,24.
7. Раствор глицерина 50%.

Методы исследования фекалий

Нативный мазок: Это самый простой метод обнаружения гельминтов. Берут небольшой кусочек фекалий 1-2 (величиной с горошину) и растирают на предметном стекле в 1-2 каплях 50% раствора глицерина. После удаления твердых частиц, исследуют под микроскопом (метод прост, но не точен) От одного животного необходимо исследовать 2-3 мазка и выявляются, как правило, только интенсивные инвазии. Этим методом можно исследовать фекалии на фасциолез, аскаридоз, трихоцефалез, стронгилидозы и другие гельминтозы.

Метод закручивания (Е.С. Шульман, 1938)

Этот метод наиболее эффективен для выявления личинок *Strongyloides*. К 2-3 г фекалий добавляют 2-3 кратный объем воды и размешивают стеклянной палочкой, которую после кругообразного вращения быстро вынимают, оставшуюся на конце каплю взвеси помещают на предметное стекло и рассматривают под микроскопом (метод основан на принципе обогащения капли яйцами, которые концентрируются на конце палочки). Метод также не очень точен.

Флотационные методы диагностики

Основаны на принципе всплывания (флотации) яиц гельминтов в жидкостях с высокой плотностью и дальнейшем микрокопировании поверхностного слоя в котором они концентрируются.

Метод Фюллеборна - наиболее распространенный флотационный способ диагностики цестодозов и нематодозов.

В стаканчик или баночку помещают 5-10 г фекалий и добавляют 20 кратное количество насыщенного раствора поваренной соли, размешивают пинцетом или стеклянной палочкой, затем фильтруют через металлическое ситечко или марлю и отстаивают в течение 40-60 минут. Яйца всплывают. Поверхностную пленку берут металлической петлей (согнутой под углом 90 град. и диаметром 0,8 см) переносят на предметное стекло и микрокопируют. Лучше исследовать 3 капли.

Тяжелые яйца трематод, некоторых цестод и неоплодотворенные яйца аскарид всплывают плохо и поэтому нужно исследовать препараты приготовленные из осадка. Для этого жидкость сливают и со дна берут проволочной петлей или пипеткой несколько капель на предметное стекло и исследуют под микроскопом.

Стандартизированный метод Фюллеборна

Техника такая же как и при обычном методе Фюллеборна, но здесь подсчитывают количество яиц приходящихся в среднем на одну из 3 исследованных на предметном стекле капель, или общее количество яиц во всех 3 каплях до и после дегельминтизации.

Необходимо соблюдать следующие условия исследований:

1. Одинаковый вес проб фекалий.
2. Равный объем стаканчиков и одинаковая продолжительность отстаивания взвесей.
3. Одинаковый диаметр проволочных петель и равное количество снятых для исследования пленок.

Для получения более точных результатов рекомендуется

Метод Котельникова А.Г. и Хренова В.М. (1981)

Применяется для диагностики цестодозов и нематодозов. Для этого в стаканчик или баночку помещают 5-10 г фекалий и заливают 20 кратным количеством аммиачной селитры (гранулированной или обычной, нитрата аммония).

Техника выполнения как у предыдущего метода, но отстаиваем в течении 15-20 минут, затем берем поверхностную пленку для микрокопирования.

Метод Болотова М.П. (1957)

Применяется для диагностики цестодозов и нематодозов. В качестве флотационной жидкости применяется раствор гипосульфита натрия в сочетании его с поваренной солью.

Техника выполнения и сроки отстаивания, как у предыдущего метода.

Метод Дарлинга

В стаканчик или баночку помещают 3-5 г фекалий, добавляем воду до получения полужидкой консистенции, процеживают в центрифужные пробирки и центрифугируют 2-3 мин. Затем жидкость из пробирки сливают, а к полученному осадку добавляют смесь равных частей глицерина и поваренной соли, содержимое взбалтывают и вновь центрифугируют 3-5 минут, после чего яйца гельминтов всплывают в поверхностный слой. Гельминтологической петлей снимают поверхностную пленку переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Метод Щербовича (1952)

Используют для обнаружения яиц с более высоким удельным весом (например яиц метастронгилид). Пробу фекалий разбавляют водой и размешивают до получения равномерной взвеси, процеживают через металлическое ситечко или марлю в центрифужную пробирку и центрифугируют 1-2 мин. После этого верхний слой сливают, а к осадку добавляют раствор сернокислого магния и взвесь снова центрифугируют 1-2 мин. После этого проволочной петлей снимают поверхностную пленку жидкости и микроскопируют.

Методы осаждения

Метод последовательных сливов (седиментационный) Демидов Н.В.

Пробу фекалий 5-10 г помещают в стакан или баночку, добавляют воду (1:20), размешивают, фильтруют через марлю или металлическое ситечко и отстаивают 5 минут, сливают верхний слой, и вновь добавляют воды, отстаивают 5 минут. Такую процедуру последовательного промывания с 5 минутным отстаиванием повторяют 4-5 раз до полного просветления надосадочной жидкости. Затем надосадочный слой жидкости сливают, а осадок просматривают под микроскопом при малом увеличении на предметных стеклах 6-7 x 9-13 см или в чашке Петри. Метод применяют при исследовании фекалий на фасциолез, дикроцелиоз. Таким же путем можно последовательно промыть осадок полученный после исследования фекалий флотационными методами. В этом случае одну и ту же порцию фекалий исследуют сначала флотационным методом на яйца цестод и нематод, а затем, промыв водой осадок на яйца трематод и акантоцефалов.

Метод простого центрифугирования

Фекалии (5-10 г) помещают в стаканчик или баночку, добавляют 100 мл дистиллированной воды, перемешивают, фильтруют через сито в центрифужную пробирку и отстаивают в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют равное количество глицерина и центрифугируют при 2400 об/мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость сливают. Каплю осадка помещают на предметное стекло и исследуют под микроскопом. Метод рекомендуется для обнаружения яиц трематод, трихостронгилид, метастронгилид, вегетативных форм и цист простейших и спорозоитов.

