

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

М.Р. Карпова, Л.С. Муштоватова, О.П. Бочкарева, И.Ф. Зверева,
И.В. Луцаева, Е.В. Попова, М.С. Коровин, Е.В. Романова

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ. ОБЩИЙ КУРС

Под редакцией Л.С. Муштоватой

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Томск
Издательство СибГМУ
2023

УДК 579.61(075.8)
ББК 52.64я73
М 422

Авторы:

М.Р. Карпова, Л.С. Муштоватова, О.П. Бочкарева, И.Ф. Зверева,
И.В. Луцаева, Е.В. Попова, М.С. Коровин, Е.В. Романова

М 422 **Медицинская микробиология. Общий курс: учебное по-
собие** / М.Р. Карпова [и др.]; под ред. Л.С. Муштоватой. –
Томск: Изд-во СибГМУ, 2023. – 318 с.

В учебном пособии приведены современные данные, касающиеся вопро-
сов общей микробиологии: морфологии, физиологии и генетики микроорга-
низмов, значимых в инфекционной патологии, инфекции и иммунитета, имму-
нопрофилактики и иммунотерапии инфекционных заболеваний.

Данное пособие составлено в соответствии с Федеральными Государ-
ственными образовательными стандартами высшего образования (ФГОС ВО)
для студентов, обучающихся по направлениям подготовки 33.05.01 – Фарма-
ция.

**УДК 579.61(075.8)
ББК 52.64я73**

Рецензент:

М.В. Чубик – канд. мед. наук, доцент Научно-образовательного центра
Н.М. Кижнера Инженерной школы новых производственных технологий
ТПУ), г. Томск

*Утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией
лечебного факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава (протокол №10 от
05.09.2022 г.).*

© Издательство СибГМУ, 2023
© М.Р. Карпова, Л.С. Муштоватова, О.П. Бочкарева, И.Ф. Зверева,
И.В. Луцаева, Е.В. Попова, М.С. Коровин, Е.В. Романова, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Раздел 1. Классификация и морфология микроорганизмов	5
1.1. Основы классификации микроорганизмов.....	5
1.2. Морфология микроорганизмов.....	8
1.3. Методы микроскопического исследования микроорганизмов	11
1.4. Структура бактериальной клетки	17
1.5. Отдельные группы прокариот	36
1.6. Микроорганизмы-эукариоты	44
Раздел 2. Физиология микроорганизмов.....	57
2.1. Питание, дыхание и размножение бактерий	57
2.2. Культивирование бактерий	64
2.3. Основы вирусологии.....	79
2.4. Действие физических и химических факторов на микроорганизмы.....	94
2.5. Антимикробная терапия инфекционных заболеваний.....	130
2.6. Санитарная микробиология	140
2.7. Микробиота организма человека.....	153
2.8. Генетика микроорганизмов.....	161
Раздел 3. Микробиологический контроль	
в фармацевтической практике.....	179
3.1. Требования к микробиологическому контролю	179
3.2. Микрофлора воздуха производственных помещений и методы микробиологического контроля	182
3.3. Микробиологический контроль в чистых помещениях	184
3.4. Микробиологический контроль воды очищенной и воды для инъекций.....	188
3.5. Микробиологический контроль лекарственных препаратов.....	191
3.6. Микрофлора лекарственных растений.	
Методы микробиологического исследования растительного сырья	206
Раздел 4. Инфекция и иммунитет	235
4.1. Инфекция. Инфекционный процесс.....	235
4.2. Иммунология инфекционного процесса	242
4.3. Серологические методы исследования	271
4.4. Аллергия.....	279
4.5. Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний.....	287
Тестовые задания	300
Ответы на тестовые задания	316
Рекомендуемая литература	317

ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие «Медицинская микробиология. Общий курс» разработано для обучения студентов врачебных факультетов медицинских вузов.

Микробиология (от греч. micros – малый, bios – жизнь, logos – учение) – наука, изучающая строение, жизнедеятельность и экологию микроорганизмов – мельчайших форм жизни растительного или животного происхождения, невидимых невооруженным глазом. Понятие «микроорганизм» включает всех представителей микромира (бактерии, грибы, простейшие, вирусы). Микробиология является фундаментальной биологической наукой, которая использует методы других наук, прежде всего физики, биологии, биоорганической химии, молекулярной биологии, генетики, цитологии, иммунологии.

Медицинская микробиология изучает микроорганизмы, способные вызывать заболевания человека, и подразделяется на общую и частную.

В общем курсе медицинской микробиологии изучают закономерности строения и жизнедеятельности микроорганизмов на молекулярном, клеточном, популяционном уровнях, генетику микроорганизмов и взаимоотношения их с окружающей средой.

В пособии подробно рассматриваются морфология и анатомия микроорганизмов, имеющих медицинское значение, особенности их физиологии и генетики, взаимодействие с факторами окружающей среды, методы микробиологического контроля лекарственных средств, лекарственного сырья, оборудования производственных помещений фармацевтического производства. Особое внимание уделяется вопросам дезинфектологии и стерилизации. Учебный материал иллюстрирован наглядными авторскими схемами, рисунками и таблицами.

Пособие снабжено тестовыми вопросами, которые студенты могут использовать для проверки знаний.

Материал изложен в соответствии с утвержденной рабочей программой по дисциплине «Микробиология» и соответствует темам лекций и практических занятий.

Раздел 1. КЛАССИФИКАЦИЯ И МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1.1. ОСНОВЫ КЛАССИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Термины и понятия

Систематика (греч. *systema* – целое, составленное из частей; *systematicos* – упорядоченный) – наука, которая занимается всесторонним описанием микроорганизмов, выяснением степени родства между ними и распределением на соподчиненные группы. Цель систематики – создать классификацию.

Классификация (лат. *classis* – разряд, группа) – разделение множества организмов на основании общих признаков на таксономические группы.

Таксономия (греч. *taxis* – расположение по порядку, закон) – раздел систематики, изучающий принципы и методы распределения (классификации) организмов в иерархическом порядке.

Таксон – группа микроорганизмов, объединенных по определенным свойствам в рамках той или иной таксономической категории.

Идентификация (лат. *identifico* – отождествление) – установление принадлежности изучаемого организма к тому или иному таксону.

Специальный раздел таксономии – **номенклатура** определяет правила присвоения наименований описанным организмам.

В систематике бактерий для наименования микроорганизма используют биномиальную номенклатуру К. Линнея, согласно которой биологическому виду присваивают название, состоящее из двух слов: первое, определяет принадлежность организма к определенному роду, второе – виду. Родовое название микроорганизмов может соответствовать фамилии ученого, открывшего или изучавшего возбудитель (так, род бактерий *Escherichia* был назван в честь немецкого педиатра и бактериолога Теодора Эшериха, впервые его описавшего) или морфологии возбудителя (*Staphylococcus* – род круглых микроорганизмов, располагающихся в виде грозди винограда, *Streptococcus* – род круглых микроорганизмов, располагающихся цепочками). В названии вида микроорганизмов могут быть использованы клинические симптомы инфекции, которую они вызывают (*Salmonella enterica* вызывает энтерит), место их обитания, выявления (*Brucella suis* выделяется из организма свиней), морфология колоний (*Staphylococcus aureus* образует на питательных средах золотистые колонии).

Классификация микроорганизмов

В 1923 г. американское общество бактериологов издало первый международный «Определитель бактерий» под редакцией Д. Берджи (David

Henricks Bergey).

В настоящее время сведения по систематике и идентификации бактерий публикуются раздельно: в виде *определителя* бактерий и *классификатора* бактерий. Определитель используется для идентификации бактерий по характерным для них фенотипическим признакам (окраска по Граму, форма и размер клетки, химический состав клеточной стенки, подвижность, наличие капсулы, спор, тип дыхания, биохимическая активность и др.). Определитель отражает первое направление в систематизации микроорганизмов – их каталогизация на основе ограниченного числа признаков.

Определитель бактерий Берджи делит прокариот на четыре отдела и 35 групп:

1. Gracilicutes – тонкостенные, грамотрицательные (1–16 группы).
2. Firmicutes – толстостенные, грамположительные (бактерии 17–21 группы и актиномицеты 22–29 группы).
3. Tenericutes – лишенные клеточной стенки (30 группа).
4. Mendosicutes – археобактерии, их клеточные стенки лишены пептидогликана, они имеют особенности строения рибосом, мембраны и РНК (31–35 группы).

Классификатор Берджи составлен на основании филогенетического родства микроорганизмов. Микроорганизмы классифицируются на основании стандартных признаков.

Фенотипические признаки:

- 1) морфологические признаки (размеры, форма, наличие жгутиков, капсул, спор и др.);
- 2) тинкториальные признаки (окраска по методам: Грама, Циля–Нильсена, Нейссера, Бурри–Гинса и т.д.);
- 3) культуральные свойства (особенности роста на питательных средах);
- 4) биохимические свойства (способности утилизировать различные субстраты);
- 5) физиологические свойства (тип дыхания, питания);
- 6) антигенная структура;
- 7) чувствительность к бактериофагам.

Генотипические признаки:

- 1) соотношение G+C;
- 2) последовательность оснований в ДНК;
- 3) степень генетического родства с другими микроорганизмами;
- 4) степень гомологии.

Филогенетические признаки:

- 1) секвенирование 16S и 23S рибосомальной РНК (рРНК);
- 2) анализ рРНК-нуклеотидных последовательностей;
- 3) РНК-РНК гибридизация;
- 4) полиморфизм длины фрагментов рестрикции ДНК.

На основе комплекса фенотипических, генотипических и филогенетических признаков микроорганизмы подразделены на доклеточные формы (вирусы, царство или *Regnum Vira*) и клеточные формы, которые включают три домена:

- 1) домен «*Archaea*» – предковые прокариоты или предковые бактерии (патогенных для человека видов нет);
- 2) домен «*Bacteria*» – истинные бактерии (истинные прокариоты) или эубактерии;
- 3) домен «*Eukarya*» – эукариотические клетки. В домен «*Eukarya*» входят: царство грибов (*Regnum Fungi*); царство животных (*Regnum Animalia*) с подцарством простейших (*Protozoa*); царство растений (*Regnum Plantae*). Среди микроорганизмов, входящих в состав 2 и 3 доменов, есть патогенные для человека виды.

Классификация Берджи касается только доменов 1 и 2. Остальные микроорганизмы (вирусы, грибки, простейшие) сведены в самостоятельные классификации. В настоящее время большинство бактериологов отказалось от использования термина «*regnum*» («царство») для обозначения таксона прокариотов. Он применяется в систематике эукариотов (микология, протозоология) и акариотов (вирусология).

В классификации Берджи используются следующие группы или уровни (таксоны):

домен – *Domen* (лат.);

филум – *Phylum* (лат.); в классификации прокариотов для обозначения этого таксона используется термин «филум», а для эукариотов – «тип»;

класс – *Class* (лат.);

порядок – *Ordo* (лат.);

семейство – *Familia* (лат.);

род – *Genus* (лат.);

вид – *Species* (лат.).

Вид – это эволюционно сложившаяся совокупность особей, имеющих общее происхождение, единый генотип, который в стандартных условиях проявляется сходными фенотипическими признаками: морфологическими, физиологическими, биохимическими и др.

Кроме этих таксонов широко используются и другие термины:

штамм – популяция бактерий одного вида, выделенных из какого-либо определенного источника;

клон – популяция бактерий, полученная из одной бактериальной клетки;

подвид, инфравид – популяция бактерий, отличающихся от основного вида по какому-либо признаку или признакам, которые могут быть детализированы как **варианты** (-вары, но не типы), для их обозначения используется только суффикс «-вар», чтобы избежать возможной ошибки – принять «вариант» за «тип», как таксон эукариотов;

морфовары – популяция бактерий, отличающихся от основного вида по морфологическим свойствам;

хемовары – по биохимическим свойствам; серовары – по антигенной структуре;

фаговары – по чувствительности к бактериофагам;

колициновары – по продукции бактериоцинов;

резистенсвары – по устойчивости к антибиотикам;

геновары – по строению части генома;

патовары – по вирулентности;

биовары – по нескольким биологическим свойствам.

Классификация прокариот

Домен «Archaea»: археобактерии не содержат пептидогликан в клеточной стенке. Они имеют особые рибосомы и рибосомные РНК. Термин «археобактерии» появился в 1977 г. Это одна из древних форм жизни, на что указывает приставка «архе». Среди них нет возбудителей инфекций.

Домен «Bacteria» (эубактерии) представлен:

– бактериями с тонкой клеточной стенкой, грамотрицательные – *gracilicutes*; особенности: большинство грамотрицательных бактерий объединены в тип протеобактерии, основанный на сходстве по рибосомной РНК («*Proteobacteria*» – по имени греческого бога Протеуса, принимавшего разнообразные облики). Они появились от общего фотосинтетического предка;

– бактериями с толстой клеточной стенкой, грамположительные – *firmicutes*; особенности: грамположительные бактерии, согласно изученным последовательностям рибосомной РНК, являются отдельной филогенетической группой с двумя большими подотделами – с высоким и низким соотношением G+C (генетическое сходство). Как и протеобактерии, эта группа метаболически разнообразная;

– бактериями без клеточной стенки – *tenericutes* (класс *Mollicutes* – микоплазмы); особенности: отсутствует клеточная стенка, клетки окружены ЦПМ, окрашивание по Граму отрицательное, клетки плеоморфные, округлые, размножаются бинарным делением, почкованием, фрагментацией. Характерно образование мелких, вырастающих в агар колоний.

В домен «Bacteria» входит 26 филумов.

1.2. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Всем бактериям присущи определенная форма и размеры, которые варьируют в широких пределах – от 0,1–0,15 (микоплазмы) до 10–15 мкм (кlostридии).

По морфологии различают *кокки* (шаровидные), *палочковидные* (цилиндрические), *извитые* (спиралевидные) и *нитевидные* формы бактерий.

Кокки (в зависимости от взаиморасположения в поле зрения или относительно друг друга) подразделяют на следующие группы:

Микрококки делятся в одной плоскости, имеют правильную округлую форму, располагаются одиночно и беспорядочно (рис. 1 а).

Диплококки делятся в одной плоскости с образованием пар клеток, имеющих бобовидную (*гонококки*, *менингококки*) или ланцетовидную форму (*пневмококки*) (рис. 1 б).

Стрептококки (от греч. *streptos* – цепочка) делятся в одной плоскости и в мазке располагаются цепочками (*гноеродные стрептококки*) (рис. 1 в).

Тетракокки имеют правильную округлую форму, делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием тетрад (рис. 1 г).

Сарцины делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием пакетов (тюков), количество клеток в которых может быть различным (рис. 1 д).

Стафилококки (от греч. *staphyle* – виноградная гроздь) делятся в нескольких плоскостях, имеют правильную округлую форму и располагаются неправильными скоплениями, которые напоминают гроздь винограда (рис. 1 е).

Палочки (цилиндрические) микроорганизмы подразделяются на:

- палочки, не образующие споры;
- палочки, образующие споры: *бациллы* – спора небольшая, не изменяет форму бактерии (возбудитель сибирской язвы) и *кlostридии* – спора крупная, превышает диаметр бактериальной клетки, они напоминают «веретено» или «барабанную палочку» (возбудитель столбняка, газовой гангрены, ботулизма).

Палочковидные микроорганизмы имеют различные размеры; концы палочек могут быть закругленными (*кишечная палочка*, рис. 2 а), заостренными (*фузобактерии*), обрезанными или обрубленными (*возбудитель сибирской язвы*, рис. 2 б), с булабовидными утолщениями на концах (*коринебактерии* – *возбудитель дифтерии*, рис. 2 в) некоторые палочки имеют овоидную (яйцевидную) форму – коккобактерии (*возбудитель коклюша*, рис. 2 г).

По взаимному расположению их делят на следующие группы:

Монобактерии располагаются беспорядочно, одиночно, к этой группе относится большинство палочковидных форм (*кишечная палочка*, рис. 2 а).

Диплобактерии располагаются попарно, полюсами друг к другу (*клебсиллы*) или под углом друг к другу (возбудитель дифтерии, рис. 2 в).

Стрептобактерии располагаются цепочками (возбудитель сибирской язвы, рис. 2 б).