Комбинированные методы

Метод флотационно-седиментационный (Н.В.Демидов,1963)

Пробу фекалий (3-5 г) помещают в стаканчик и тщательно размешивают с насыщенным раствором поваренной соли (уд. вес - 1,18). отстаивают 15-20 мин, совочком или ложкой удаляют всплывающие на поверхность грубые частицы. Надосадочную жидкость отсасывают спринцовкой или сливают. К осадку до верха наливают воду и размешивают. Взвесь фильтруют через металлическое сито или марлю в стакан, фильтрат отстаивают 5 минут. Затем отсасывают поверхностный слой оставив на дне 15-20 мл осадка. Перемешивают осадок в конический стаканчик (объем 30-40 мл, внутренний диаметр дна 1,5-2 см), отстаивают взвесь 5 минут, отсасывают жидкость и повторяют процедуру. Осадок переносят на стекло и исследуют. Метод применяется при исследовании на фасциолез.

Метод комбинированный (модификация Г.А.Котельникова и В.И.Хренова,1981)

Пробу фекалий (3г) кладут в стаканчик и, влив небольшое количество воды, тщательно размешивают при добавлении воды порциями до объема 50 мл. Взвесь фильтруют через ситечко в другой стаканчик и отстаивают 5 мин. Надосадочный слой сливают, а осадок помещают в центрифужную пробирку, наливают раствор гранулированной аммиачной селитры (плотность 1,3) и центрифугируют 1-2 мин. Затем металлической петлей снимают 3 капли поверхностного слоя, переносят на предметное стекло и микроскопируют с целью обнаружения яиц гельминтов. Метод можно применять для диагностики метастронгилеза свиней. При этом обнаруживают яйца аскарид, трихоцефалюсов и других нематод.

Ларвоскопические методы

Эти методы применяют для диагностики диктиокаулеза жвачных и лошадей, стронгилятозов пищеварительного тракта жвачных, лошадей и стронгилоидозов молодняка животных разных видов.

Метод Бермана

5-10 г свежесвыделенных фекалий помещают на металлической сетке (или завернутыми в марлю) в стеклянную воронку, прикрепленную к штативу. На узкий конец воронки прикрепляют резиновую трубку с зажимом Мора, Аппарат заполняют теплой водой (38-43 °С), так, чтобы фекалии только соприкасались с теплой водой. Личинки активно выползают в теплую воду и постепенно скапливаются в нижней части воронки над зажимом, Через 1-3 часа зажим открывают и жидкость сливают в центрифужные пробирки. После центрифугирования в течение 2-3 минут верхний слой жидкости сливают, а осадок переносят на часовое стекло и исследуют. Можно на конец резиновой трубки одеть центрифужную пробирку. В этом случае личинки скапливаются на дне пробирки.

Упрощенная модификация метода Бермана (по Шильникову)

Применяют для обнаружения личинок легочных и кишечных гельминтов. Пробы фекалий завернутые в марлю, подвешивают на деревянной палочке или препаровальной игле, в стакане или баночке касаясь горячей воды (Т -40 град С). Оставляют на 1-2 часа, после чего удаляют фекалии, жидкость осторожно сливают, а осадок микроскопируют для обнаружения личинок.

Примечание: Для дифференциальной диагностики живых личинок диктиокаулюсов от личинок других стронгилят к осадку в пробирке или на часовом стекле добавляют 1-2 капли 0,1 % водного раствора метиленового синего (через 20-30 секунд личинки диктиокаулюсов окрашиваются в сиреневый цвет, а личинки других нематод не окрашиваются).

Избирательный экспресс-метод (по Котельникову и Хренову)

Метод основан на усилении двигательной активности личинок диктиокаулюсов в растворе сернокислого цинка (плотность 1,24) и концентрации их путем флотации в поверхностном слое раствора.

Пробы фекалий (5 г) кладут в стаканчик с раствором сернокислого цинка. В течение 1-2 мин, пробу энергично закручивают по кругу палочкой (не растирая и не размешивая). Не менее чем через 5-10 мин пробы вынимают пинцетом, взвесь оставляют в покое на 10-15 мин, а затем при помощи гельминтологической петли (D - 8 мм) шесть капель раствора из поверхностного слоя переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Пробы фекалий полужидкой консистенции от овец и пробы от телят (5 г) помещают в стаканчик с раствором сернокислого цинка на 20-30 мин без разгонки и размешивания. Затем при необходимости фекалии удаляют, а поверхностный слой раствора исследуют на наличие личинок диктиокаулюсов так же как и в предыдущем случае. Личинки сохраняют подвижность в поверхностной пленке этого раствора до 3 часов.

Метод является избирательным в отношении личинок диктиокаулюсов (личинки стронгилят пищеварительного тракта и стронгилоидесов в течение 1-2 мин деформируются и разрушаются, личинки мюллериусов свертываются и внешне напоминают пузырьки воздуха)

Специальные методы исследования

Метод соскоба с перианальных складок для диагностики оксиуроза лошадей

Самки некоторых нематод (представителей подотряда Охуурата) откладывают яйца в окружности ануса животного. Поэтому их легко можно обнаружить в соскобах взятых из этой области.

При помощи спички или специальной маленькой деревянной лопаточки увлажненной жидкостью (глицерин с водой 1:1) производится соскоб с перианальных складок, с внутренней поверхности хвоста и промежности. Частицу соскоба помещают в каплю той же жидкости на предметное стекло, покрывают покровным и исследуют под микроскопом. Яйца оксиурат определяют по их характерной структуре.

Метод соскоба ретро-перианальных складок

Метод применяется для диагностики цестодозов плотоядных. При помощи квача смоченного в 50 % растворе глицерина производится соскоб с ректальных и парианальных складок затем квач промывается в 50% растворе глицерина в центрифужной пробирке и жидкость центрифугируется 2-3 мин. Надосадочная жидкость сливается, а осадок наносится на предметное стекло и микроскопируется.

Метод используется для диагностики возбудителей подотряда Taeniata.

Необходимо учитывать, что яйца некоторых цестод, особенно *Echinooccus granulosus*, *Multiceps multiceps*, *Taenia hydatigena* и др. могут служить источником заражения человека, поэтому при исследовании следует соблюдать меры предосторожности.

Вопросы для самоконтроля

1. Седиментационные методы диагностики гельминтозов.
2. Флотационные методы диагностики гельминтозов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Лекция №8

Методы исследования в протозоологии. Лабораторное оборудование. Проведение исследований.

Биохимические и иммунохимические методы исследований в гельминтологии

Роль иммунохимии в гельминтологии заключается в решении вопроса о том, какие вещества в гельминтах являются специфическими антигенами, участвующими в процессах иммуногенеза при данном заболевании, какова природа этих веществ и место их локализации в гельминте. Задача иммунохимии - выделить эти вещества в наиболее чистом виде для иммунодиагностики и получить специфические антитела к этим веществам для применения их в иммунотерапии гельминтозов.

Главная трудность в выполнении этой задачи заключается в том, что интересующие нас биологически активные вещества, главным образом белки, входят компонентами в сложные гетерогенные системы.

Поэтому анализ и препаративное разделение таких многокомпонентных систем является первоочередной задачей.

В лаборатории биохимии гельминтов Всесоюзного института гельминтологии им. К.И.Скрябина для аналитических целей используют методы зонального электрофореза на различных инертных носителях - электрофорез на бумаге, на агаре и дисковый электрофорез в полиакриламидном геле. Последний метод является новым вариантом зонального электрофореза. В качестве инертного носителя в нем используют синтетический полиакриламидный гель. Его синтезируют непосредственно перед опытом из заранее приготовленных исходных реактивов мономеров (акриламида и метиленабисакриламида), добавляя растворы катализаторов.

На этом геле сложные белковые смеси, такие, как сыворотка крови, разделяются на 20-30 компонентов. Благодаря своей сетчатой структуре полиакриламидный гель действует как молекулярное сито. Белки даже с одинаковым зарядом могут разделяться, если они различаются по форме и размеру молекул. Чтобы гель обладал лучшим молекулярно-ситовым эффектом, его пористость можно регулировать в широком диапазоне, меняя концентрацию мономера применительно к размерам молекул исследуемых веществ. В широком диапазоне концентраций гели сохраняют прозрачность и механическую прочность. Стандартность геля позволяет получать хорошую воспроизводимость результатов, чего обычно трудно добиться при использовании метода электрофореза в крахмальном геле.

В лаборатории разработан вариант дискового электрофореза (чувствительность 50-200 мкг белка) в полиакриламидном геле. Высокая разрешающая способность метода при небольшом треке разгона обуславливается, во-первых, молекулярным просеиванием и, во-вторых, автоматическим концентрированием исследуемого образца в узкую стартовую зону. Концентрирование образца происходит благодаря различиям в концентрации, ионной силе и рН буферов в разных слоях геля.

С помощью данного метода проведены исследования гетерогенности различных белковых препаратов, главным образом антигенов, сравнительные исследования экстрактов личинок трихинелл и продуктов, выделяемых ими в среду при инкубации. В результате выяснена идентичность некоторых компонентов экстракта и метаболических продуктов.

Исследованы тотальные экстракты и полученные из них многочисленные антигенные препараты двух видов фасциол. Показана гетерогенность этих препаратов и проведена идентификация некоторых компонентов в разных препаратах. Применение этого метода важно при исследовании видовых различий в характере электрофореграмм, используемых и систематике гельминтов. Для чего проведено сравнительное исследование тотальных экстрактов близких видов трематод и цестод.

Каждый из перечисленных видов имел свой характерный белковый спектр, воспроизводимый в разных экспериментах. Это дает основание рекомендовать метод дискового электрофореза в качестве таксономического критерия для определения, спорных видов гельминтов.

Препаративный - вариант дискового электрофореза в полиакриламидном геле.

Метод препаративного электрофореза в полиакриламидном геле не только показывает наличие белковых фракций, но и выделяет их в достаточных для дальнейших исследований количествах. Его начали разрабатывать сравнительно недавно (первая работа Ракузен и Кальванико, 1964 г.). Сейчас исследователи ищут более простые подходы к проведению этого вида электрофореза, делая его доступным для многих лабораторий. Применение препаративного электрофореза в гельминтологии дает возможность подвергать более детальному фракционированию компоненты экстрактов гельминтов (по заряду молекул и по их величине). В лаборатории Всесоюзного института гельминтологии им. К. И.Скрябина применяют камеру собственной конструкции. Заполнение камеры рабочими растворами полимеризация, внесение образца проводятся аналогично аналитическому варианту дискового электрофореза. При режимах 1601/ и 100 гни метод позволяет в течение 3 час. разделить (грубо) на 6-8 компонентов 250 мг (по белку) экстракта. Возврат белка при механическом разрушении и экстрагировании полученных фракций равен 60-70%. Для дальнейшей очистки полученных фракций применяем повторный электрофорез.

Рабочие растворы для приготовления гелей различной пористости готовим из чистого акриламида или из цианогама-41 (ФРГ).

Гальфилтрация.

Одним из современных методов препаративного фракционирования сложных смесей является фильтрование через гели. При пропускании смеси веществ через столб геля происходит разделение благодаря возникновению эффекта молекулярного сита, в качестве которого в биохимии широко используются сефадексы различных типов. Выбор соответствующего типа сефадекса зависит от размера молекул веществ, подлежащих фракционированию. По существу этот процесс представляет собой хроматографическое разделение. Вещества в зависимости от размера молекул распределяются, в растворителе, окружающем гранулы геля, и растворителе внутри гранул геля. Объем растворителя внутри гранул геля называется Внутренним объемом. Объем, окружающий гранулы, - наружным объемом. Фракционирование смеси при пропускании их через столб геля обуславливается неодинаковой доступностью внутреннего объема геля для молекул различного размера, которая зависит от степени пористости данного типа геля и от размера молекул исследуемых веществ. Чем меньше внутренний объем доступен для молекул, тем они меньше задерживаются сефадексом. Поэтому при пропускании смеси веществ с различными размерами молекул через колонку с гелем они будут выходить отдельными фракциями в порядке уменьшения размера молекул.