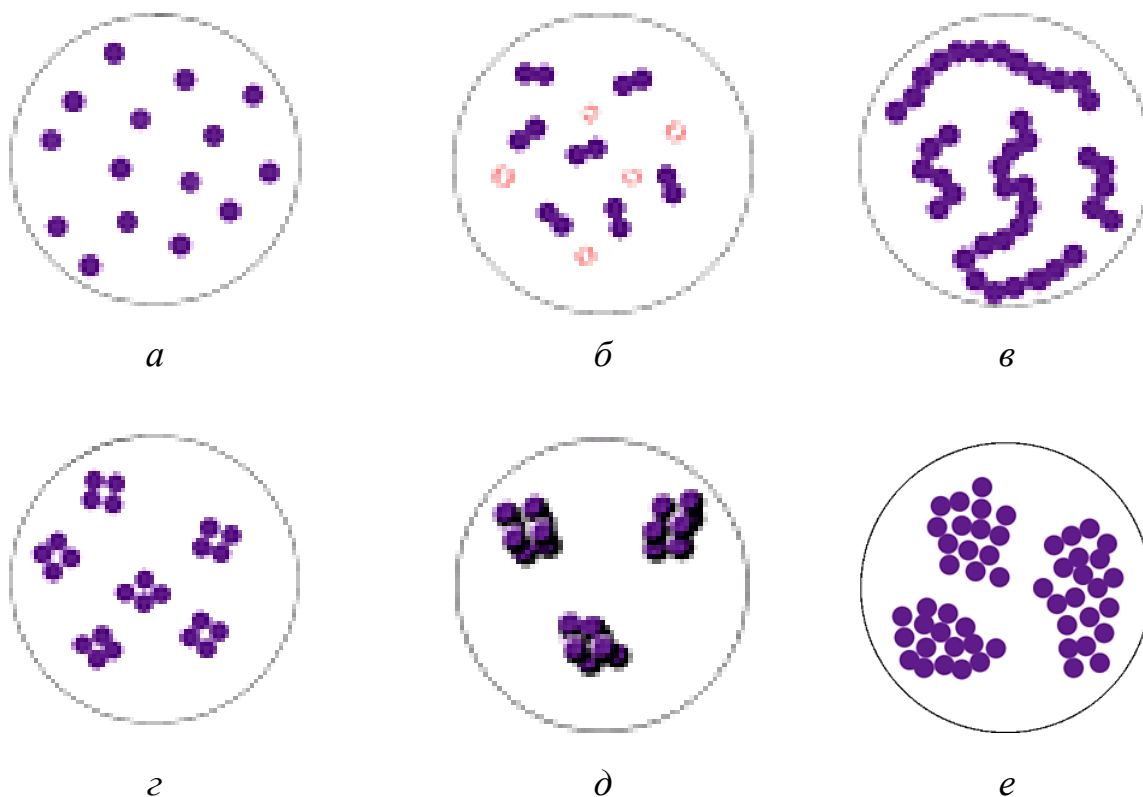


Рис. 1. Кокки: а – микрококки; б – диплококки; в – стрептококки; г – тетракокки; д – сарцины; е – стафилококки

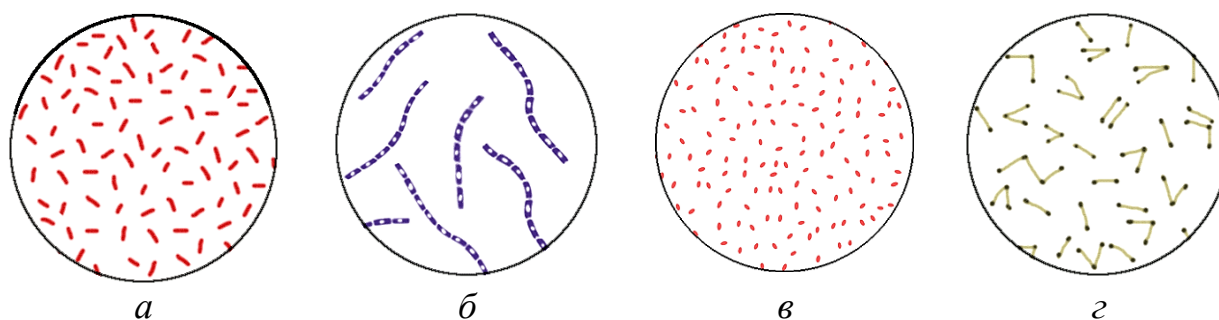


Рис. 2. Палочковидные микроорганизмы: а – кишечная палочка; б – возбудитель сибирской язвы; в – возбудитель коклюша; г – возбудитель дифтерии

Извитые (спиралевидные) микроорганизмы различаются по количеству и характеру завитков и делятся на:

Вибрионы имеют один изгиб, напоминают запятую (холерный вибрион, рис. 3 а).

Спириллы имеют форму спиралей с двумя–тремя завитками (кампилобактерии, рис. 3 б).

Спирохеты имеют более трех завитков (трепонемы, боррелии, лептоспиры, рис. 3 в).

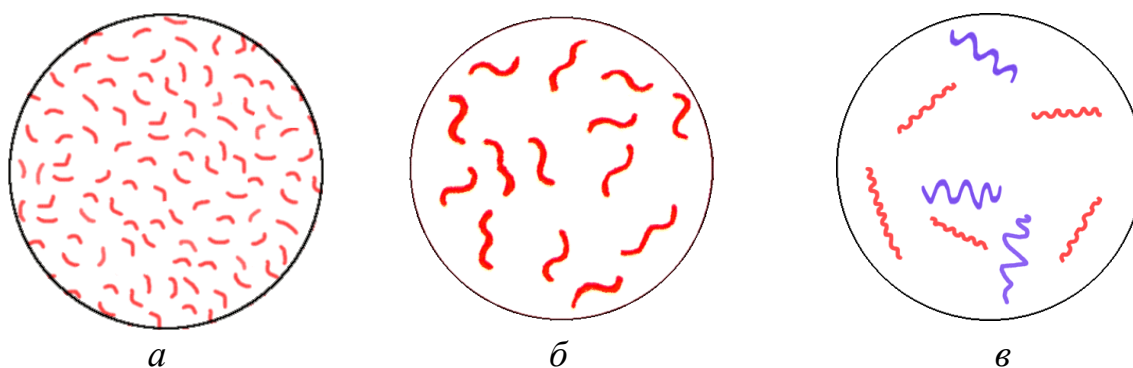


Рис. 3. Извитые микроорганизмы: а – вибрионы, б – спириллы, в – спирохеты

Нитевидные микроорганизмов имеют формы нитей (актиномицеты, рис. 4).



Рис. 4. Нитевидные микроорганизмы

1.3. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

В связи с малыми размерами микроорганизмов (не более 1–15 мкм) изучение их морфологии возможно только с помощью микроскопов (от лат. *micros* – малый и *scopien* – рассматривать, наблюдать), обеспечивающих достаточное увеличение и обладающих высокой разрешающей способностью, (минимальное расстояние, на котором находятся две точки, демонстрируемые микроскопом отдельно).

Световая микроскопия

Световая микроскопия осуществляется с помощью светового микроскопа, имеющего механическую и оптическую системы. Механическая система включает: штатив, тубус, предметный столик, макрометрический и микрометрический винты. Основной частью оптической системы является объектив. На оправе объективов обозначается увеличение: 8, 10, 20, 40, 90 (рис. 5).

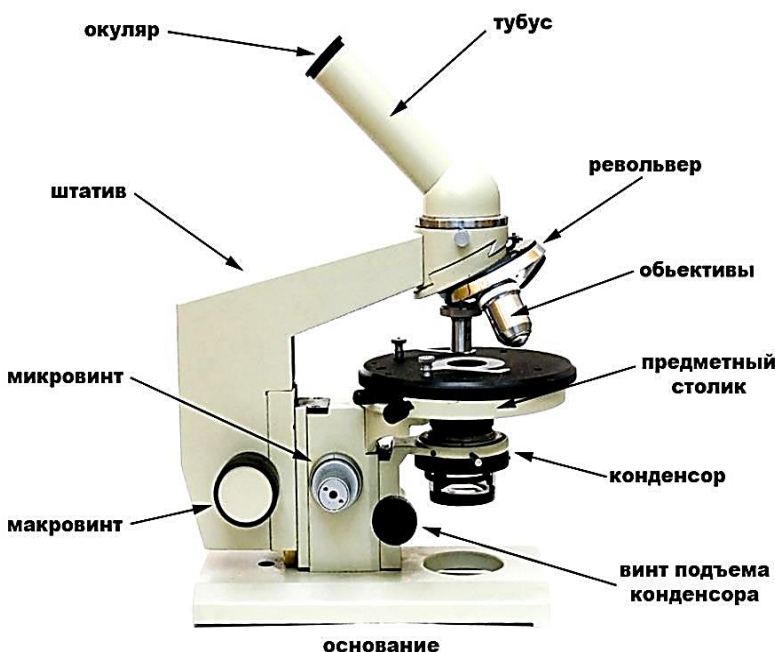


Рис. 5. Строение светового микроскопа

При исследовании микроорганизмов применяется специальный иммерсионный объектив, который погружают в каплю иммерсионного масла, нанесенного на препарат. Иммерсионное масло имеет такой же коэффициент преломления лучей света, как и стекло, и этим достигается наименьшее рассеивание световых лучей (рис. 6).

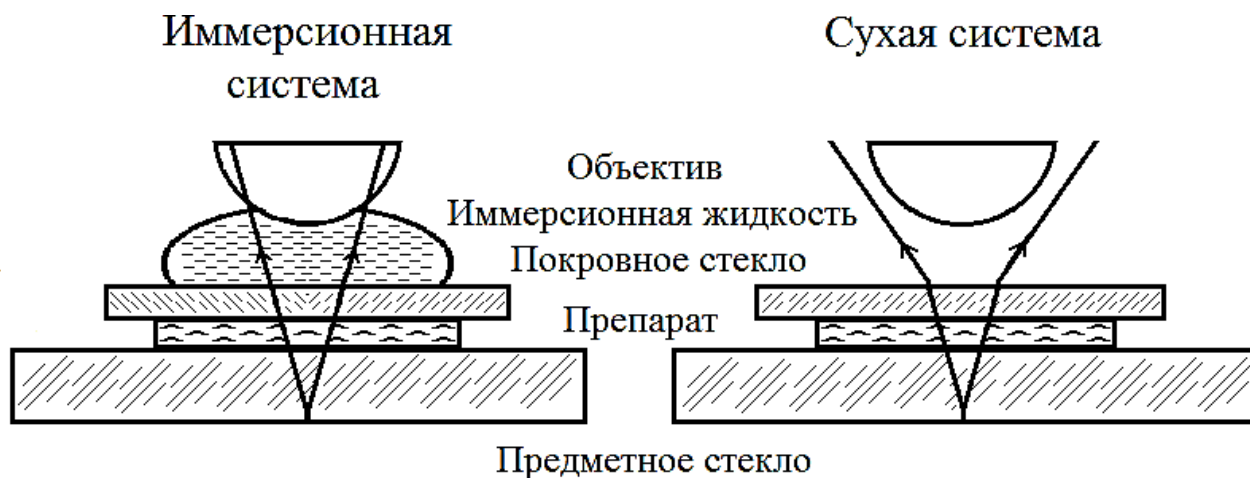


Рис. 6. Схема иммерсионной системы микроскопа

Изображение, получаемое в объективе, увеличивает окуляр, состоящий из двух линз. Общее увеличение микроскопа определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра. Качество микроскопа зависит не от степени увеличения, а от его разрешающей способности. Разрешающая способность обычных светловольных микроскопов с иммерсионной системой равна 0,2 мкм.

Темнопольная микроскопия

Микроскопия в темном поле зрения основана на следующем принципе: лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя, при этом поле зрения остается темным, а от объектов, находящихся в поле зрения, лучи отражаются и объект становится светящимся (рис. 7). Это достигается с помощью специального конденсора (параболоид), или обычного конденсора, прикрытого в центре кружком черной бумаги.

Для темнопольной микроскопии используют нативные (живые) препараты и их готовят по типу раздавленной капли. Исследуемый материал (бактериальная культура в физиологическом растворе) наносят на предметное стекло, которое покрывают покровным. Темнопольная микроскопия используется для изучения живых неокрашенных микроорганизмов.

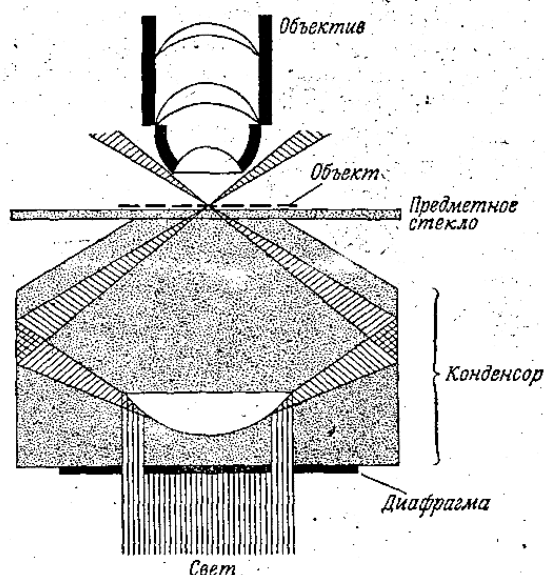


Рис. 7. Схема микроскопа для наблюдения в темном поле (Стейниер Р. и др., 1979)

Фазовоконтрастная микроскопия

При прохождении пучка света через неокрашенный объект изменяется лишь фаза колебания световой волны, что не воспринимается человеческим глазом. Чтобы изображение стало контрастным необходимо превратить фазовые изменения световой волны в видимые амплитудные. Это достигается с помощью фазовоконтрастного конденсора и фазового объектива (рис. 8).

Фазовоконтрастный конденсор представляет собой обычный объектив, который снабжен фазовой пластинкой с нанесенным слоем солей редкоземельных элементов. Изображение кольцевой диафрагмы совпадает с кольцом фазовой пластинки объектива.

Фазовоконтрастная микроскопия значительно повышает контрастность объекта и используется для изучения нативных препаратов.

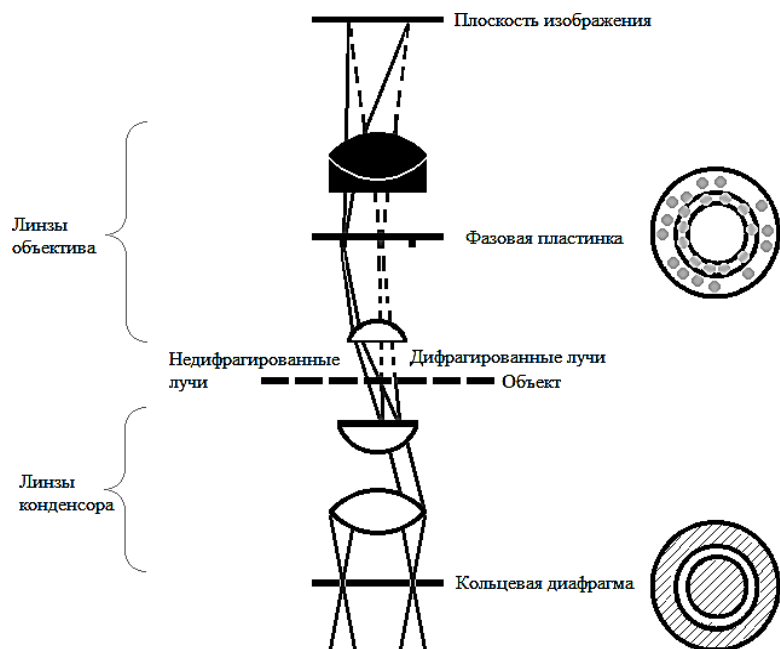


Рис. 8. Схема фазово-контрастного микроскопа

Люминесцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых веществ под влиянием падающего на них света испускать лучи с другой (обычно большей) длиной волны (флюоресцировать). Такие вещества называют флюорохромами (акридиновый желтый, ФИТЦ, родамин и др.). Объект, обработанный флюорохромом, при освещении ультрафиолетовыми лучами приобретает яркий цвет в темном поле зрения.

Основной частью люминесцентного микроскопа является осветитель, имеющий лампу ультрафиолетового цвета и систему фильтров к нему (рис. 9). Очень важно использование нефлюоресцентного иммерсионного масла.

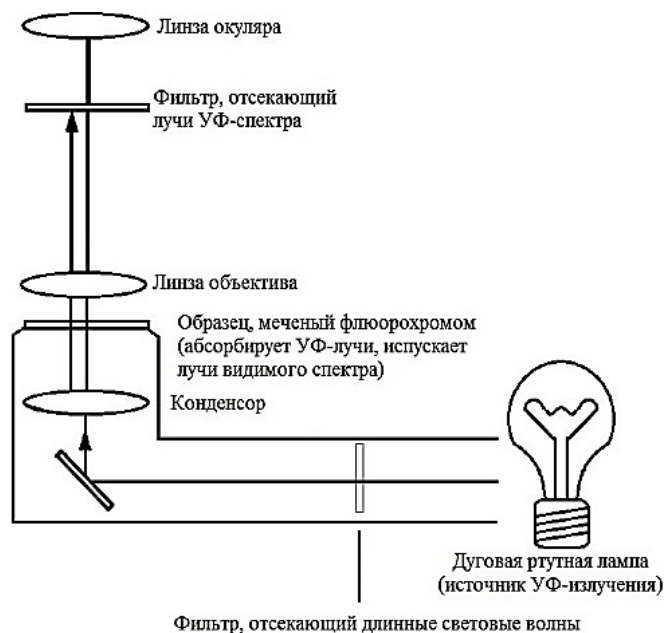


Рис. 9. Схема люминесцентной микроскопии

Люминесцентная микроскопия в практической микробиологии используется для индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний с помощью реакции иммунофлюоресценции.

Электронная микроскопия

Возможности оптических микроскопов ограничены слишком большой длиной волны видимого света. Объекты, размеры которых меньше 0,2 мкм, находятся за пределами разрешающей способности светового микроскопа. В электронном микроскопе вместо световых волн используются электронные лучи, обладающие чрезвычайно малой длиной волны и высокой разрешающей способностью.

С помощью электронной микроскопии можно обнаружить самые мелкие структуры, получить увеличение до 200 000 и увидеть объекты размером 0,002 мкм. В настоящее время существует несколько видов электронных микроскопов.

Обычный просвечивающий (трансмиссионный электронный микроскоп – ОПЭМ) во многом подобен световому микроскопу, но только для освещения образцов в нем используется не свет, а пучок электронов (рис. 10 а). Источником электронов обычно служит нагреваемый катод из вольфрама или гексаборида лантана (1). Катод электрически изолирован от остальной части прибора, и электроны ускоряются сильным электрическим полем с помощью специальной ускоряющей системы (2). Для этого катод поддерживается под потенциалом порядка 100000В относительно других электродов. Для уменьшения рассеивания электронов в колонне микроскопа создается вакуум. Пучок электронов с помощью конденсорных магнитных линз (4) фокусируется на образце (5). Диафрагма (3) определяет ширину пучка в плоскости объекта. Образец помещается в магнитном поле объективной линзы с большой оптической силой (6), которая создает увеличенное изображение объекта (увеличение порядка 100). Аберрации объективной линзы ограничиваются ее диафрагмой (7). Проекционная линза (8) проецирует изображение на экран или пленку (9) и может создавать дополнительное увеличение.