С использованием метода фильтрования через гели проведено фракционирование белков двух видов фасциол. Получено до 8 фракций, различающихся по размерам молекул и ориентировочно определен молекулярный вес белков, входящих в их состав. Данный метод может быть использован "для очистки антигенных препаратов. Только его использование, несмотря на гетерогенность каждой полученной фракции, позволило получить препарат, обладающий в антигенном отношении видовой специфичностью.

Применение этого метода не дает полной очистки какого-либо белкового компонента экстракта, но позволяет добиться значительной степени его очистки. Метод гальфилтрации применим даже к очень неустойчивым белкам, а в комбинации с другими методами, основанными на других свойствах белков, он может способствовать полной очистке исследуемого антигена. Комбинируя метод фильтрования через гели с методами ионообменной хроматографии или препаративным электрофорезом в полиакриламидном геле, мы рассчитываем получить высокоочищенные гомогенные препараты антигенов.

Метод преципитации в агаровом геле занимает достойное место среди иммунохимических методов. Он позволяет проводить анализ сложного набора растворимых антигенов и преципитирующих антител в испытываемых системах, отличается возможностью индивидуально исследовать каждую пару антиген-антитело, так как при встречной диффузии в агар разные антигены образуют независимые линии преципитации с соответствующими антителами. Этот метод незаменим в тех случаях, когда требуется сравнить антигенный состав двух или нескольких различных препаратов, провести предварительный анализ преципитирующих

сывороток. Его принцип заключается в том, что антиген и антитело, диффундируя в агар и реагируя между собой, образуют преципитат, который с течением времени проявляется в виде резкой линии преципитации, если антиген и антитело взяты в оптимальном соотношении. При этом число линий преципитации соответствует числу пар антиген-антитело в исследуемой

Впервые метод преципитации в агаре был предложен (1946), в настоящее время его усовершенствовали, разработали новые варианты и модификации.

Сейчас все чаще используется микромодификация метода преципитации в агаре по Ухтерлони. Эта реакция проводится в микроварианте в плоском слое агара, находящегося на фотографическом или предметном стекле. В агаре делают лунки, в одну из них заливают исследуемую антисыворотку, а в другие - препараты антигенов. Антигены и антитела, диффундируя из лунок, встречаются и образуют столько линий преципитации, сколько соответствующих пар антиген-антитело имеется в исследуемой системе.

Микрометод ускоряет анализ реакции в несколько раз и требует при этом значительно меньшего количества компонентов. По техническому выполнению он не сложнее макрометода, а по чувствительности не уступает ему.

Методы изучения эпизоотологии гельминтозов.

Изучение эпизоотологии гельминтозов включает ряд вопросов, основными из которых являются:

распространение возбудителя;

сезонная и возрастная динамика инвазированности животных теми или иными гельминтами - возбудителями заболеваний и клинически выраженного заболевания;

выявление путей заражения животных;

устойчивость животных к заражению и факторы, оказывающие влияние на нее;

выявление природных факторов, оказывающих влияние на распространение гельминтозов;

особенности биологии возбудителя, оказывающие влияние на его распространение и течение заболевания;

особенности биологии и экологии промежуточных хозяев возбудителя, оказывающие влияние на его распространение. Методики изучения этих вопросов различные.

Методика изучения распространения возбудителя гельминтозов на определенной территории.

Она заключается в обнаружении соответствующих гельминтов при осмотре или специальных гельминтологических вскрытиях органов, в которых они паразитируют (для этого используют убойных или павших животных), и в проведении гельминтокопрологических обследований животных. Количество точек, в которых проводят эту работу, может быть различным и зависит, в первую очередь, от размера обследуемой территории. В отдельном хозяйстве обследуют все животноводческие фермы, а в районе, - хотя бы по одной точке в каждом или 50% его хозяйств. В области, крае, республике или географической зоне обследуют по одной точке в 10-20% хозяйств каждого района.

В каждой точке или исследуют не менее 10 поражаемых данным гельминтом органов животных (вскрывается 10 голов животных), или соответствующим гельминтокопрологическим методом обследуют не менее 20 голов животных.

Вскрытия и гельминтокопрологические обследования проводят в сезон, соответствующий максимальному поражению животных.

Методика изучения распространения клинически выраженного заболевания.

Лишь отдельные гельминтозы (ценуроз, телязиоз парафиляриоз и некоторые другие) имеют характерную клинику. У большинства гельминтозов она не характерна.

Для изучения распространения клинически выраженных гельминтозов проводят осмотры животных в сезон, когда число клинически больных животных максимально.

В каждой точке осматривают всех или не менее 100 животных, для которых характерен данный гельминтоз, а затем проводят исследования, рекомендуемые для изучения клиники,

Количество точек также зависит от размера обследуемой территории.

Дополнительно могут быть использованы и данные ветеринарной отчетности, особенно в отношении не имеющих характерной клиники гельминтозов, которые устанавливаются и отражаются в ветеринарной отчетности.

Методика изучения сезонной и возрастной динамики гельминтозов.

Сезонную и возрастную динамику гельминтозов изучают тремя методами:

- 1) осмотр или гельминтологические вскрытия поражаемых органов от убойных или павших животных;
- 2) гельминтокопрологические исследования животных;
- 3) обработка и анализ данных ветеринарной отчетности.

Все три метода дополняют друг друга.

Вскрытия проводят на мясокомбинате, куда поступают на убой животные данной зоны. Ежемесячно вскрывают по 20 -голов животных трех возрастных групп (молодняк до года, молодняк в возрасте 1-2 лет, взрослые животные). Вскрытия проводят на протяжении года. Устанавливают экстенсивность и интенсивность инвазии в разные сезоны.

Гельминтокопрологические обследования проводят в одной характерной для данной зоны точке. Берут группу молодняка в возрасте около I месяца, численностью не менее 50 голов и обследуют на протяжении года тем или иным гельминтокопрологическим методом (в зависимости от гельминтоза) не реже чем раз В месяц (еще лучше через каждые 15 дней). Каждый раз при обследовании устанавливают экстенсивность и примерную интенсивность инвазии (последняя - подсчетом числа яиц или личинок в препарате или поле зрения микроскопа с применением стандартизированных методик обследования).

В следующий сезон (весна, лето, осень, зима) набирают такую же группу и таким же путем обследуют на протяжении года.

Всего пропускают 4 группы (по количеству сезонов) молодняка. Каждую обследуют в течение года, что требует в общей сложности 2 лет работы.

Животных старше года обследуют также ежемесячно на протяжении года. Но здесь достаточно провести наблюдения за одной группой молодняка в возрасте от 1 до 2 лет и одной группой продуктивных (старше 2 лет) животных.

Таким образом, устанавливают сезонные колебания экстенсивности и интенсивности инвазии у различных возрастных групп животных (в отношении молодняка до года и в отношении молодняка, народившегося В разные сезоны). Дальнейшую возрастную динамику изучают путем одновременного обследования животных разного возраста (1, 2, 3, 4 и т. д. лет). Должно быть обследовано не менее 20 животных каждого года жизни.

Обработка и анализ данных ветеринарной отчетности.

Производят выборку данных из ежемесячных районных ветеринарных отчетов по форме и. 28. При этом учитывают количество животных, показанных в графах "Заболело", "Пало" от данного гельминтоза анализируют в отношении сезонов.

Изучение сезонной и возрастной динамики клинического проявления гельминтозов проводят путем осмотра животных в характерных для данной зоны точках в разные сезоны и анализом данных отчетности.

Изучение других вопросов производят по многочисленным специальным методикам.

В гельминтологии широко применяют метод полного гельминтологического вскрытия животных по Скрябину, различные методы, исследования фекалий для обнаружения в них яиц и личинок гельминтов, трихинеллоскопию и другие, которые достаточно подробно изложены в учебниках.

Большинство методик заимствовано из биологии, биохимии, иммунохимии, бактериологии, вирусологии. Все они опубликованы в различных руководствах.

Вопросы для самоконтроля

1. Определение экстенсивности и интенсивности инвазии.
2. Изучение сезонной динамики.

3. Изучение эпизоотологии гельминтозов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Лекция №9 Вариационная статистика. Виды выборок. Критерий Стьюдента.

t-критерий Стьюдента – общее название для класса методов статистической проверки гипотез (статистических критериев), основанных на распределении Стьюдента. Наиболее частые случаи применения *t-критерия* связаны с проверкой равенства средних значений в двух выборках.

1. История разработки *t-критерия*

Данный критерий был разработан **Уильямом Госсетом** для оценки качества пива в компании Гиннесс. В связи с обязательствами перед компанией по неразглашению коммерческой тайны, статья Госсета вышла в 1908 году в журнале «Биометрика» под псевдонимом «Student» (Студент).

2. Для чего используется *t-критерий* Стьюдента?

t-критерий Стьюдента используется для определения статистической значимости различий средних или относительных величин. Может применяться как в случаях сравнения независимых выборок (*например, группы больных сахарным диабетом и группы здоровых*), так и при сравнении связанных совокупностей (*например, частота пульса у одних и тех же пациентов до и после приема антиаритмического препарата*).

3. В каких случаях можно использовать *t-критерий* Стьюдента?

Для применения *t-критерия* Стьюдента необходимо, чтобы исходные данные имели *нормальное распределение*. В случае применения двухвыборочного критерия для независимых выборок также необходимо соблюдение условия *равенства (гомоскедастичности) дисперсий*.

При несоблюдении этих условий при сравнении выборочных средних должны использоваться аналогичные методы *непараметрической статистики*, среди которых наиболее известными являются **U-критерий Манна — Уитни** (в качестве двухвыборочного критерия для независимых выборок), а также **критерий знаков** и **критерий Вилкоксона** (используются в случаях зависимых выборок).

4. Как рассчитать *t-критерий* Стьюдента?

Для сравнения средних величин *t-критерий* Стьюдента рассчитывается по следующей формуле:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{m_1^2 + m_2^2}$$

где **M₁** - средняя арифметическая первой сравниваемой совокупности (группы), **M₂** - средняя арифметическая второй сравниваемой совокупности (группы), **m₁** - средняя ошибка первой средней арифметической, **m₂** - средняя ошибка второй средней арифметической.

Для сравнения относительных величин *t-критерий* Стьюдента рассчитывается сходным образом:

$$t = \frac{P_1 - P_2}{m_1^2 + m_2^2}$$

где **P₁** - относительный показатель первой сравниваемой совокупности (группы), **P₂** - относительный показатель второй сравниваемой совокупности (группы), **m₁** - средняя ошибка первого относительного показателя, **m₂** - средняя ошибка второго относительного показателя.

5. Как интерпретировать значение *t-критерия* Стьюдента?

Полученное значение *t-критерия* Стьюдента необходимо правильно интерпретировать. Для этого нам необходимо знать количество исследуемых в каждой группе (**n₁** и **n₂**). Находим число степеней свободы **f** по следующей формуле:

$$f = (n_1 + n_2) - 2$$

После этого определяем критическое значение *t-критерия* Стьюдента для требуемого уровня значимости (например, **p<0,05**) и при данном числе степеней свободы **f** по таблице (*см. ниже*).

Сравниваем критическое и рассчитанное значения критерия:

Если рассчитанное значение t-критерия Стьюдента *равно или больше* критического, найденного по таблице, делаем вывод о статистической значимости различий между сравниваемыми величинами.

Если значение рассчитанного t-критерия Стьюдента *меньше* табличного, значит различия сравниваемых величин статистически не значимы.

6. Пример расчета t-критерия Стьюдента

Для изучения эффективности нового препарата железа были выбраны две группы пациентов с анемией. В первой группе пациенты в течение двух недель получали новый препарат, а во второй группе - получали плацебо. После этого было проведено измерение уровня гемоглобина в периферической крови. В первой группе средний уровень гемоглобина составил $115,4 \pm 1,2$ г/л, а во второй - $103,7 \pm 2,3$ г/л (данные представлены в формате $M \pm m$), сравниваемые совокупности имеют нормальное распределение. При этом численность первой группы составила 34, а второй - 40 пациентов. Необходимо сделать вывод о статистической значимости полученных различий и эффективности нового препарата железа.