В растровом электронном микроскопе применяются электронные линзы для фокусировки электронного пучка в пятно очень малых размеров (рис. 10 б). Это пятно непрерывно обегает некоторый участок образца аналогично лучу, оббегающему экран телевизионной трубки. Для растрового микроскопа требуется высокоинтенсивный источник электронов (1). Для этого вблизи поверхности заостренной вольфрамовой проволоочки малого диаметра создается сильное электрическое поле, вытягивающее из нее электроны без нагрева. Яркость такого источника почти в 10000 раз больше, чем источника с нагреваемой вольфрамовой проволокой. Электроны дополнительно ускоря-

ются с помощью ускоряющей системы (2) и фокусируются в пятно малого диаметра магнитной линзой (3). С помощью отклоняющих магнитных катушек (4) электронный пучок обегает весь участок образца (5). Детектор отраженных электронов (6), располагающийся выше образца, регистрирует отраженные электроны. При этом контраст связан в основном с углом падения электронов на образец, и на изображении хорошо выявляется поверхностная структура (сканирующая микроскопия). Детекторы, расположенные под образцом, используются для растровой просвечивающей микроскопии для исследования тонких образцов. Кольцевой детектор (7) регистрирует электроны, рассеянные на углы более нескольких градусов. Электроны, не претерпевшие рассеяния в образце, а также электроны, замедлившиеся в результате взаимодействия с образцом, проходят в отверстие кольцевого детектора. Энергетический анализатор (8), расположенный под кольцевым детектором, позволяет измерить энергию, потерянную электронами при рассеянии, и вследствие этого получить важную информацию об образце.

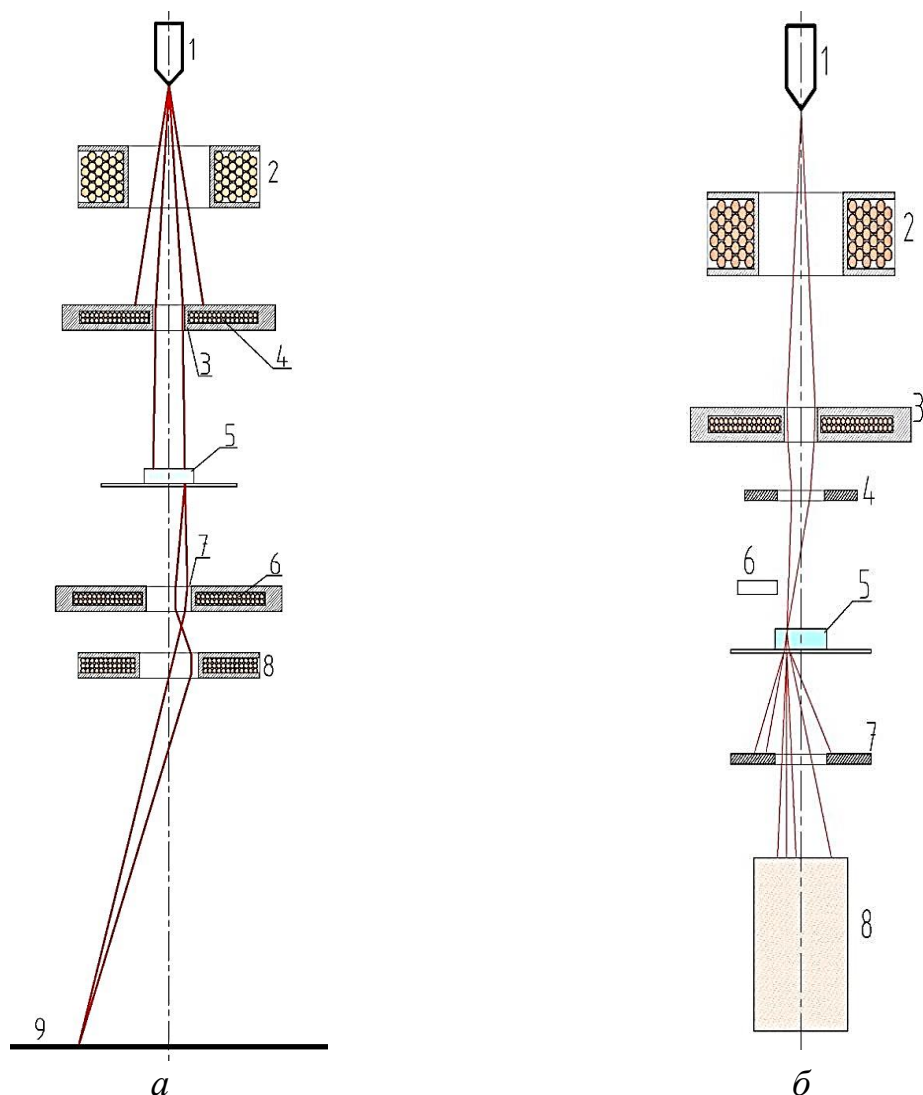


Рис. 10. Схема просвечивающего (а) и растрового (б) электронного микроскопа

1.4. СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Бактерии являются прокариотами и существенно отличаются от клеток растений и животных (эукариотов). Основные отличия клеток прокариот и эукариот представлены в таблице 1.

Таблица 1

Отличия прокариотических и эукариотических клеток

Признак	Прокариоты	Эукариоты
Оформленное ядро	—	+
Размеры клеток	0,2–2,0 мкм	>2,0 мкм
Мембранные цитоплазматические органеллы: митохондрии, ЭПР, лизосомы, хлоропласты, аппарат Гольджи	—	+
Оболочки клетки	Клеточная стенка состоит из муреина	Основной компонент клеточной стенки целлюлоза (у растений) или хитин (у грибов). У клеток животных клеточной стенки нет
Локализация рибосом	Рассеяны в цитоплазме	Прикреплены к ЭПР
Константа седиментации рибосом	70 S	80 S
Структура жгутика	Состоят из одной фибриллы, построенной из белка флагеллина	Состоят из микротрубочек, собранных в группы: 9+2
Деление клеток	Бинарное деление	Митоз или мейоз
Число хромосом	1	Обычно >1
Хромосома	Кольцевая	Линейная

Бактерии относятся к одноклеточным организмам и состоят из клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, цитоплазмы, нуклеоида (генофора), рибосом и мезосом – *обязательных компонентов* бактериальной клетки.

Некоторые бактерии могут иметь жгутики, капсулу, споры, пили, включения, плазмиды – *необязательные компоненты* бактериальной клетки (рис. 11).

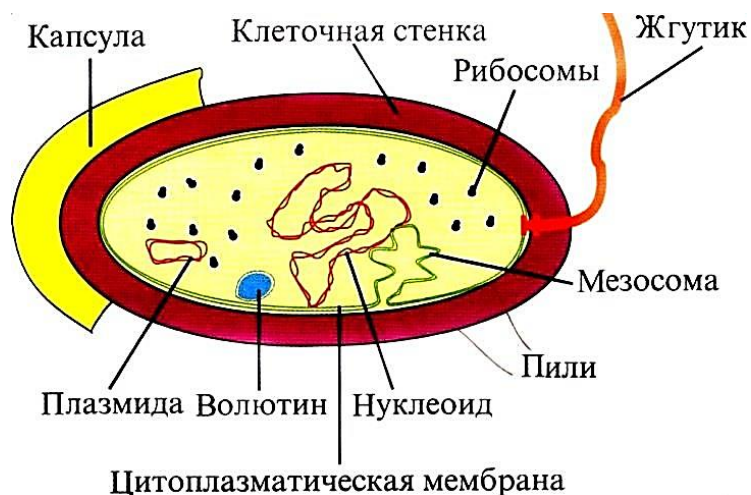


Рис. 11. Схематическое строение бактериальной клетки

Клеточная стенка

Клеточная стенка представляет собой внешнюю структуру бактерий толщиной 30–35 нм. Главным компонентом клеточной стенки является пептидогликан (муреин). Пептидогликан является структурным полимером, состоящим из чередующихся субъединиц N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных гликозидными связями. Параллельно расположенные полисахаридные (гликановые) цепи скреплены между собой поперечными пептидными мостиками (рис. 12).

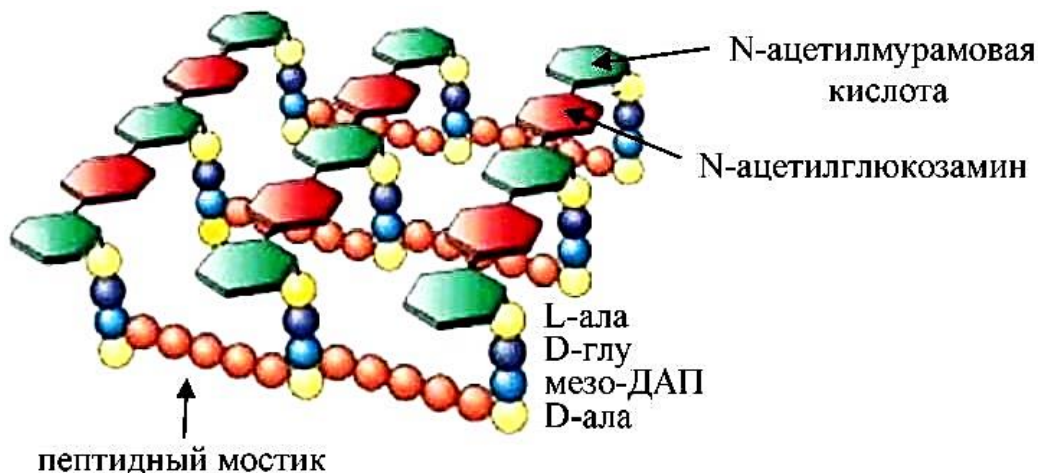


Рис. 12. Схематическое изображение однослойной структуры пептидогликана (<https://scask.ru>)

Количественное содержание пептидогликана влияет на способность бактерий окрашиваться по Граму. Бактерии, имеющие значительную толщину муреинового слоя (90–95%), стойко окрашиваются генцианвиолетом в фиолетовый цвет и носят название *грамположительных бактерий*. *Грамотрицательные бактерии* с тонким слоем пептидогликана (5–10%) в клеточной стенке после действия спирта утрачивают генцианвиолет и дополнительно

окрашиваются фуксином в красный цвет. Клеточные стенки у грамположительных и грамотрицательных прокариот различаются как по химическому составу (табл. 2), так и по ультраструктуре.

Таблица 2

Химический состав клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных прокариот (по Э. Роуз, 1971; Дж. Фрир, М. Солтон, 1971)

Компоненты клеточной стенки	Грамположительные прокариоты	Грамотрицательные прокариоты	
		внутренний слой (пептидогликановый)	внешний слой (наружная клеточная мембрана)
Пептидогликан	+	+	-
Тейхоевые кислоты	+	-	-
Полисахариды	+	-	+
Белки	±	-	+
Липиды	±	-	+
Липополисахариды	-	-	+
Липопротеиды	-	±	+

Клеточная стенка грамположительных бактерий под электронным микроскопом выглядит как однородный плотный слой, толщина которого колеблется от 20 до 80 нм. Пептидогликан в клеточной стенке грамположительных бактерий составляет 50–90% ее сухой массы. Кроме пептидогликана здесь содержатся тейхоевые кислоты (ТК), в меньшем количестве липиды, полисахариды, белки.

ТК (полифосфатные соединения) делят на 2 класса:

- 1) стеночные, связанные с пептидогликаном клеточной стенки;
- 2) мембранные (липотейхоевые), соединенные с гликолипидом цитоплазматической мембраны.

ТК могут связываться с клеточными мембранами и осуществлять процесс адгезии, необходимый для бактериальной колонизации, являющейся первой стадией большинства инфекций.

На поверхности клеточной стенки грамположительных бактерий могут присутствовать белковые молекулы – поверхностные, минорные белки, не образующие структур определенной формы (белок А стафилококков, М-протеин стрептококков и др.). Они характеризуются высокой биологической активностью: угнетают фагоцитоз, обладают токсическими свойствами, способ-

ствуют адгезии бактерий на клетках (рис. 13). В клеточной стенке так же присутствуют мажорные белки-порины, образующие диффузные поры, через которые в клетку могут проникать мелкие гидрофильные молекулы.

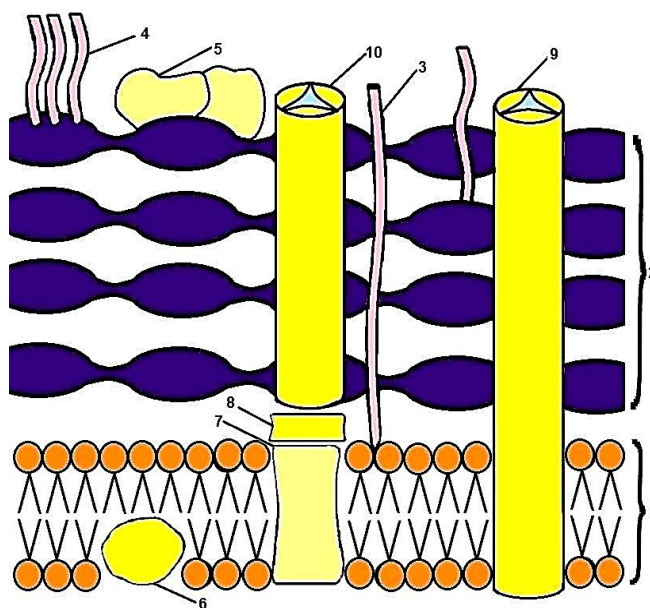


Рис. 13. Строение клеточной стенки грамположительных бактерий.
1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – слой пептидогликана; 3 – липотейхоевые (мембранные) кислоты; 4 – тейхоевые (стеночные) кислоты; 5 – поверхностный белок; 6 – минорный белок; 7 – мажорный (интегральный) белок; 8 – вставочный белок; 9, 10 – порины

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, толщина ее составляет 14–17 нм (рис. 14). Внутренний слой клеточной стенки представлен пептидогликаном, на долю которого приходится 1–10% ее сухой массы. Грамотрицательные прокариоты имеют наружную мембрану (располагающуюся над слоем пептидогликана), в состав которой входят липиды (22% сухой массы клеточной стенки), белки, полисахариды, липопротеиды. Наружная мембрана выполняет не только механические, но и физиологические функции. В ней находятся мажорные (трансмембранные) белки, которые насквозь пронизывают мембрану. Они представляют собой заполненные водой каналы или гидрофильные поры, их еще называют поринами. Существует несколько различных типов поринов, которые осуществляют транспорт через мембрану гидрофильных низкомолекулярных веществ. Одной из отличительных особенностей грамотрицательных бактерий является отсутствие в их клеточной стенке тейхоевых кислот.

В верхнем слое наружной мембраны расположены *липополисахариды (ЛПС)* – гетерополимеры, обладающие разнообразной биологической активностью. ЛПС наружной мембраны состоит из трех фрагментов:

- липид А – консервативной структуры, практически одинаковой у грамотрицательных бактерий;

- ядра или стержневой части (лат. *core* – ядро), относительно консервативной олигосахаридной структуры;
- высоковариабельной *O-специфической цепи* полисахарида, образованной повторяющимися идентичными олигосахаридными последовательностями.

ЛПС «заякорен» в наружной мембране липидом А, обуславливающим токсичность. Разрушение бактерий антибиотиками приводит к освобождению липида А (эндотоксина), что может вызвать у больного инфекционно-токсичный (эндотоксиновый) шок.

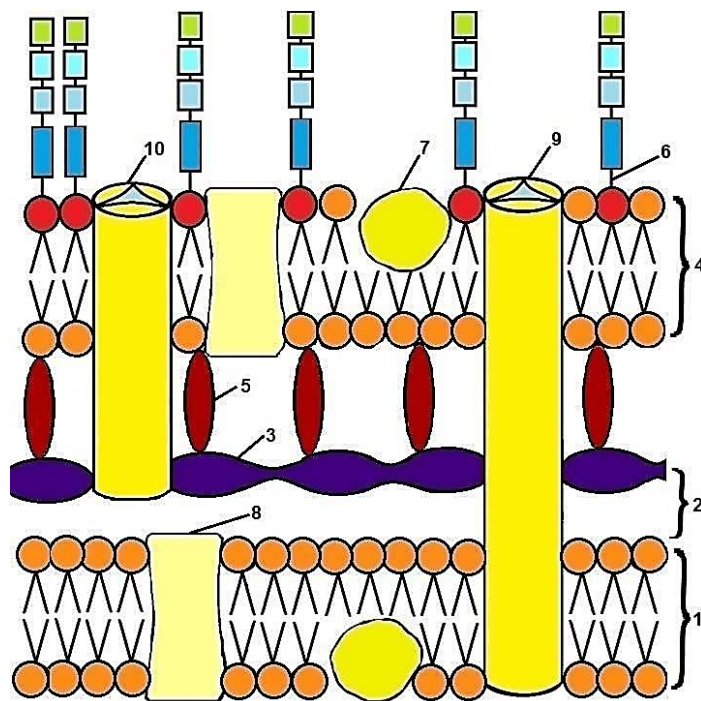


Рис. 14. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – периплазматическое пространство;
3 – слой пептидогликана; 4 – наружная мембрана; 5 – липопrotein; 6 – липополисахарид;
7 – минорный белок; 8 – мажорный (интегральный) белок; 9, 10 – порины

Метод окраски по Граму является важным дифференциальным методом. Все бактерии по отношению к окраске по Граму делятся на грамположительные – темно-фиолетового цвета и грамотрицательные – красного. Способность окрашиваться в тот или иной цвет зависит от строения их клеточной стенки. У грамположительных бактерий, имеющих значительную толщину муреинового слоя (90–95%), образуется прочное соединение с комплексом генцианвиолет-йод, которое не разрушается при кратковременном действии спирта. Грамотрицательные бактерии с тонким слоем пептидогликана (5–10%) в клеточной стенке образуют с этим же фиолетовым комплексом (генцианвиолет-йод) легко разрушающееся под действием спирта соединение. Они легко обесцвечиваются под действием спирта. Фуксин затем докрашивает грамотрицательные микроорганизмы в красный цвет.