Решение: Для оценки значимости различий используем t-критерий Стьюдента, рассчитываемый как разность средних значений, поделенная на сумму квадратов ошибок:

$$t = \frac{115,4 - 103,7}{\sqrt{1,2^2 + 2,3^2}}$$

После выполнения расчетов, значение t-критерия оказалось равным 4,51. Находим число степеней свободы как $(34 + 40) - 2 = 72$. Сравниваем полученное значение t-критерия Стьюдента 4,51 с критическим при $p < 0,05$ значением, указанным в таблице: 1,993. Так как рассчитанное значение критерия больше критического, делаем вывод о том, что наблюдаемые различия статистически значимы (уровень значимости $p < 0,05$).

Вопросы для самоконтроля

1. Виды репрезентативных выборок.
2. Биометрия.
3. Определение критерия Стьюдента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Лекция №10

Методы исследования в арахноэнтомологии. Лабораторное оборудование. Проведение исследований.

Одним из решающих условий в организации и проведении эффективных мер борьбы с саркоптоидами животных является правильный и своевременно поставленный диагноз.

Диагноз на саркоптоидозы животных ставится комплексно по прижизненным данным.

Прижизненные методы диагностики

При жизни животного диагноз на саркоптоидозы ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков и лабораторных исследований соскобов кожи.

Эпизоотологические данные. Учитывают благополучие своего и соседних хозяйств, сезонность заболевания, возраст восприимчивых животных.

Распространение саркоптоидозов повсеместное, заболевание может наблюдаться в любое время года, но чаще осенью и зимой; болеют животные всех возрастов, но чаще с низкой резистентностью. Распространению болезней способствуют повышенная влажность, антисанитария, скученность животных, содержание их в неблагоустроенных помещениях, неполноценное кормление.

Клинические признаки. Основными клиническими признаками являются зуд, расчесы, появление на коже мелких узелков, которые при расчесывании разрываются, содержимое затем подсыхает и образуются корочки. Кожа теряет эластичность, становится складчатой, на таких участках тела выпадают волосы или шерсть. Животные теряют упитанность (рис. 110).

При псороптозе кроликов и отодектозе плотоядных на внутренней поверхности ушной раковины и наружном слуховом проходе образуются наслоения корочек темно-бурого цвета, развивается гноеродная микрофлора. У животных голова обычно повернута в сторону (кривоголовость) (рис. 111).

При кнемидокоптозе птиц нижние части конечностей утолщены и деформированы. Кожа пораженных конечностей покрыта грязно-серыми корками (известковая нога). Кератозные напластования покрываются трещинами, из которых выделяется сукровица, засыхающая на поверхности. Птицы расклевывают зудящие места, передвигаются с трудом, хромают, чаще лежат (рис. 112).

При паразитировании клещей *Knemidocoptes gallinae* поражается кожа разных частей тела. Вокруг перьевых очин скапливаются чешуйки эпидермиса. Перья обламываются или выпадают, куры имеют линяющий вид. Кожа на местах, лишенных перьев краснеет, покрывается серовато-белыми чешуйками, на ней образуются мелкие узелки. Зуд приводит к саморасклеву.

При демодектозе животных зуд обычно отсутствует или слабо выражен. На коже в местах поражения образуются небольшие бугорки, при надавливании из них выделяется беловато-воскообразное содержимое. Волосы в местах поражения выпадают, кожа становится утолщенной и складчатой (рис. 113).

Лабораторные методы. Лабораторные методы являются основными методами диагностики саркоптоидозных болезней и основаны на обнаружении в соскобах кожи клещей – возбудителей болезни.

При подозрении на саркоптоидозные болезни соскобы у животных берут скальпелем на границе здорового и пораженного участков кожи, т.к. в этих местах скапливается наибольшее количество клещей. Скальпель держат почти параллельно поверхности кожи и производят глубокие, до появления сукровицы, соскобы. Получаемый при этом материал собирают в чашку Петри, плотно приставленную к поверхности кожи ниже места взятия соскоба.

При подозрении на наличие накожных клещей (псороптес, хориоптес, отодектес) корочки можно брать и с помощью пинцета.

Полученный таким образом материал исследуют на месте или в лаборатории. Для пересылки в лабораторию и во избежание расползания клещей взятые соскобы сразу же упаковывают. Для этого их помещают в чашку Петри, на дно которой кладут кусочек увлажненной фильтровальной бумаги. Пазы между стеклами чашки промазывают пластилином. Соскобы также можно упаковать в хорошо закрытую пробирку или в целлофановый мешок, который вкладывают в закрывающуюся стеклянную или пластмассовую банку.

Чтобы банки или пробирки не разбились в дороге, их тщательно упаковывают с ватой в картонные или фанерные ящики и с сопроводительным письмом отправляют в лабораторию.

Если исследование соскобов будет проводиться в хозяйстве, то их можно временно сохранять в чашках Петри, края которых смазывают вазелином.

Методы исследования соскобов кожи животных. Исследование материала соскобов кожи проводят с помощью витальных методов (обнаружение живых клещей) и мортальных (обнаружение мертвых клещей).

Витальные методы. Эти методы применяются для установки первичного диагноза, а также для оценки эффективности проведенного лечения. Почти все они основаны на миграции клещей к теплу.

1. Закрытую чашку Петри с соскобом кожи переворачивают крышкой вниз и ставят на стакан с теплой водой (до 50 °С). Клещи, стремясь к теплу, выползают из корочек на крышку чашки Петри. Через 10–15 мин чашку снимают со стакана и переворачивают крышкой вверх. Затем крышку чашки Петри просматривают под микроскопом или при помощи лупы на наличие клещей.

2. Свежий соскоб, взятый у животных, подозреваемых в заражении накожных клещами, помещают в чашку Петри, размельчают, в течение 5 мин подогревают и просматривают на темном фоне при помощи лупы либо невооруженным глазом. Под влиянием тепла клещи начинают активно двигаться и их легко обнаружить.

3. Способ Д.А. Приселковой. Соскоб помещают в чашку Петри или на часовое стекло и к нему добавляют двойное по объему количество керосина. Корки соскоба тщательно разминают скальпелем или ребром предметного стекла. Керосин размягчает и просветляет корочки. Затем такие корочки берут небольшими порциями, помещают между предметными стеклами, слегка сдавливают и просматривают под малым увеличением микроскопа. Клещи в керосине сохраняют жизнеспособность до 4 ч.

Мортальные методы. Направлены на обнаружение мертвых клещей и имеют значение только для установления первичного диагноза. Из этих методов наиболее распространенным является следующий.

Соскоб помещают в чашку Петри или на часовое стекло и добавляют туда двойное по объему количество 10 %-го раствора едкого натрия или калия. Все это перемешивают и оставляют на 30 мин для размягчения корочек. Затем корочки небольшими порциями помещают между двумя предметными стеклами, слегка сдавливают и просматривают под малым увеличением микроскопа на наличие клещей. С этой же целью можно использовать керосин или 50 % глицерин.

Взятие материала от животных и исследование его на *демодекоз* имеют некоторые особенности. Для этого с помощью остроконечного скальпеля или кровопускательной иглой делают прокол в центре обнаруженного демодекозного узелка, выдавливают содержимое узелков и помещают на предметное стекло в каплю вазелинового или подсолнечного масла (лучше подогретого), тщательно перемешивают, покрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом на наличие характерных клещей. С целью ранней диагностики демодекозных клещей можно обнаружить, исследуя соскобы кожи животных. Для этого выщипывают волосяной покров на площади 15–20 мм² в местах наиболее частой локализации клещей и на этот участок кожи наносят 1–2 капли вазелинового или подсолнечного масла. Затем кожу берут в складку и, нажимая тупой стороной лезвия скальпеля, проводят по коже, стараясь выдавить клещей из волосяных фолликулов. Полученные таким образом соскобы и волосы микроскопируют.

В лабораторию материал для исследования на демодекоз посылают в пробирочках с добавлением небольшого количества физраствора или вазелинового масла, т.к. при высыхании материала клещи гибнут.

Таким образом, по данным морфологии клещей, обнаруженных у животных с помощью витальных или мортальных методов и с учетом локализации болезненного процесса (места взятия соскоба), определяют род клещей и ставят соответствующий диагноз. При этом следует также учитывать эпизоотологические данные и клинические признаки.

При отрицательных результатах исследования корочек соскобы берут повторно от тех же животных через 5–10 дней.

Саркоптоидозные заболевания животных следует дифференцировать от клинически сходных болезней: сифункулятоз (вшивость), триходектоз (власоеды), маллофагоз (рунец), стригущий лишай. Обнаружение насекомых при осмотре животных позволяет установить этиологию заболевания. Стригущий лишай диагностируют специальными методами. Экземы также сопровождаются сходными признаками.

У овец интенсивный зуд и слабовыраженный дерматит, но без выпадения шерсти, может появиться в нижней части живота в конце стойлового периода при однообразном кормлении силосом или сенажом. Изменение кормления, моцион на свежем воздухе быстро прекращают зуд. Шерсть у овец может выпадать при маститах, лихорадке, истощении.

Вопросы для самоконтроля

1. Виды репрезентативных выборок.
2. Биометрия.

3. Определение критерия Стьюдента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Лекция №11

Публикация результатов исследования. Структура научной статьи.

Структура научной статьи включает не только сам текст с основным содержанием, но и другие обязательные элементы, среди которых:

- заголовок статьи,
- сведения об авторах,
- аннотация,
- ключевые слова,
- основной текст статьи,
- библиографические ссылки,
- библиографический список.

Информация об авторах, название, аннотация, ключевые слова и библиографический список обязательно приводятся как на русском или другом языке, так и обязательно на английском языке.

Заголовок статьи должен отражать содержание статьи, тематику и результаты проведенного научного исследования. Название научной статьи должно кратко и точно суммировать исследование. В заголовок статьи необходимо вложить как информативность, так привлекательность и уникальность научного творчества автора. Но не стоит увлекаться, чтобы название только привлекало внимание, избегайте использования вводящих в заблуждение или сенсационных заголовков.

Сведения об авторах статьи должны содержать ученое звание, ученую степень, место работы, учебы, контактные данные. Сведения научных консультантов также перечисляются как авторы. Обычно мы видим одного или двух-трех авторов книги или статьи. Но у этих статей может быть до десяти авторов. Естественно, что не все они писали одновременно рукопись. Такое авторство и место в списке отражает распределение участия и объема прав на исследование. Ученый, стоящий в начале списка, выполнил большую часть работы, описанной в статье.

Аннотация – краткая характеристика назначения, содержания, вида, формы и других особенностей статьи. Аннотация должна отражать основные и ценные, по мнению автора, этапы, объекты, их признаки и выводы проведенного исследования. Рекомендуемый объем аннотации – 300-500 знаков. О том, как подготовить аннотацию научной статьи, можно ознакомиться в разделе методической помощи.

Ключевые слова – набор слов, отражающих содержание текста в терминах объекта, научной отрасли и методов исследования. Рекомендуемое количество ключевых слов – 5-7, количество слов внутри ключевой фразы – не более 3. О том, как подобрать ключевые слова к научной статье, можно ознакомиться в разделе методической помощи.

Основной текст статьи излагается в определенной последовательности его частей. Можно выделить два вида внутренней организации текста научной статьи. Первый вид часто используется в российских научных журналах. Он достаточно прост и включает в себя:

- 1) введение,
- 2) основную часть,
- 3) выводы.

В зарубежных научных журналах, особенно в англоязычных, в статье требуют четко выделять следующие составные части:

- 1) введение (Introduction),
- 2) материалы и методы (Materials and Methods),
- 3) результаты (Results),
- 4) обсуждение и заключения (Discussion and Conclusions).

Приведенные части в зарубежных научных журналах требуют выделять соответствующими подзаголовками и излагать в данных разделах релевантную информацию.

Оба вида структур научной статьи схожи по основной конструкции и включают три основных блока: введение, основная часть, выводы.