Метод Грама

1. На мазок кладут фильтровальную бумагу и наливают карболовый раствор генцианового фиолетового на 1–2 мин.
2. Снимают бумагу, сливают краситель и, не промывая мазок водой, наливают раствор Люголя на 1 мин.
3. Сливают раствор Люголя и обесцвечивают препарат в 96° спирте в течение 8–10 с.
4. Промывают водой.
5. Красят 1–2 мин водным раствором фуксина.
6. Промывают водой и высушивают.
7. Микроскопируют.

В результате окраски грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные – в красный.

Клеточная стенка у бактерий выполняет, в основном, формообразующую и защитную функции, обеспечивает ригидность, формирует капсулу, определяет способность клеток к адсорбции фагов. Через клеточную стенку в клетку поступают питательные вещества и выделяются продукты обмена.

Для микобактерий и нокардий характерна усложненная структура клеточной стенки. Основу у них, также, как и у грамположительных бактерий, составляет муреиновый каркас, однако последний связан с липидами, жирными кислотами (миколовая, фтиоидная и др.), восками и полисахаридами. Эти компоненты придают клеточной поверхности гидрофобность, что делает клетку, с одной стороны, устойчивой к действию различных химических веществ (такие бактерии называются *кислотоустойчивыми*), с другой стороны, тормозит обмен клетки с окружающей средой и замедляет ее рост. Кислотоустойчивость микобактерий является важным дифференциальным признаком, для ее определения используют окраску по методу Циля–Нильсена.

Метод Циля–Нильсена

1. На фиксированный мазок помещают фильтровальную бумагу и наливают карболовый фуксин Циля и осторожно нагревают на горелке до появления паров. Операцию повторяют 2–3 раза.
2. Когда препарат остынет, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и промывают препарат водой.
3. Препарат погружают 2–3 раза в стакан с 5% серной кислотой на 1–2 с.
4. Тщательно промывают препарат водой и докрашивают щелочным метиленовым синим 3–5 мин.
5. Промывают водой и подсушивают.

Кислотоустойчивые бактерии не обесцвечиваются серной кислотой и сохраняют красный цвет, некислотоустойчивые теряют краситель и докрашиваются метиленовым синим в голубой цвет.

При нарушении синтеза клеточной стенки бактерий под влиянием лизоцима, пенициллина, защитных факторов организма и др. образуются клетки с

измененной (часто шаровидной) формой: *протопласты* – бактерии, полностью лишенные клеточной стенки; *сферопласты* – бактерии, с частично сохранившейся клеточной стенкой. После удаления ингибитора клеточной стенки такие измененные бактерии могут реверсировать, т.е. при обретать полноценную клеточную стенку и восстанавливать исходную форму. Бактерии, полностью или частично утратившие клеточную стенку, но сохранившие способность к размножению, получили название *L-форм* в честь института им. Д. Листера (Англия), в котором они были впервые выделены. Независимо от формы исходной клетки (кокк и палочки) L-формы представляют собой сферические образования разных размеров. Могут возникать в естественных условиях в организме человека в результате длительного лечения антибиотиками.

Различают нестабильные и стабильные L-формы бактерий. Первые способны к реверсии в исходный вид при устранении причины, вызвавшей их образование. Вторые, как правило, не способны к реверсии. L-формы разных бактерий играют существенную роль в патогенезе многих инфекционных заболеваний.

Цитоплазматическая мембрана

Цитоплазма бактериальной клетки ограничена от клеточной стенки тонкой полупроницаемой структурой толщиной 5–10 нм, называемой цитоплазматической мембраной (ЦПМ). ЦПМ состоит из двойного слоя фосфолипидов, пронизанных белковыми молекулами (рис. 15).

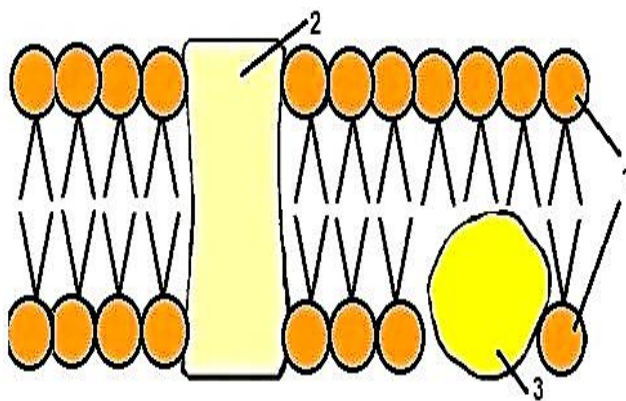


Рис. 15. Схема строения цитоплазматической мембраны:
1 – слой фосфолипидов; 2 – мажорный белок; 3 – минорный белок

Цитоплазматическая мембрана выполняет жизненно важные функции, нарушение которых приводит бактериальную клетку к гибели. К ним относятся, прежде всего, регуляция поступления в клетку метаболитов и ионов, участие в метаболизме, репликации ДНК, а у ряда бактерий и в спорообразовании. ЦПМ связана с синтезом клеточной стенки и капсулы за счет наличия

в ней специфических переносчиков для образующих их молекул. В цитоплазматической мембране закреплены жгутики. Энергетическое обеспечение работы жгутиков связано с цитоплазматической мембраной.

Между клеточной стенкой и ЦПМ располагается периплазматическое пространство (периплазма). Периплазма может включать до 20% всей находящейся в клетке воды, в ней локализуются некоторые ферменты (фосфатазы, пермеазы, нуклеазы и др.) и транспортные белки – переносчики соответствующих субстратов.

Цитоплазма

Содержимое клетки, окруженное ЦПМ, составляет цитоплазму бактерий, представляющую собой сложную коллоидную систему, состоящую из воды (около 75%), минеральных соединений, белков, РНК и ДНК.

Часть цитоплазмы, которая имеет гомогенную коллоидную консистенцию и содержит растворимые РНК, ферменты, субстраты и продукты обмена веществ, обозначается как цитозоль. Другая часть цитоплазмы представлена различными структурными элементами: мезосомами, рибосомами, включениями, нуклеоидом, плазмидами.

Рибосомы

Рибосомы – рибонуклеопротеидные гранулы диаметром 15–20 нм. В рибосомах находится примерно 80–85% всей бактериальной РНК. Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70S. Они построены из двух частей: 30S (малая субъединица) и 50S (большая субъединица) (рис. 16). Рибосомы служат местом синтеза белка. Перед началом синтеза белка происходит объединение большой и малой субъединиц в одну – 70S. В зависимости от интенсивности роста бактериальная клетка может содержать от 5000 до 50000 рибосом, число их тем больше, чем больше скорость роста клетки.

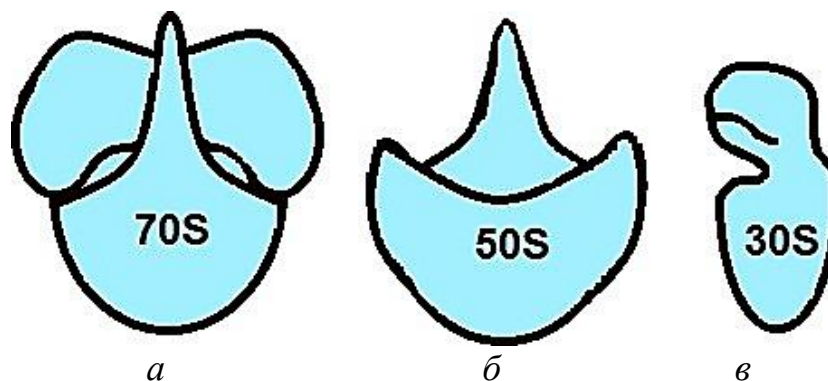


Рис. 16. Рибосомы прокариотической клетки:

а – полноценная рибосома 70S; *б* – большая субъединица 50S; *в* – малая субъединица 30S

Мезосомы

Мезосомы представляют собой мембранные структуры, образуемые при вращении и закручивании ЦПМ внутрь бактериальной клетки. Мезосомы бактерий разнообразны по форме, размерам и локализации в клетке. Выделяют три основных типа мезосом: ламеллярные (пластинчатые), везикулярные (имеющие форму пузырьков) и тубулярные (трубчатые) (рис. 17). В клетках некоторых бактерий обнаруживаются также мезосомы смешанного типа: состоящие из ламелл, трубочек и пузырьков. По расположению в клетке различают: мезосомы, образующиеся в зоне клеточного деления и формирования клеточной перегородки (септальные мезосомы) и мезосомы, сформированные в результате инвагинации периферических участков ЦПМ (латеральные мезосомы).

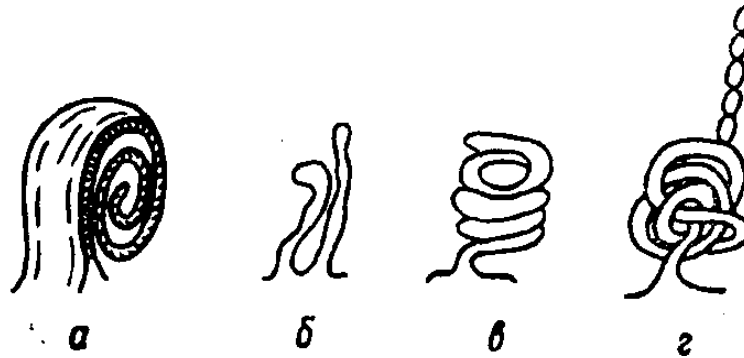


Рис. 17. Типы строения истинных мезосом:

а — ламеллярный; б–г — тубулярные типы (Бирюзова, Поглазова, 1977)

Предполагается, что мезосомы полифункциональны, содержат различные ферментные системы и играют определенную роль в энергетическом метаболизме. Они являются сайтом для формирования клеточной стенки бактерий и прикрепления нуклеоида в процессе репликации ДНК, участвуют в делении клетки, обеспечивая энергией синтез клеточной стенки, принимают участие в секреции веществ, спорообразовании, т.е. в процессах с высокой затратой энергии.

Нуклеоид (генофор)

Нуклеоид (генофор) – ядерный аппарат бактерий. Нуклеоид является эквивалентом ядра эукариот, хотя отличается от него по своей структуре и химическому составу. Он лишен ядерной мембраны, ядрышка, и не делится митозом. В составе нуклеоида отсутствуют основные белки – гистоны. По аналогии с хромосомами эукариот бактериальная ДНК часто обозначается как хромосома. При этом следует помнить, что она представлена в клетке в единственном числе, поскольку бактерии являются гаплоидными. Перед делением

клетки нуклеоид удваивается (рис. 18).

С ДНК связано небольшое количество РНК и РНК-полимеразы. ДНК свернуто вокруг центрального стержня, состоящего из РНК и представляет собой высокоупорядоченную компактную структуру. Хромосомы большинства прокариот имеют молекулярную массу в пределах $1-3 \times 10^9$, константу седиментации 1300–2000 S. Молекула ДНК включает $1,6 \times 10^7$ нуклеотидных пар.

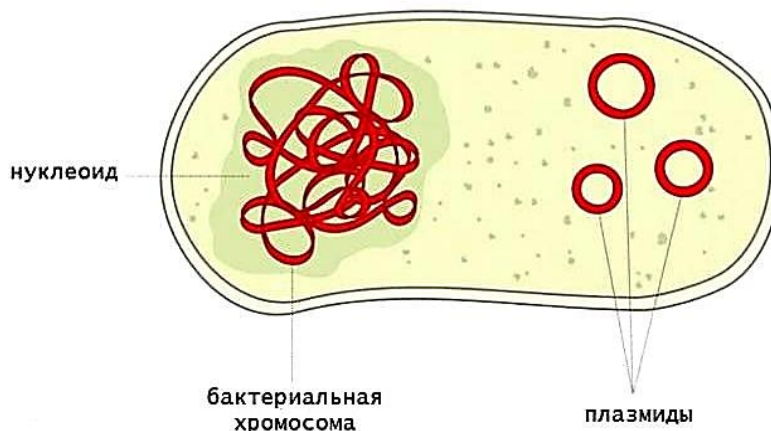


Рис. 18. Нуклеоид и плазмиды бактерий (<https://news4auto.ru>)

В генофоре бактерий содержится основная наследственная информация, которая реализуется в синтезе специфических белковых молекул. Каждому белку соответствует свой ген. Бактериальная хромосома содержит до 4000 отдельных генов. С ДНК бактериальной клетки связаны системы репликации, репарации, транскрипции и трансляции.

Нуклеоид в прокариотной клетке может быть выявлен в окрашенных препаратах с помощью светового или фазово-контрастного микроскопа. Нуклеоид выявляется после окраски специфическими для ДНК методами: по Фельгену или по Романовскому–Гимзе.

Плазмиды

Генетическая система бактерий представлена ядерными и внеядерными структурами. Кроме нуклеоида в бактериальной клетке имеются внехромосомные факторы наследственности – плазмиды. Они представляют собой замкнутые в кольца двухцепочечные ДНК, состоящие из 1500–40 000 пар нуклеотидов и содержащие до 100 генов. В них также закодирована наследственная информация. Однако она не является жизненно необходимой для бактериальной клетки.

Плазмиды могут существовать в клетке и в интегрированном состоянии с бактериальной хромосомой, сохраняя при этом способность переходить к автономии.

Плазмиды выполняют регуляторные и кодирующие функции. Первые

направлены на компенсацию метаболических дефектов, вторые вносят в бактерию информацию о новых признаках. Как составляющая часть генетического материала бактерии плазмиды играют важную роль в ее жизнедеятельности, определяя такие свойства, как способность продуцировать экзотоксины, ферменты или бактериоцины, устойчивость к лекарственным препаратам и т.д.

Удвоение ДНК некоторых плазмид индуцирует деление бактерий, т.е. увеличивает их «плодовитость». Такие плазмиды обозначают как F-плазмиды или F-факторы (от англ. *fertility* – плодовитость). Плазмиды, детерминирующие устойчивость к лекарственным препаратам, называются R-плазмидами или R-факторами (от англ. *resistance* – устойчивость). Плазмиды патогенности контролируют вирулентные свойства микроорганизмов, детерминируя синтез факторов патогенности. Так, например, Ent-плазида определяет синтез энтеротоксина.

Конъюгативные (трансмиссивные) плазмиды переносятся от бактерии к бактерии внутри вида или между представителями близкородственных видов в процессе конъюгации. Чаще всего конъюгативными плазмидами являются F- или R-плазмиды. Подобные плазмиды относительно крупные (25–150 млн Д) и часто выявляются у грамотрицательных палочек.

Неконъюгативные плазмиды обычно имеют небольшие размеры и характерны для грамположительных кокков, но встречаются также у некоторых грамотрицательных микроорганизмов (например, у *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*). Мелкие плазмиды могут присутствовать в больших количествах (более 30 на клетку), поскольку только наличие такого количества обеспечивает их распределение в потомстве во время клеточного деления.

Включения

В цитоплазме имеются различные включения в виде гранул гликогена, полисахаридов, серы, бета-оксимасляной кислоты. Они накапливаются при избытке питательных веществ в окружающей среде и выполняют роль запасных веществ для питания и энергетических потребностей клетки. Некоторые бактерии способны накапливать фосфорную кислоту в виде гранул полифосфата (зерна волютина, метакроматические зерна, зерна Бабеша–Эрнста). Они играют роль фосфатных депо и выявляются у коринебактерий, спирохет и дрожжей в виде плотных образований, располагающихся, в основном, у полюсов клетки. У некоторых бактерий, например, дифтерийной палочки, включения волютина в виде интенсивно прокрашивающихся полюсов клетки имеют дифференциально-диагностическое значение (рис. 19).

Наличие зерен волютина у бактерий выявляется окраской методом Нейсера.



Рис. 19. Мазок из чистой культуры *Corynebacterium diphtheriae* (окраска по Нейссеру)

Метод Нейссера

1. Фиксированный мазок окрашивают уксуснокислой синей 4 мин, затем сливают краску.
2. Промывают водой и наливают раствор Люголя на 20–30 с.
3. Не промывая водой, окрашивают везувином 1–3 мин.
4. Промывают водой, высушивают.

Тела бактерий окрашиваются в нежный светло-коричневый цвет, зерна волютинина – в темно-синий, почти черный цвет.

Споры

Споры бактерий – своеобразная форма покоящихся клеток, в основном грамположительных палочковидных бактерий. Споры бактерий можно рассматривать как форму сохранения наследственной информации бактериальной клетки в неблагоприятных условиях внешней среды. Переход бактерий к спорообразованию наблюдается обычно при истощении питательного субстрата, недостатке источников углерода, азота, фосфора, изменении pH, накоплении ядовитых продуктов метаболизма и т.д. Одна бактериальная клетка образует одну спору, локализация которых может быть различна (центральная, терминальная, субтерминальная) (рис. 20).

Если размеры спор не превышают поперечного размера палочковидной бактерии, то последняя называется *бациллой* (*возбудитель сибирской язвы*). Когда диаметр споры больше – бактерии имеют форму веретена и носят название *кlostридий* (*возбудители анаэробной инфекции*). Кlostридии столбняка имеют круглую спору и напоминают барабанные палочки. Кlostридии ботулизма отличаются большими овальными спорами, что придает им вид теннисной ракетки.