Введение (Introduction) Прежде всего необходимо ввести читателя в курс дела. Во введении автор знакомит с предметом, задачами и проведенными этапами исследования. Введение предназначено, чтобы позволить читателя понять гипотезу авторов и средства ее проверки.

В научной статье должно излагаться личное авторское исследование. Но очень важно в самом начале показать, что авторы знают об исследованиях, которые выполнены учеными перед ними и как вновь полученные результаты вписываются в имеющиеся знания. Поэтому во введении необходимо отразить результаты предшествующих работ ученых, что им удалось, что требует дальнейшего изучения, какие есть альтернативы.

Освещение библиографии позволит отгородиться от усмотрения в Вашей работе признаков заимствования и присвоения чужих трудов. Любое научное изыскание опирается на предыдущие открытия ученых, поэтому обязательно ссылаться на те источники, из которых Вы берете информацию. Только при наличии таких ссылок статья становится пригодной для погружения в проблематику освещаемого исследования.

Во введении необходимо также описать методы исследования, процедуры, оборудование, параметры измерения, и т.д., чтобы можно было оценить и/или воспроизвести исследование. Обратите внимание, что в англоязычных журналах эти данные выделяются в раздел **Материалы и методы (Materials and Methods)**. Здесь же авторы приводят допущения и отклонения, а также процедуры, используемые для их уменьшения.

Основная часть статьи Научная статья должна отображать не только выбранный инструментарий и полученные результаты, но и процесс самого исследования или последовательность рассуждений, в результате которых получены теоретические выводы. В научно-практической статье необходимо описать стадии и этапы экспериментов или опытов, промежуточные результаты и обоснование общего вывода в виде физического или статистического объяснения.

Необходимо также изложить данные об опытах с отрицательным результатом. Здесь как нигде уместно заявить, что «Отрицательный результат тоже результат». Затраченные усилия исключают проведение аналогичных испытаний в дальнейшем и сокращают путь для следующих ученых. Следует описать все виды и количество отрицательных результатов, условия их получения и методы его устранения.

Проводимые исследования предоставляются в наглядной форме, причем не только экспериментальные, но и теоретические. Это могут быть таблицы, схемы, графические модели, графики, диаграммы и т.п. Формулы, уравнения, рисунки, фотографии и таблицы должны иметь подписи или заголовки. При их оформлении рекомендуется следовать положениям ГОСТ 2.105-95 и ГОСТ 7.32-2001, которые рекомендуется применять по аналогии в частях, посвященных регламентируемым вопросам.

Выводы (Результаты; Results) В данной части собираются тезисы основных достижений проведенного исследования. Они могут быть представлены как в письменной форме, так и в виде таблиц, графиков, чисел и статистических показателей, характеризующих основные выявленные закономерности. Выводы должны быть представлены без интерпретации авторами, что служит двум целям: во-первых, дает другим ученым возможность оценить качество самих данных, и во-вторых, позволяет другим давать свою интерпретацию результатов.

Во многих статьях в разделе Выводы авторы приводят интерпретацию полученных результатов в соответствии с поставленными задачами исследования. Обратите внимание, что в англоязычных журналах эти данные выделяются в раздел **Обсуждение и заключения (Discussion and Conclusions)**. В этой части статьи авторы излагают значение их работы прежде всего с субъективной точки зрения. Они могут интерпретировать полученные результаты на основе объединения своего опыта, базовых знаний и научного потенциала, приводя несколько возможных объяснений.

Библиографическая ссылка содержит библиографические сведения о цитируемом, рассматриваемом или упоминаемом в тексте статьи другом документе, необходимые и достаточные для его идентификации, поиска и общей характеристики. О том, как правильно оформить библиографическую ссылку в научной статье, можно ознакомиться в разделе методической помощи.

Библиографический список имеет самостоятельное значение в качестве библиографического пособия. О том, как правильно оформить библиографический список к научной статье, можно ознакомиться в [разделе методической помощи](#).

Вопросы для самоконтроля

1. Основные разделы научной статьи.
2. Составление обзора литературы.
3. Формулирование выводов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
2. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
4. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
5. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Библиографический список

1. Медицинские новости 1997 №4 С. 5-8.
2. М. В. Якубовский, Г. Н. Чистенко, В. Н. Горбачева, А. Л. Веденьков
3. Рыжков И.Б. Основы научных исследований и изобретательства / И.Б. Рыжков. – СПб.: "Лань", 2012. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-1264-8
4. Эпизоотологический метод исследования / В.В. Макаров, А.В. Святковский, В.А. Кузьмин, О.И. Сухарев. – СПб.: "Лань", 2010. – 224 с. ISBN: 978-5-8114-0903-7
5. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 384 с. ISBN: 978-5-9704-2133-8
6. Лутфуллин, М.Х. Ветеринарная гельминтология: учебное пособие / М.Х. Лутфуллин, Д.Г. Латыпов, М.Д. Корнишина. – СПб. : Лань, 2011. – 265 с. ISBN 978-5-369-01203-1.
7. Форейт, У.Дж. Ветеринарная паразитология. Справочное руководство / У. Дж. Форейт. – М. : Аквариум-Принт, 2012. - 289 с. ISBN 978-5-4238-0197-7.

Оглавление

Лекция №1 Вводная. Планирование научных исследований.....	4
Лекция №2 Современные проблемы иммунологии гельминтозов.....	8
Лекция №3 Библиография: Правила оформления списка литературных источников и ссылок на литературу.....	13
Лекция №4 Научный эксперимент: Понятие, правила планирования и постановки эксперимента, подбора животных и оформления протоколов исследований.....	21

Лекция №5 Доклинические исследования: Виды исследования, методология и порядок проведения.	33
Лекция №6 Клинические исследования:.....	35
Лекция №7 Гельминтологические методы исследования. Алгоритм определения яиц гельминтов.	36
Лекция №8 Методы исследования в протозоологии. Лабораторное оборудование. Проведение исследований.	41
Лекция №9 Вариационная статистика. Виды выборок. Критерий Стьюдента...	46
Лекция №10 Методы исследования в арахноэнтомологии. Лабораторное оборудование. Проведение исследований.	48
Лекция №11 Публикация результатов исследования. Структура научной статьи.	51