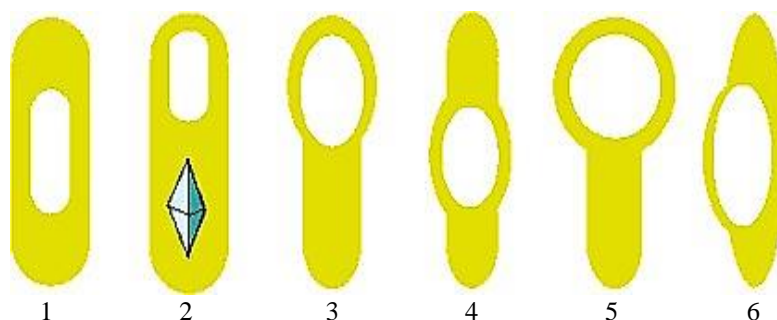


Рис. 20. Типичные формы спорообразующих клеток: 1 – спора расположена в центре (*Bacillus megaterium*); 2 – спора расположена терминально; (*Bacillus thuringiensis*); 3 – спора расположена терминально (*Bacillus polutuxa*); 4 – спора расположена в центре; материнская приобрела форму веретена (*Bacillus polutuxa*); 5 – спора расположена терминально; клетка имеет форму барабанной палочки (*Bacillus sphaericus*); 6 – спора расположена латерально (*Bacillus laterosporus*) (Шлегель Г., 1987)

По химическому составу различие спор от вегетативных клеток состоит лишь в количественном содержании химических соединений. Споры содержат меньше воды и больше липидов.

Процесс спорообразования можно разделить на три стадии или этапа (рис. 21). Первый этап – подготовительный. В вегетативной клетке бактерий, переходящей к спорообразованию, прекращаются ростовые процессы, удваивается нуклеоид и изменяется метаболизм, а именно распадается значительная часть белков материнской клетки, образуется специфическое для спор вещество – дипиколиновая кислота, которая не встречается в вегетативных клетках.

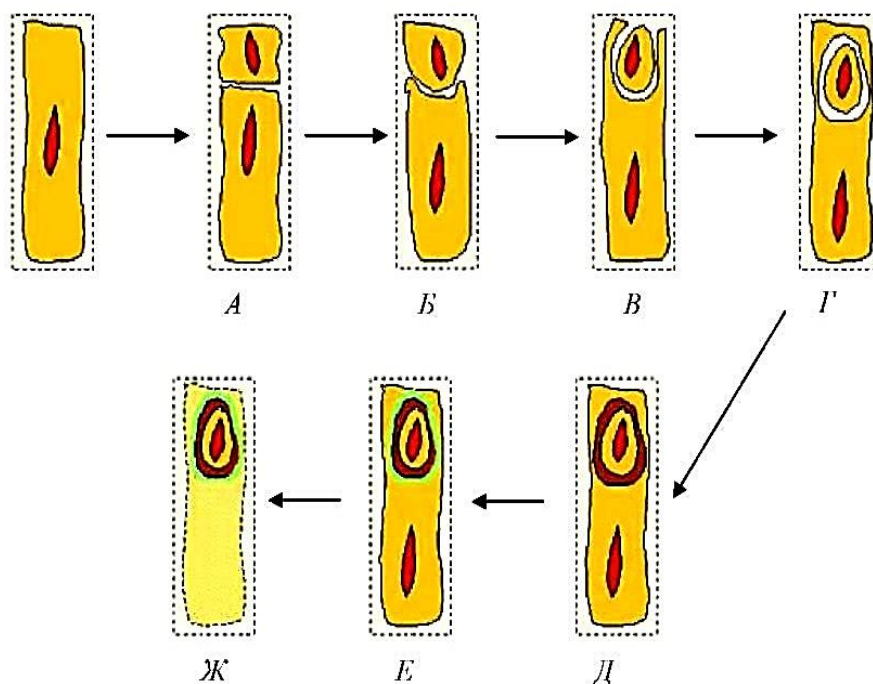


Рис. 21. Схема процесса спорообразования: А – отделение протопласта споры; Б, В, Г – образование протоспоры; Д, Е, Ж – формирование споры (Лысак В.В., 2008)

Второй этап – формирование споры начинается с деления клетки. Часть цитоплазмы и хромосома бактериальной вегетативной клетки отделяются, окружаясь врастающей цитоплазматической мембраной, – образуется проспору. Проспору окружают две цитоплазматические мембраны, между которыми формируется толстый измененный пептидогликановый слой кортекса (коры). Изнутри он соприкасается с клеточной стенкой споры, а снаружи – с внутренней оболочкой споры. Наружная оболочка споры образована вегетативной клеткой. По мере формирования многослойных покровов проспору превращается в спору.

Споры некоторых бактерий имеют дополнительный покров – экзоспориум, в состав которого входят белки, липиды, углеводы. Таким образом, формируется многослойная плохо проницаемая оболочка. Спорообразование сопровождается интенсивным потреблением проспору дипикколиновой кислоты и ионов кальция. Спора приобретает термоустойчивость, которую связывают с наличием в ней дипикколινата кальция.

Третий этап – созревание споры. Спора приобретает характерную форму и занимает определенное положение в клетке.

Таким образом, спора состоит из следующих структурных элементов: нуклеоида; уплотненной цитоплазмы (за счет дегидратации, перехода белков в связанное состояние, снижения активности некоторых ферментов и синтеза дипикколινата кальция); покровных слоев, представленных цитоплазматической мембраной, клеточной стенкой зародыша, кортексом, внутренней оболочкой, наружной оболочкой, экзоспориумом (рис. 22).

После полного созревания споры вегетативная часть клетки может лизироваться. В состоянии споры микроорганизмы метаболически неактивны, выдерживают высокую температуру (140–150 °C), воздействие химических дезинфицирующих веществ и длительно сохраняются в окружающей среде. В почве, например, возбудители сибирской язвы и столбняка могут сохраняться десятки лет.

Попадая в организм человека и животных, споры прорастают в вегетативные клетки. Процесс прорастания спор включает три стадии: активации, начальной стадии и стадии роста. К активирующим агентам, нарушающим состояние покоя, относят повышенную температуру, кислую реакцию среды, механические повреждения и др. Спора начинает поглощать воду, освобождается от дипикколата кальция, с помощью гидролитических ферментов разрушает многие собственные структурные компоненты. После разрушения наружных слоев наступает период формирования вегетативной клетки с активацией биосинтеза, заканчивающейся делением клетки. Прорастание споры происходит в течение 4–5 ч, в то время как образование спор продолжается до 18–20 ч.

Окраску спор производят специальным методом Ожешко, который вклю-

чает предварительное прогревание споры, а также воздействие концентрированных растворов красок при высокой температуре.

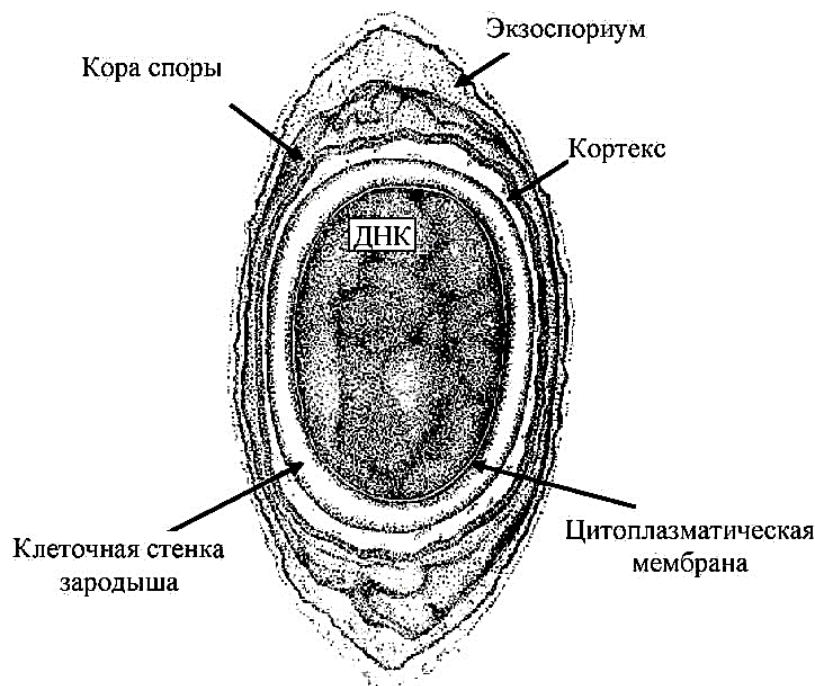


Рис. 22. Схема строения зрелой споры (по С. Халею, 2001)

Метод Ожешко

1. На высушенный мазок наливают 0,5% раствор хлористоводородной кислоты и подогревают 1–2 мин.
2. Препарат промывают водой и фиксируют над пламенем горелки.
3. На фиксированный мазок помещают фильтровальную бумагу и наливают карболовый фуксин Циля и осторожно нагревают на горелке до появления паров. Операцию повторяют 2–3 раза.
4. Когда препарат остынет, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и промывают препарат водой.
5. Препарат погружают 2–3 раза в стакан с 5% серной кислотой на 1–2 с.
6. Тщательно промывают препарат водой и докрашивают щелочным метиленовым синим 3–5 мин.
7. Промывают водой и подсушивают.

Споры прочно удерживают карболовый фуксин и окрашиваются в красный цвет, цитоплазма бактерий обесцвечивается 5% серной кислотой и после докрашивания метиленовым синим приобретает синий цвет.

Капсула

Капсула – слизистый слой клеточной стенки бактерий, состоящий из полисахаридов (пневмококк) или полипептидов (бацилла сибирской язвы). Микрокапсулу (толщиной менее 0,2 мкм) способны формировать большинство

бактерий. Четко выраженную макрокапсулу (толщиной более 0,2 мкм) формируют пневмококк, клебсиеллы, возбудитель сибирской язвы и некоторые другие. У патогенных бактерий капсула образуется в макроорганизме. Капсула различима в мазках-отпечатках из патологического материала. На искусственных питательных средах она обычно утрачивается (за исключением клебсиелл).

Капсула гидрофильна, включает большое количество воды. От капсулы следует отличать слизь – мукоидные экзополисахариды, не имеющие четких внешних границ. Слизь растворима в воде.

Капсула выполняет разнообразные функции: защитную, предохраняя клетку от неблагоприятных условий среды обитания; адгезивную, способствуя прикреплению (прилипанию) к поверхности клетки хозяина. В организме человека и животных капсула защищает патогенные бактерии от бактериофага, фагоцитоза и гуморальных факторов иммунитета, определяет антигенную специфичность микроорганизмов.

Капсулы, имея консистенцию геля, плохо удерживают краситель, и для их выявления чаще всего применяют метод негативного контрастирования Бурри–Гинса (рис. 23).

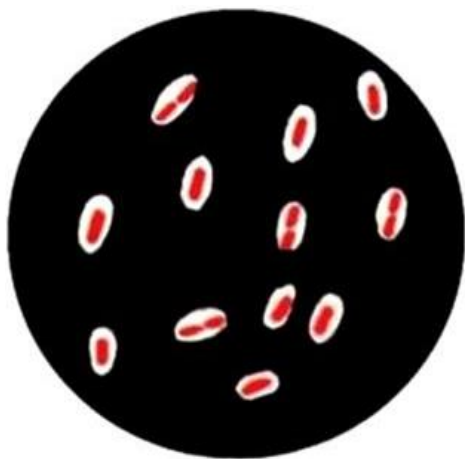


Рис. 23. Выявление капсулы методом негативного контрастирования по Бурри–Гинсу

Метод Бурри–Гинса

1. На середину предметного стекла наносят каплю черной туши и смешивают ее с помощью петли с каплей культуры капсульных бактерий.
2. Краем другого предметного стекла делают мазок по типу кровавого. Мазок сушат на воздухе и фиксируют в пламени горелки.
3. Окрашивают 5 мин карболовым фуксином, разведенным водой 1:3.
4. Осторожно промывают водой, высушивают.

Бактерии окрашиваются в красный цвет, неокрашенные капсулы контрастно выделяются на темном фоне препарата.

Жгутики

Жгутики выполняют роль органа движения, позволяющего бактериям передвигаться со скоростью 20–60 мкм/с. Жгутики представляют собой тонкие нити, берущие начало от цитоплазматической мембраны, имеют большую длину, чем сама клетка. Толщина жгутиков 12–20 нм, длина 3–15 мкм. Жгутики состоят из белка – флагеллина, являющегося антигеном (H-антиген). Субъединицы флагеллина закручены в виде спирали.

По расположению и числу жгутиков на поверхности клетки бактерии подразделяются на:

- монотрихи имеют один жгутик (бактерии рода *Vibrio*);
- лофотрихи имеют на одном или на обоих полюсах клетки пучок жгутиков (бактерии рода *Pseudomonas*);
- амфитрихи имеют по жгутику на обоих полюсах клетки (бактерии рода *Spirillum*);
- перитрихи имеют большое количество жгутиков, располагающихся по всей поверхности клетки (бактерии вида *E. coli*) (рис. 24).

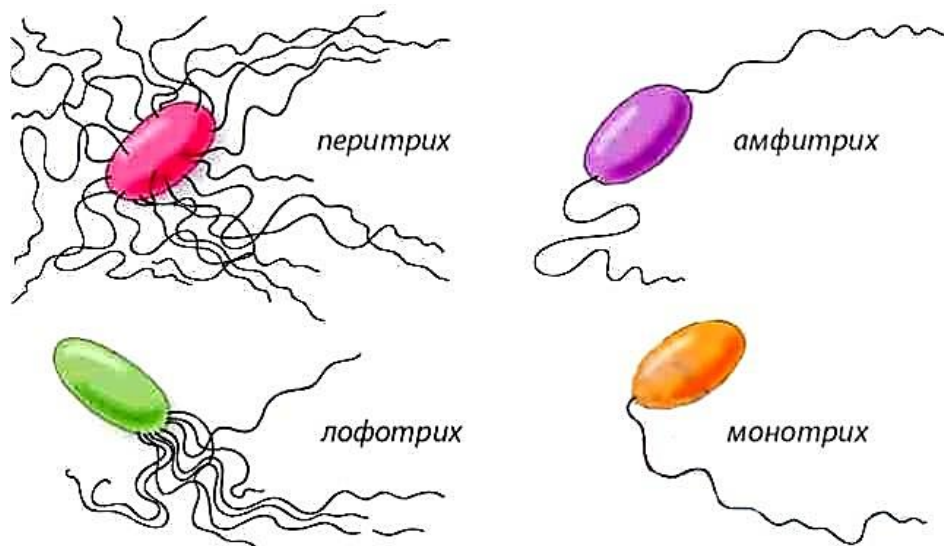


Рис. 24. Типы жгутикования у бактерий. (<https://ik-ptz.ru>)

Жгутик состоит из трех компонентов – спиральной жгутиковой нити (филамента), крючка (колена) и базального тельца (рис. 25). Крючок, к которому присоединена жгутиковая нить, имеет длину 30–45 нм и состоит из отличающегося от флагеллина белка. Он соединен с базальным тельцем, которое располагается в клеточной стенке и ЦПМ. Базальное тельце состоит из центрального стержня, заключенного в систему особых колец. Кольца выполняют роль «приводного диска» и «подшипника» на внутренней поверхности пептидогликанового слоя. Вся конструкция выполняет функцию хемомеханического преобразователя (мотор). Удаление пептидогликанового слоя клеточной стенки

ведет к потере способности бактерий к движению, хотя жгутики при этом остаются неповрежденными.

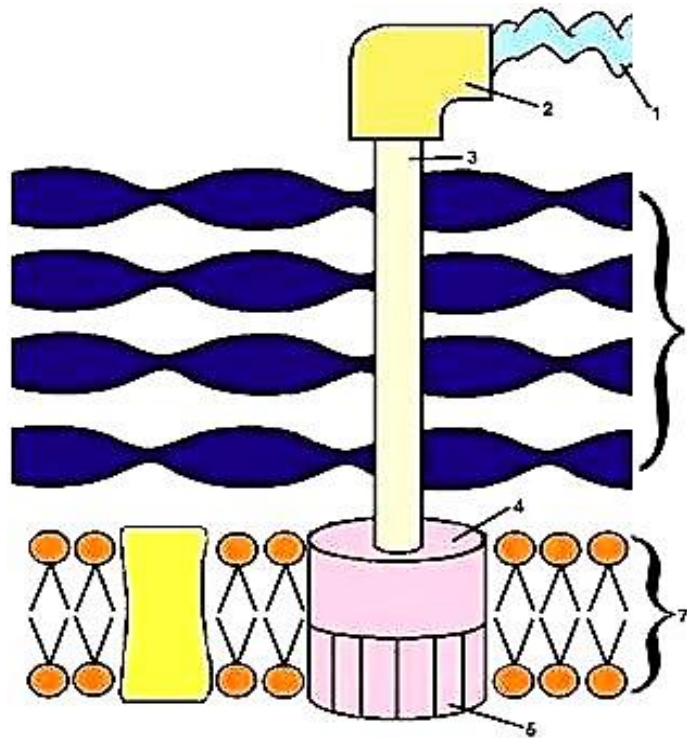


Рис. 25. Строение жгутика грамположительной бактерии:
1 – филамент; 2 – крючок; 3 – стержень; 4 – S-диск; 5 – М-диск; 6 – пептидогликан;
7 – цитоплазматическая мембрана

У грамотрицательных бактерий в базальном тельце две пары колец (рис. 26): внешняя (кольца L и P) и внутренняя (кольца S и M). Кольца L и P расположены внутри клеточной стенки (кольцо L в ЛПС, а кольцо P в слое пептидогликана). Они выполняют, очевидно, роль втулки для стержня. Внутренняя пара (кольца S и M) фиксирована на ЦПМ, причем кольцо S располагается в периплазматическом пространстве, а кольцо M – на ЦПМ или в ней.

Жгутики грамположительных бактерий содержат только одну пару колец (наружная пара колец отсутствует), поэтому считают, что для вращения жгутиков необходимо наличие только внутренней пары (кольца S и M).

Вращение жгутика в клеточной стенке происходит из-за вращательного движения колец S и M относительно друг друга и обеспечивается за счет энергии трансмембранного градиента ионов водорода или натрия. Благодаря такому вращению происходит движение бактерий в наиболее благоприятном для них направлении. Жгутиковый аппарат обладает особым бинарным переключателем, который позволяет менять направление вращения жгутиков против часовой стрелки на противоположное. Таким образом, бактерии, получив химический сигнал из окружающей среды, изменяют направление движения и выбирают оптимальные условия обитания.

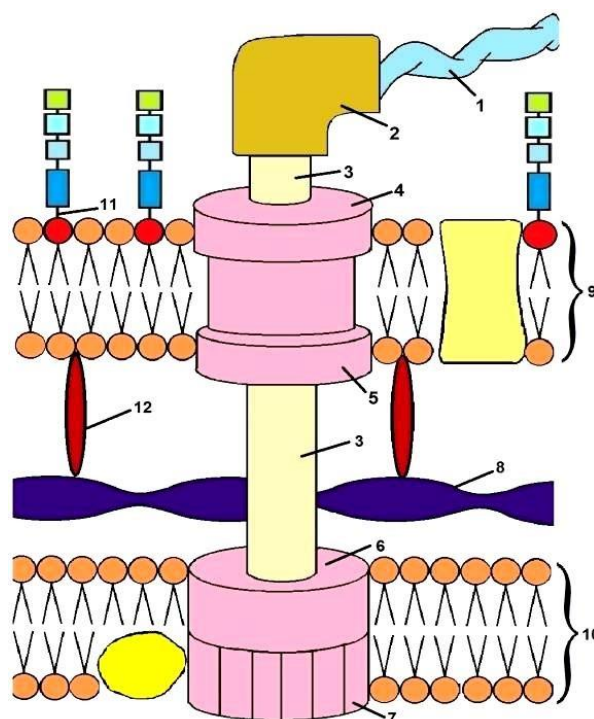


Рис. 26. Строение жгутика грамотрицательной бактерии. 1 – филамент; 2 – колено; 3 – стержень; 4 – L-диск; 5 – P-диск; 6 – S-диск; 7 – M-диск; 8 – пептидогликан; 9 – наружная мембрана; 10 – цитоплазматическая мембрана; 11 – липополисахарид; 12 – липопротеин

Под микроскопом жгутики можно увидеть лишь после специальных методов протравливания и импрегнации солями серебра и ртути с последующей окраской анилиновыми красителями (метод Леффлера). О наличии жгутиков можно косвенно судить по направленному характеру движения в «висячей» и «раздавленной» капле в темнопольном и фазово-контрастном микроскопах, либо при светлнопольной микроскопии при опущенном конденсоре и частично прикрытой диафрагме микроскопа.

Пили

Пили (ворсинки, фимбрии) – тонкие полые нити белковой природы, покрывающие поверхность бактериальных клеток. В отличие от жгутиков не выполняют двигательную функцию. По размерам они короче и тоньше жгутиков, длиной 0,3–10 мкм, толщиной 10 нм (рис. 27).

Пили построены из одного вида белка – *пилина*, субъединицы которого организованы в виде полый внутри нити и берут начало от ЦПМ. Пили обладают антигенной активностью.

По своему функциональному назначению подразделяются на несколько типов. Различают пили общего типа и половые пили.

Пили общего типа обуславливают прикрепление или адгезию бактерий к

определенным клеткам организма хозяина. Их количество велико – от нескольких сотен до нескольких тысяч на одну бактериальную клетку. Адгезия является первоначальной стадией любого инфекционного процесса.

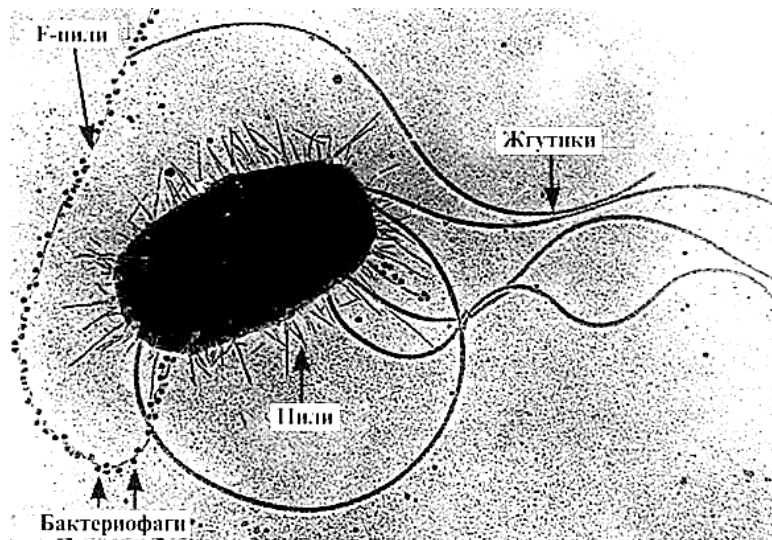


Рис. 27. Жгутики и пили бактерий. Электронная микроскопия. (Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.)

Половые пили (конъюгативные пили) участвуют в обмене генетическим материалом (конъюгации) между бактериями, обеспечивая перенос части генетического материала от донорной клетки к реципиентной. Они имеются в ограниченном количестве (1–4 на клетку) только у бактерий-доноров т.е. у клеток, содержащих половой фактор (F-плазмиду) или другие донорспецифические плазмиды.

1.5. ОТДЕЛЬНЫЕ ГРУППЫ ПРОКАРИОТ

Актиномицеты

Актиномицеты (*actinomyces* – от греч. *aktis* – луч, *mykes* – гриб) – группа неподвижных бактерий, занимающих промежуточное положение между бактериями и грибами. Имеют вид несептированных ветвящихся нитей, названных гифами. Скопление гифов называют мицелием. Сходство с грибами чисто внешнее, так как актиномицеты имеют прокариотический тип клетки с наличием КС, не содержащей хитина и целлюлозы. В состав пептидогликана могут входить галактоза, арабиноза, ксилоза и другие сахара не характерные для остальных бактерий и позволяющие дифференцировать актиномицеты. Актиномицеты грамположительны, неподвижны, многие формы кислотоустойчивы, некоторые актиномицеты вокруг нитей имеют капсулу.

При выращивании на питательных средах актиномицеты формируют субстратный мицелий, образующийся в результате его врастания в питательную среду и воздушный, растущий на поверхности среды. В пораженных тканях актиномицеты могут образовывать друзы-гранулы, скопление плотно переплетенных гиф в виде лучей, отходящих от центра и заканчивающихся колбовидными утолщениями.

Актиномицеты размножаются бесполым путем, образуя споры, конидии или спораносцы со спорангиями на концах воздушного мицелия или почкованием, или фрагментацией мицелия. Спораносцы могут быть прямыми, волнистыми, спиральными. Споры – овальными, круглыми, цилиндрическими, с гладкой поверхностью или шипами, иногда подвижные за счет жгутиков (зооспоры). Споры служат для размножения актиномицетов, они не термостойки, но выдерживают высушивание. При почковании гифа развивается из небольшой почки, которая постепенно вытягивается в палочку, а затем в короткую нить с боковыми ответвлениями. Размножение фрагментацией мицелий разламывается на отдельные палочки или кокки, каждый из которых дает начало новой клетке – гифе.

Актиномицеты широко распространены в природе, обитают в воде, почве богатой перегноем. Отдельные виды актиномицетов используются как продуценты антибиотиков, витаминов.

Актиномицеты, являясь симбионтами человека и животных, присутствуют в полости рта, в стромах зубного камня, криптах миндалин, в камнях мочевых и желчевыводящих путей.

Методы выявления. Актиномицеты окрашивают по Граму и Цилю–Нильсену.

Спирохеты

Спирохеты (*spira* – изгиб, *chaite* – волосы) спирально извитые, обладающие активной подвижностью бактерии. Размеры спирохет колеблются в толщину от 0,1–0,3 мкм, в длину от 7–500 мкм. Движения разнообразные – от винтообразных до сгибательных. Электронно-микроскопическое исследование позволило выявить у спирохет *протоплазматический цилиндр* (тело клетки), аксиальную (опорную) нить (аксостиль) и оболочки: клеточную стенку, построенную по типу грамотрицательных бактерий и цитоплазматическую мембрану. *Аксиальная нить* находится в периплазматическом пространстве между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной и состоит из отдельных фибрилл (эндофлагелл), число которых у разных видов различно: у трепонем и лептоспир их – 3–4; у борелий – до 30. Каждая из фибрилл (эндожгутиков) крепится к прикрепительным дискам (*блефаропластам*), расположенным на концах протоплазматического цилиндра и тянется к противоположному его концу, обвивая его и заканчиваясь свободно. Химический состав фибрилл аналогичен составу жгутиков (белок – флагеллин) (рис. 28).

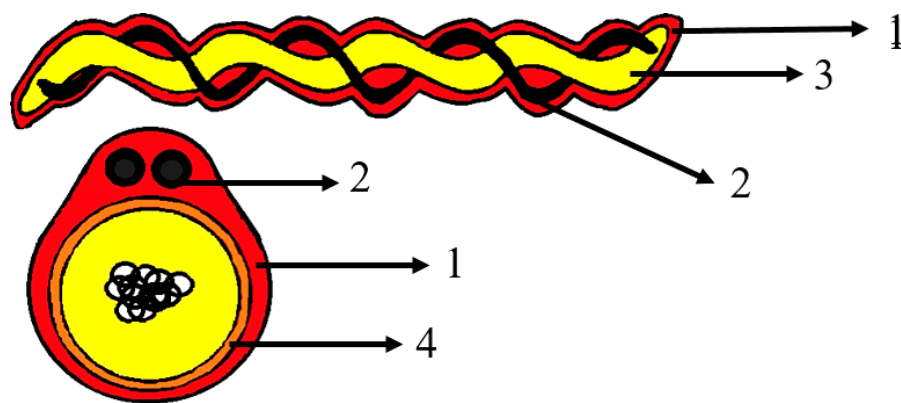


Рис. 28. Строение спирохеты: 1 – клеточная стенка; 2 – аксостиль, состоящий из осевых фибрилл; 3 – протоплазматический цилиндр; 4 – цитоплазматическая мембрана

В протоплазматическом цилиндре содержатся: нуклеоид, рибосомы, мезосомы, включения. Клеточная стенка содержит тонкий слой пептидогликана, эластична и не обладает ригидностью. Капсул не образуют, грамотрепательны, в мазке располагаются беспорядочно.

Спирохеты относятся к порядку *Spirochaetales*, состоящего из двух семейств *Spirochaetaceae* и *Leptospiraceae*. Семейство *Spirochaetaceae* включает в себя два рода: *Borrelia* *Treponema*, семейство *Leptospiraceae* – род *Leptospira*.

Род *Borrelia* – представители имеют 3–10 неравномерных завитков, концы заострены. Движение толчкообразное. По Романовскому–Гимзе окрашиваются в сине-фиолетовый цвет. Патогенные виды *Borrelia burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii* – вызывают иксодовый клещевой боррелиоз – болезнь Лайма).

1. Род *Treponema* – спирохеты имеют 8–14 туго закрученных, одинаковых по амплитуде завитков. Движение плавное, медленное с вращением вокруг продольной оси. По Романовскому–Гимзе окрашиваются в бледно розовый цвет. Вид *Treponema pallidum* – является возбудителем сифилиса.

2. Род *Leptospira* – представители длиной 5–15 мкм, имеют до двух десятков мелких частых завитков, заканчивающихся крючком с пуговчатым утолщением. Движение очень активное, поступательное перемещение вперед, сгибание и вращение вокруг оси. По Романовскому–Гимзе окрашиваются слабо в розовато-сиреневый цвет. Представитель *Leptospira interrogans* – возбудитель лептоспироза.

Методы выявления. В живом состоянии спирохеты изучают в фазово-контрастном микроскопе и темнопольном микроскопе, наблюдая за активным характерным движением спирохет, особенностями их формы.

Для изучения особенностей морфологии спирохет препараты окрашивают по Бурри (на темном фоне препарата становятся видимыми светлые извитые нити спирохет), по Романовскому–Гимзе, по методу Морозова.

Микоплазмы

Микоплазмы – самые мелкие прокариоты (125–150 нм) способные самостоятельно размножаться. Полагают, что микоплазмы являются наиболее близкими потомками исходных прокариотических клеток. Геном микоплазм минимален для клетки, он в пять раз меньше генома кишечной палочки. Главная особенность микоплазм – отсутствие КС. Они окружены капсулоподобным слоем, под которым находится лишь тонкая трехслойная мембрана толщиной 7,5–10 нм, содержащая в значительном количестве холестерин. Вследствие особенностей строения, микоплазмы относятся к тenericутам, классу *Mollicutes* («нежная кожа»), порядку *Mycoplasmatales*. Семейство *Mycoplasmataceae* включает в себя 2 рода – *Mycoplasma* и *Ureaplasma*.

Из-за отсутствия клеточной стенки микоплазмы (рис. 29) осмотически чувствительны и имеют разнообразную форму:

- а) мелкие сферические или овоидные клетки (элементарные тельца) которые фильтруются через бактериальные фильтры;
- б) более крупные шаровидные;
- в) нитевидные, ветвящиеся клетки.

Микоплазмы грамотрицательны, не образуют спор, жгутиков, некоторые виды обладают скользящей подвижностью. Они размножаются путем бинарного деления шаровидных и нитевидных клеток, почкования.

Для микоплазм характерна уникальная для прокариота потребность в стеролах (холестерине). Холестерин стабилизирует мембрану микоплазм. В инфицированных тканях микоплазмы являются паразитами мембран эукариотических клеток и способны персистировать на них долгое время.

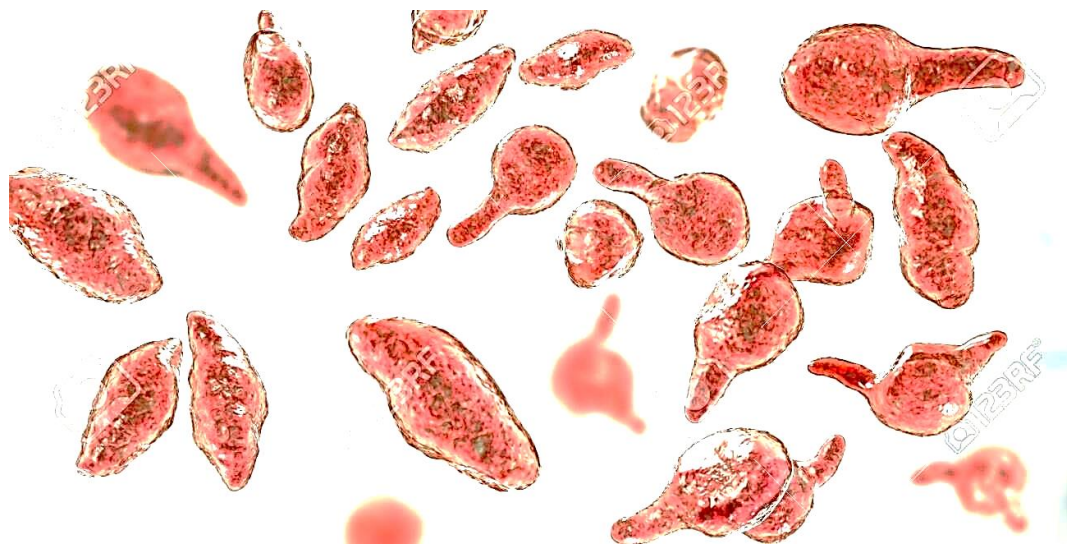


Рис. 29. Морфология микоплазм. Цитируется по «Illustration – Bacteria *Mycoplasma genitalium*, 3D illustration. The causative agent of sexually transmitted infections and infertility», https://www.123rf.com/photo_124508103_stock-illustration-bacteria-mycoplasma-genitalium-3d-illustration-the-causative-agent-of-sexually-transmitted-infection.html

Микоплазмы являются факультативными анаэробами. Вследствие малого генома микоплазмы обладают ограниченными биосинтетическими способностями, и их приходится культивировать на питательных средах, обогащенных липидами, белками, предшественниками нуклеиновых кислот. Растут они на питательных средах медленно, образуют мелкие колонии с плотным врастающим в среду центром, напоминающие «яичницу-глазунью» (рис. 30) (темный центр и более светлая ажурная периферия).

Большинство микоплазм являются безвредными комменсалами слизистых оболочек глаз, дыхательных, пищеварительных и мочеполовых путей человека.

Патогенные микоплазмы вызывают заболевания (микоплазмозы) дыхательных, мочеполовых путей и суставов с разнообразными клиническими проявлениями. При лечении этих заболеваний следует помнить, что микоплазмы не чувствительны к бета-лактамам антибиотикам и другим лекарственным препаратам, угнетающим синтез клеточной стенки (из-за ее отсутствия у возбудителя).

Методы выявления. В световом микроскопе обнаруживаются лишь самые крупные формы микоплазм. В живом состоянии их изучают в темно-польном и фазово-контрастном микроскопе, ультраструктурные компоненты выявляют при помощи электронной микроскопии. Окраску по Граму воспринимают плохо. Микоплазмы лучше окрашиваются по Романовскому–Гимзе.

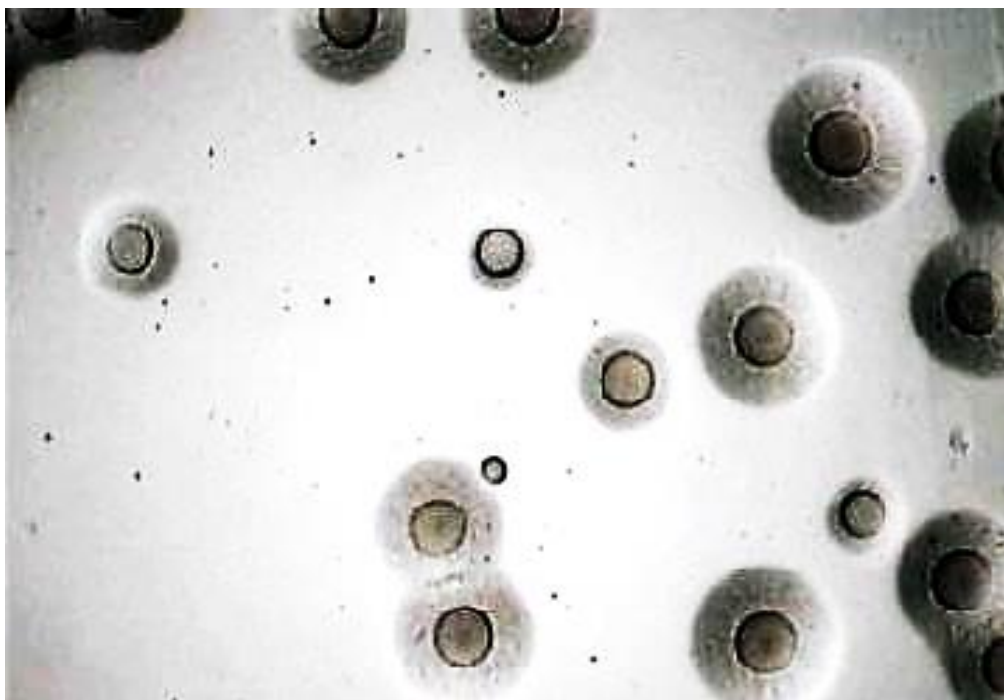


Рис. 30. Колонии Mycoplasma bovis. Цитируется по «Development of a Second-Generation Vaccine against Mycoplasmosis: Preparation of a Fraction Candidate from Mycoplasma bovis and its Evaluation as a Vaccine; Global Veterinaria 16 (2): 137–144, 2016»

Риккетсии

Риккетсии – мелкие (0,35–1,0 мкм) грамотрицательные, полиморфные бактерии, являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами.

Риккетсии разнообразны по форме, выделяют следующие типы:

- 1) кокковидные однозернистые;
- 2) палочковидные двухзернистые;
- 3) бациллярные трех-четырёхзернистые;
- 4) нитевидные многозернистые.

Структурно имеют все компоненты бактериальной клетки: клеточную стенку, ЦПМ, липоидную капсулу, цитоплазму, нуклеоид, рибосомы, пили. Риккетсии содержат как ДНК, так и РНК, обладают высоким содержанием фосфолипидов.

Жизненный цикл риккетсий зависит от жизнедеятельности клетки-хозяина и складывается из двух стадий: вегетативной и покоящейся (элементарные тельца). Риккетсии, находящиеся в вегетативной стадии (рис. 31) активно размножаются путем бинарного деления и обладают активной подвижностью, по-видимому, обусловленной жгутиковыми структурами. Риккетсии покоящейся стадии (элементарные тельца) имеют сферическую форму, и они не активны.

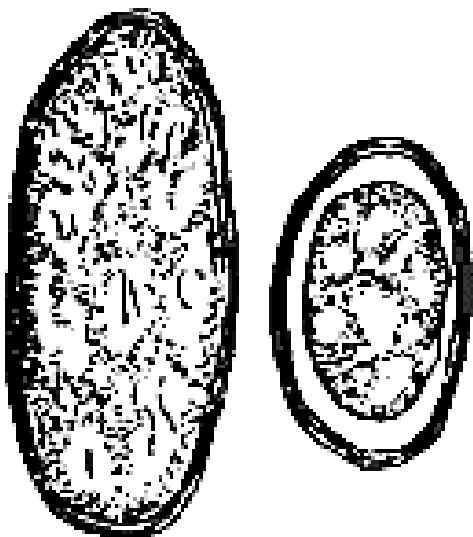


Рис. 31. Продольный срез вегетативной (слева) и покоящейся (справа) форм риккетсий Провачека (схема) [по Здродовскому П.Ф. и Голиневич Е.М., 1972]

Риккетсии способны к биосинтезу белка, но не могут самостоятельно получать макроэнергетические соединения, поэтому их можно назвать «энергетическими паразитами» клеток-эукариотов. В связи с этим, для культивирования риккетсий обычно заражают куриные эмбрионы в желточный мешок (метод Кокса), культуры клеток. Реже заражают чувствительных лабораторных животных: морских свинок, белых мышей.

Риккетсии относятся к порядку *Rickettsiales* семейству *Rickettsiaceae*, род *Rickettsia*. Род *Rickettsia* включает виды патогенные для теплокровных живот-

ных и человека, переносчиками служат вши, блохи, клещи. Заболевания называются риккетсиозами.

Методы выявления. Риккетсии окрашиваются по Романовскому–Гимзе в сиреневый цвет, по Морозову (методом серебрения) в черный цвет. Специфическим методом выявления является окраска по Здродовскому. Риккетсии окрашиваются в рубиново-красный цвет и обнаруживаются на фоне голубой цитоплазмы и синего ядра клеток.

Хламидии

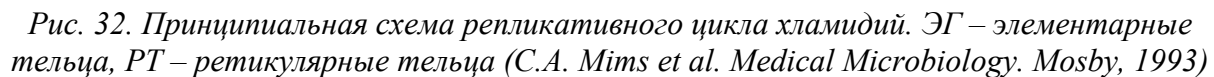
Хламидии – неподвижные, облигатно паразитические, кокковидные бактерии. Размножаются они в цитоплазме клеток человека, млекопитающих, птиц. Размножение происходит в ходе уникального цикла развития. Основными стадиями жизненного цикла хламидий являются:

1. Элементарные тельца – мелкие (0,2–0,5 мкм) шаровидные структуры, лишенные метаболической активности, имеющие компактный нуклеоид и ригидную клеточную стенку, фильтруются через бактериальные фильтры. Являются инфекционным началом хламидий и обеспечивают выживание хламидий во внеклеточной среде и заражение новых клеток.
2. Ретикулярные тельца – вегетативная форма, это более крупные (0,8–1,5 мкм), сферические образования, имеющие сетчатую структуру с тонкой клеточной стенкой и фибриллярным нуклеоидом. Образуются из элементарных телец внутри клеток, лишены инфекционности и, подвергаясь делению, обеспечивают репродукцию хламидий. Отсюда другое, исторически первое название ретикулярных телец – «инициальное тело».
3. Промежуточные тельца – промежуточная стадия между элементарными и ретикулярными тельцами.

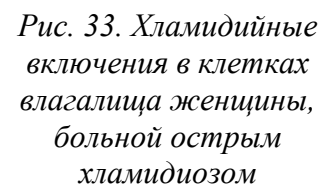
Жизненный цикл хламидий начинается с того, что элементарные тельца фагоцитируются клеткой-хозяином, увеличиваются в размерах и превращаются в ретикулярные тельца, которые размножаются путем поперечного деления. Жизненный цикл заканчивается, когда возникающие промежуточные формы уплотняются, уменьшаются в размерах и превращаются в элементарные тельца. Размножаясь внутри цитоплазматических вакуолей, хламидии образуют микроколонии (хламидийные включения), окруженные мембраной. В составе микроколоний обнаруживаются все три стадии развития хламидий. После разрыва стенки вакуоли и мембраны клетки-хозяина, вновь образовавшиеся хламидии высвобождаются, и элементарные тельца, инфицируя другие клетки, повторяют цикл развития. В оптимальных условиях роста в эукариотических клетках жизненный цикл хламидий составляет 17–40 ч (рис. 32).

Хламидии хорошо размножаются в желточном мешке куриного эмбриона и в культурах клеток различных позвоночных. Зависимость хламидий от кле-

Своеобразие хламидий проявляется и в строении их клеточной стенки. Она лишена пептидогликана и представляет собой двухслойную мембрану, ригидность которой определяют пептиды, перекрестно сшитые дисульфидными мостиками. В остальном хламидии напоминают грамотрицательные бактерии, так как содержат гликолипиды, сходные с липополисахаридами.



Методы выявления. Для микроскопического обнаружения хламидийных включений (микроколоний) в инфицированных клетках (тканях) применяют окраску по Романовскому–Гимзы (хламидии приобретают голубой или фиолетовый цвет) (рис. 33).



Кроме того, хламидии хорошо видны и в неокрашенном состоянии при фазовоконтрастной микроскопии. В настоящее время для выявления хламидий можно применять иммунофлюоресценцию.

1.6. МИКРООРГАНИЗМЫ-ЭУКАРИОТЫ

Грибки

Грибки (Fungi) – это одноклеточные или многоклеточные эукариотические организмы, которые занимают промежуточное положение между растениями и животными. По типу питания и потребности в витаминах, по наличию хитина в оболочке, стеролов в цитоплазматической мембране и гликогена в цитоплазме напоминают клетки животного происхождения, а по наличию клеточной стенки, состоящей из полисахаридов, близких к целлюлозе и вакуолей, заполненных клеточным соком; по способности к неограниченному росту, размножению спорами, неподвижностью в вегетативном состоянии – к растениям. Человек использует грибки во многих сферах своей деятельности. С глубокой древности съедобные грибки употребляют в качестве продуктов питания, ферментирующие дрожжи применяют в хлебопечении, сыроварении, винокурении и пивоварении. Биосинтетические особенности грибов используют для получения антибиотиков (пенициллина, гризеофульвина, цефалоспорины и др.), каротиноидов, лимонной кислоты и т.д. Негативное действие грибов также весьма многообразно. Заселение грибами всех доступных субстратов неизбежно ведет к повреждению природных продуктов. Грибки вызывают гниение плодов, портят молоко, мясо, рыбу, разрушают древесину, шерсть, лен, хлопок и т.п. Они вызывают заболевания у растений, животных и человека.

Классификация и строение грибов

Из ныне известных свыше 250 тысяч видов грибов для человека патогенны не более 500. Единой общепринятой классификации грибов нет, а существующие классификации грибов преследуют в основном практические цели, в основе их лежит морфоструктурная организация и способ размножения.

Грибки отнесены к царству *Fungi* (*Mycota*), подразделяемому на отделы *Мухомycota* (грибы слизевики) и *Еumycota* (истинные грибы). Истинные грибы, клетки которых не имеют перегородок, известны как *низшие* грибки. К ним относят классы *Chytridiomycetes*, *Hyphochytridiomycetes*, *Oomycetes*, *Zygomycetes*. Представители классов *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* и *Deuteromycetes* – это *высшие* грибки, так как их нитевидные клетки имеют пе-

регородки-септы. Некоторые представители этих классов, вызывающих заболевания у человека.

Строение грибной клетки типичное для эукариота. Клетки грибов могут иметь различный внешний вид, но все они сходны между собой набором основных клеточных органелл. К ним относятся: клеточное ядро, митохондрии, рибосомы, мембраны, клеточная стенка, микросомы и др.

Грибная клетка в большинстве покрыта твердой оболочкой – клеточной стенкой, которая на 80–90% состоит из содержащих азот и безазотистых полисахаридов (микрофибриллярный матрикс). У большинства грибов основным полисахаридом является хитин, маркер грибов, полимер N-ацетилглюкозамина. Кроме того, в составе стенки в небольшом количестве имеются белки, липиды и полифосфаты. Под клеточной стенкой расположена цитоплазматическая мембрана, окружающая внутреннюю часть клетки – протопласт.

В цитоплазме грибка содержатся структурные белки и не связанные с органоидами клетки ферменты, аминокислоты, углеводы, липиды. В клетке грибов есть органеллы: митохондрии, лизосомы с протеолитическими ферментами, сегресомы и хитосомы. Сегресомы – вакуолеподобные структуры, ограничивающие поступление в клетку гидрофобных веществ, например, углеводовородов. Хитосомы представляют собой органеллы, содержащие фермент хитинсинтетазу, необходимый для синтеза хитина. Также в цитоплазме клетки содержатся вакуоли, наполненные запасными веществами, такими как волютин, липиды, гликоген, а также жирные кислоты.

В клетке грибка имеется от одного (у дрожжей-сахаромицетов) до нескольких ядер (до десяти у низших грибов). Ядро окружено двойной мембраной, содержит ядрышко и несколько хромосом из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

У грибов существует 2 типа роста: гифальный рост (*гифомицеты*) и дрожжевой рост (*бластомицеты*). Вегетативное тело *гифомицетов* (плесеней) состоит из клеток – нитей, сильно разветвленных и называемых гифами. Низшие грибки являются одноклеточными, так как не имеют поперечных перегородок-септ в гифах. Высшие грибки многоклеточные, их гифы разделены септами на отдельные клетки, с общей оболочкой. Перегородки врастают внутрь клеток и имеют в центре пору, через которую цитоплазма может перетекать из одной клетки в другую (рис. 34).

Совокупность гифов образует мицелий (грибницу). Он представляет собой переплетенные ветвящиеся гифы, ветвление осуществляется боковыми выростами. Мицелий может быть субстратный (вегетативный), врастающий в питательную среду. Такой мицелий обычно бывает обильным, с большой общей поверхностью, через него осмотическим путем происходит всасывание воды и питательных веществ. Мицелий, растущий на поверхности среды, называют воздушным или репродуктивным, так как содержит споры, обеспечивающие размножение грибов.

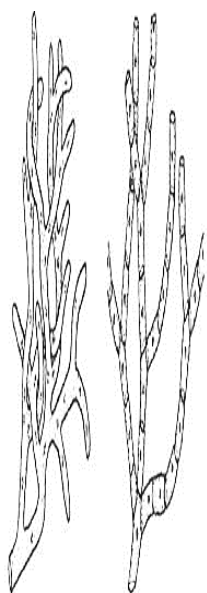


Рис. 34. Строение мицелия у низших и высших грибов (<https://studopedia.org>)

Мицелий называется истинным, если все септированные гифы имеют общую клеточную стенку; если мицелий состоит из изолированных удлиненных клеток, образующихся в результате почкования одноклеточных грибов без отхождения дочерних клеток, то это псевдомицелий. Общую оболочку псевдомицелий, в отличие от истинного, не имеет. При росте на питательных средах плесени образуют пушистые, часто пигментированные колонии, которые обычно появляются через 4–7 дней (рис. 35).

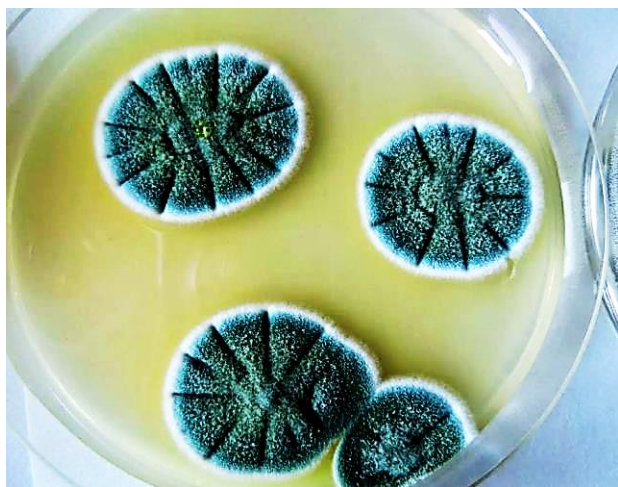


Рис. 35. Колонии плесневых грибов

Бластомицеты (дрожжи) – представляют собой одноклеточные неподвижные организмы. Они могут быть различной формы: эллиптической, овальной, шаровидной и палочковидной. Длина клеток колеблется от 5 до 12 мкм, ширина – от 3 до 8 мкм. Форма и размеры дрожжевых клеток непостоянны и зависят от рода и вида, а также от условий культивирования, состава питательной среды и других факторов. При выращивании бластомицетов в лабораторных условиях на плотных питательных средах колония дрожжей пред-

ставляет скопление огромного числа клеток разной величины (результат почкования), они похожи на бактериальные – гладкие, пастообразные, вырастают через 24–48 ч (рис. 36).

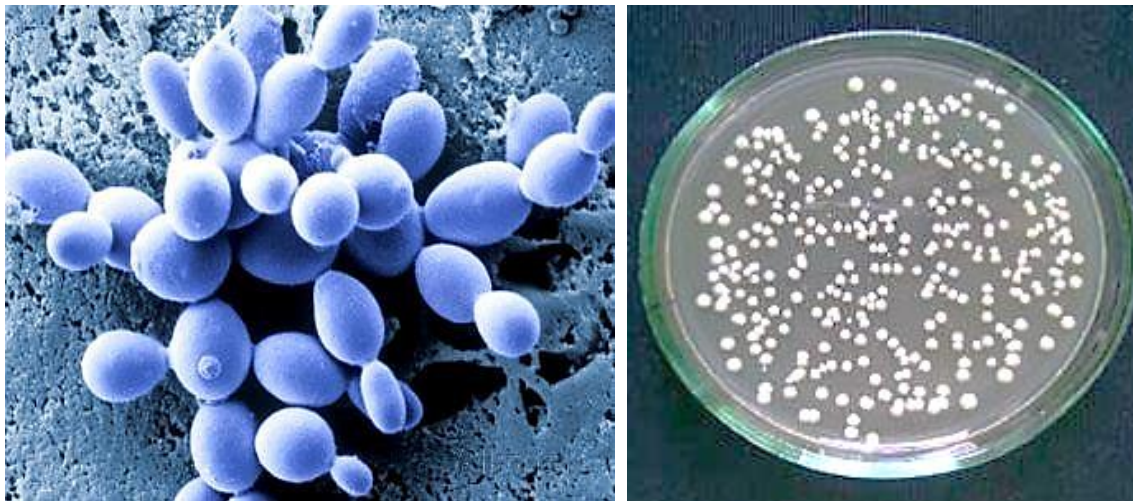


Рис. 36. Внешний вид бластомицетов и их колоний (<https://bio-x.ru>)

Известны грибки, которые в зависимости от условий растут как дрожжи или как плесени. Это явление называется диморфизмом, а такие грибки – диморфными. Диморфизм характерен для возбудителей системных (глубоких) микозов человека – бластомикоза (*Blastomyces dermatitidis*), гистоплазмоза (*Histoplasma capsulatum*) и кокцидиоидомикоза (*Coccidioides immitis*). В организме хозяина они образуют дрожжеподобные клетки, а на питательных средах растут в виде мицелиальных форм. Это связано с реакцией на температурный режим, где происходит репродукция грибов (температурозависимый диморфизм). Рост в дрожжевой фазе происходит при 37 °С (т.е. при температуре тела человека), комнатная температура инициирует формирование мицелия.

Диморфизм может проявляться и несколько иначе: оба морфологических варианта сосуществуют в зараженном организме. Это характерно для грибков рода *Candida*, который является возбудителем одного из самых распространенных грибковых заболеваний (микозов) человека. Обычно *C. albicans* представлены дрожжеподобными клетками, которые могут формировать цепи из удлиненных клеток – псевдогифы.

Размножение грибков

Особенностью грибков является большое разнообразие способов и органов размножения. Размножение грибков может быть *вегетативным* и *репродуктивным*. *Вегетативное размножение* происходит без образования каких-либо специализированных органов. *При репродуктивном* образуются специализированные клетки – споры, с помощью которых и осуществляется размножение.

При вегетативном размножении гифомицеты размножаются отдельными фрагментами или отдельными клетками гифы, способными образовывать новые клетки, то есть давать начало новому мицелию. Также вегетативное размножение может происходить путем почкования растущей гифы на отдельные клетки, почки могут образовываться на протяжении всей гифы или только на вершечных гифах. Образующиеся таким путем клетки называются оидиями (рис. 37-1). Другой способ вегетативного размножения – образование хламидоспор, клеток гиф, имеющих утолщенную оболочку. Они содержат много запасных включений и способны переносить длительные периоды голодания, высыхания и другие неблагоприятные условия (рис. 37-2). Оидии и хламидоспоры образуют высшие грибки.

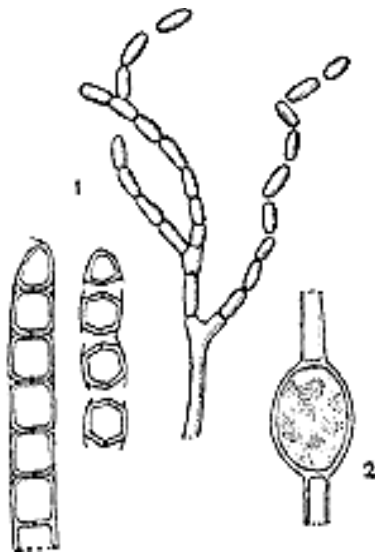


Рис. 37. Вегетативное размножение грибов:
1 – оидии; 2 – хламидоспора
(<https://sites.google.com>)

Репродуктивное размножение гифомицетов может происходить половым и бесполом путем. Грибки, размножающиеся половым путем, называются совершенными (*fungi perfecti*), те, у которых половой процесс отсутствует, несовершенными (*fungi imperfecti*), или дейтеромицетами. Бесполое размножение осуществляется с помощью спор, которые распространяются водой, животными, насекомыми, токами воздуха. Образованию бесполой спор не предшествует слияние клеток. Бесполое размножение разнообразно по строению, способам образования, биологическому значению. При бесполом размножении грибов образуются специальные плодоносящие гифы воздушного мицелия. У высших грибов на кончике плодоносящей гифы образуются специальные вытянутые клетки – *стеригмы*, на которых формируются цепочки из экзоспор – *конидий*, расположенных снаружи гифы. Такая гифа, на которой образуются конидии называется *конидиеносцем*. Конидиеносцы имеют разную форму. Верхушка может быть разветвлена в виде кисточек (*Penicillium glaucum*, рис. 38-1) или булабовидно утолщена (*Aspergillus niger*, рис. 38-2). Форма и расположение конидий характерны для различных видов грибов и используются в качестве признака их идентификации. У низших грибов

(*Mucor mucedo*, рис. 38-3) споры формируются внутри шаровидных мешочков – спорангиев, внутри которых формируются внутренние споры – эндоспоры. Плодоносящая гифа, на которой образуются спорангии называется споранги-еносцем.

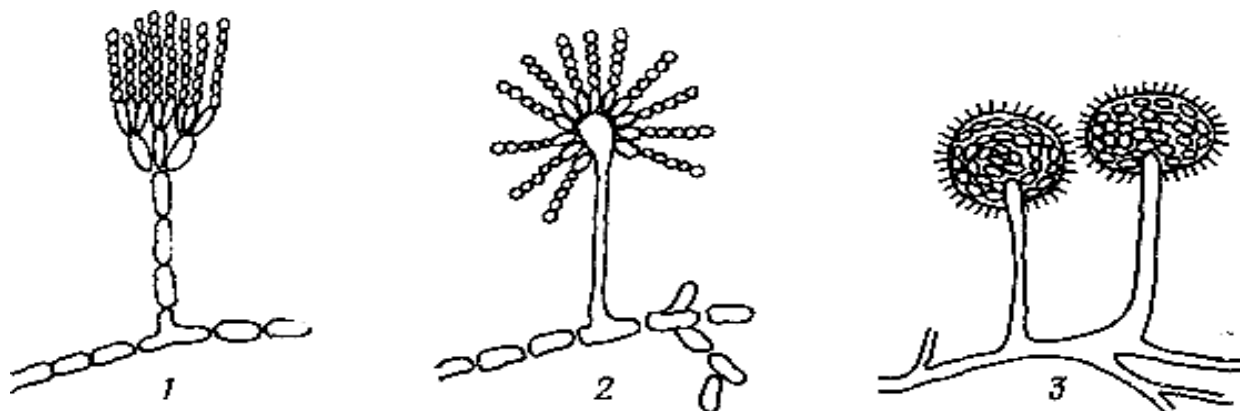


Рис. 38. Плесневые грибки. 1 – *Penicillium*; 2 – *Aspergillus*; 3 – *Mucor*
(<https://spravochnick.ru>)

У многих низших грибов бесполое размножение происходит при помощи подвижных зооспор, которые снабжены жгутиками и способных к самостоятельному движению в воде. Развитие зооспоры происходит в зооспорангиях.

Половое репродуктивное размножение гифомицетов предназначено для рекомбинации генов, сохранения грибка в неблагоприятных условиях, оно также способствует генетической стабилизации видов. Половые споры образуются в результате слияния двух клеток. Слияние может быть изогамное (слияние одинаковых клеток) и оогамное (слияние женской и мужской половых клеток). Половое размножение представляет собой возникновение и развитие нового поколения из оплодотворенной клетки – зиготы, возникшей при слиянии содержимого двух клеток. При слиянии двух раздельнополых клеток, называемых гаметами, половой процесс протекает в двух фазах. Первой фазой полового процесса является слияние протоплазмального содержимого двух клеток, т.е. плазмогамия. После плазмогамии либо сразу же, либо через некоторый промежуток времени (у разных организмов, по-разному) наступает слияние ядер, т.е. кариогамия. В результате слияния двух клеток получается особая клетка, внутри которой сосредоточено содержимое и первой, и второй (мужской и женской) клеток. После слияния двух ядер получается диплоидное ядро, в котором сосредоточен двойной набор хромосом. После образования диплоидного ядра, у одних грибов сразу, а в других случаях несколько позже, диплоидное ядро претерпевает деление, сопровождающееся уменьшением числа хромосом, т.е. редукционное деление (мейоз). В результате деления получают в последующем гаплоидные клетки, отличающиеся от диплоидных меньшим в два раза количеством хромосом. Вместе с тем в каждой из этих

клеток заключено содержимое двух предыдущих гаплоидных клеток, участвовавших в половом процессе, т.е. происходит рекомбинация наследственных свойств, и две клетки уже не являются тождественными первым клеткам. Половой процесс, таким образом, способствует возникновению большого разнообразия форм.

Примерами половых спор являются *аскоспоры*, *базидиоспоры* и *зигоспоры* (рис. 39).

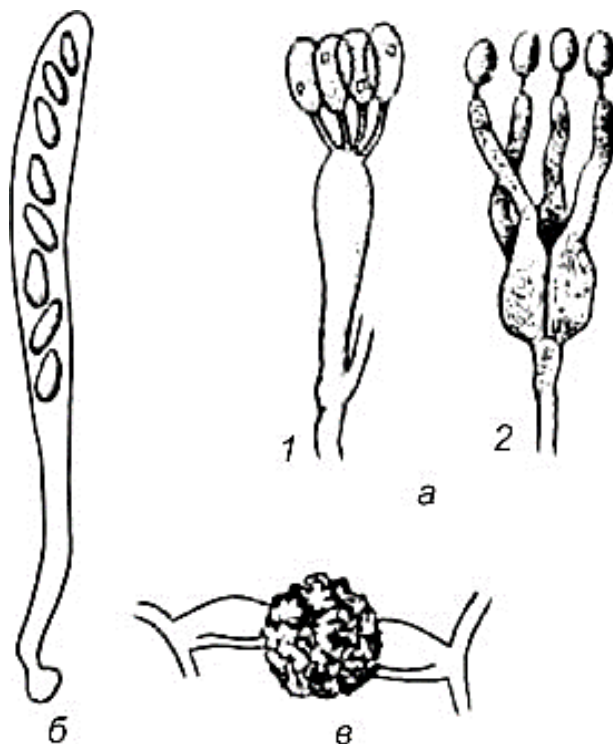


Рис. 39. Органы полового спороношения:

- 1 – одноклеточная базидия;
- 2 – многоклеточная базидия;
- а – базидии с базидиоспорами;
- б – сумка (аскус) с аскоспорами;
- в – зигоспора (<https://spravochnick.ru>)

Аскоспоры являются внутренними спорами. Они образуются в сумках или асках, причем количество аскоспор в сумке может варьировать от 4 до 16 и больше. Такие споры свойственны сумчатым грибкам – аскомицетам. *Базидиоспоры* являются наружными спорами и возникают по четыре, каждая на ножке (стеригме), характерны для базидиомицетов (шляпочных грибов). *Зигоспоры* – у некоторых низших грибов (зигомицетов), верхушки расположенных близко друг к другу, гифы сливаются, происходит мейоз, и образуются крупные зигоспоры с толстыми стенками.

Для бластомицетов типичным способом размножения является *почкование*; бинарное деление и образование аскоспор наблюдается редко. *Почкование* осуществляется за счет образования на поверхности клетки небольшого выпячивания, в которое поступает часть протоплазмы и ядро материнской клетки – образуется почка, которая затем отделяется и превращается в самостоятельную клетку. В результате процесса почкования образуются скопления округлых, дрожжеподобных клеток, которые при малом увеличении микроскопа напоминают шары или гранулы (рис. 40).

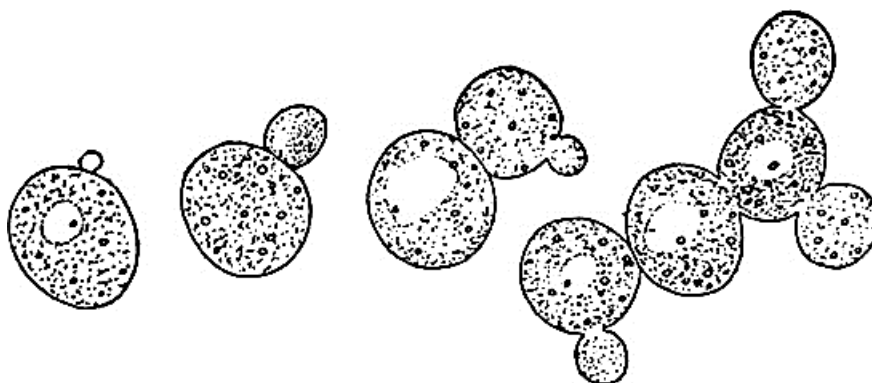


Рис. 40. Почкование дрожжей (<https://studme.org>)

Роль грибов в патологии человека

Различают три основных типа прямого поражения человека грибами:

- инфекционное (микозы кожи и других органов);
- токсическое (мицетизм, микотоксикоз);
- сенсibiliзирующее (микогенная аллергия).

Большее количество грибов относится к патогенным и условно-патогенным возбудителям, вызывающим заболевания только при снижении колонизационной резистентности кожи, слизистых оболочек и общей резистентности организма (чаще всего при иммунодефицитных состояниях).

По характеру первичной локализации патогенных грибов, патогенезу и клиническим проявлениям выделяют четыре группы микозов:

- 1) кератомикозы, поверхностные микозы (лишай, трихоспория) – поражаются волосы и роговой слой эпидермиса;
- 2) дерматофитию, эпидермомикозы (эпидермофития стоп, трихофития, микроспория) – поражаются эпидермис, волосы, ногти;
- 3) подкожные микозы – поражается кожа, подкожная клетчатка, фасции, кости;
- 4) глубокие, системные микозы (бластомикозы, гистоплазмоз, кокцидиоз, споротрихоз) – характеризуются поражением внутренних органов, частой диссеминацией.

Грибки, наиболее часто вызывающие микозы относятся к классам:

Класс Zygomycetes – зигомицеты. Медицинское значение имеют грибки рода *Mucor* (*Mucor mucedo*). Мукоровые грибки образуют разветвленный мицелий. Он состоит из гиф и обычно не имеет перегородок. На гифах образуются органы бесполого размножения – спорангиеносцы со спорангиями. При созревании спорангия в нем образуется огромное количество спорангиоспор, которые после освобождения из спорангиев прорастают и дают начало новому мицелию. Эта плесень вызывает у человека мукорозы – поражение легких (псевдотуберкулез), кератиты, отиты, вульвовагиниты, поражение печени, почек и других органов.

Класс Ascomycetes – аскомицеты. Аскомицеты обитают как сапрофиты в почве, а также паразитируют на различных организмах – растениях (водорослях, лишайниках и высших растениях), животных и организме человека. Патогенные грибки относятся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*. Представители рода *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*) имеют прямостоящие конидиеносцы, на концах имеются шаровидные вздутия, несущие стеригмы. У человека вызывает аспергилез – поражения легких, бронхов, роговицы глаз, ушей, мочеполовых и других органов. Род *Penicillium* имеет многоклеточные конидиеносцы, которые разветвляются в верхней части и заканчиваются стеригмами, расположенными в виде кисточек. Заболевания, вызванные этими грибами, называются пенициллиозы, поражаются кожа, ногти, уши, верхние дыхательные пути и легкие, а также возникает генерализованная инфекция. К роду *Saccharomyces* относятся дрожжи. Размножаются почкованием и аскоспорами. Дрожжи вызывают многочисленные дрожжевые микозы.

Класс Deuteromycetes (Fungi imperfecti) – несовершенные грибки. Вегетативное тело дейтеромицетов – хорошо развитый, ветвящийся, гаплоидный мицелий, состоящий обычно из многоядерных клеток. Размножаются только бесполым путем – конидиями. Ряд представителей несовершенных грибов являются возбудителями дерматомикозов: трихофитии (*Trichophyton violaceum*, *T. mentagrophytes*), микроспории (*Microsporum lanosum*, *M. canis*), эпидермофитии (*Epidermophyion inguinale*).

Также заболевания вызывают представители рода *Candida*. Наиболее патогенными и чаще встречаемыми являются *Candida albicans* и *C. tropicalis*. У людей эти грибки выявляются на коже, слизистых ротовой полости, желудочно-кишечного тракта, мочеполовых органов. Они часто встречаются на пищевых продуктах, в сточных водах и пр. Заражение людей может происходить экзогенно, из окружающей среды и эндогенно – грибами из полости рта, желудочно-кишечного тракта. Кандиды поражают кожу межпальцевых участки рук и ног, паховые складки, ногти, ногтевые валики, слизистые оболочки губ, язык, слизистые зева, пищевода, внутренние органы. Развитию кандидоза способствуют разнообразные факторы: поражение слизистой оболочки, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, нарушение витаминного баланса, дисбактериоз, иммунодепрессия, длительное лечение антибиотиками и кортикостероидами, радиоактивное облучение и пр.

Многие грибки вызывают специфическую сенсibilизацию организма человека, проявляющуюся своеобразными аллергическими заболеваниями. Проявляться микогенная сенсibilизация может общими симптомами (например, типа сенной лихорадки) или кожными сыпями (микидами).

Методы исследования грибов

Для микроскопического исследования готовят как нативные (неокрашенные), так и окрашенные препараты. Нативные препараты готовят по типу

давленная капля» и микроскопируют в фазово-контрастном или световом микроскопе при увеличении $\times 200$, $\times 400$. Для исследования грибков в окрашенном виде используют простые окраски (лактофуксин или лактофенол) или сложные методы (по Романовскому–Гимзе, по Граму, Циллю–Нильсену).

Простейшие

Простейшие – одноклеточные эукариоты, близкие по строению к клеткам сложно организованных животных. Они широко распространены в природе (около 2500 видов) и ведут свободный или паразитический образ жизни. Большинство простейших имеют размеры в пределах от 30 до 150 мкм. Форма может быть грушевидной (*трихомонады*, *лямблии*), яйцевидной (*балантидий*), веретенообразной (*трипаномы*, *лейшмании*), они могут принимать самую причудливую конфигурацию (*амебы*). Клетки простейших, как у всех эукариот содержат ядро (иногда несколько), цитоплазму, у большинства простейших имеется эластичная плотная мембрана – пелликула, которая поддерживает форму этих микроорганизмов. Кроме органелл общего значения (рибосомы, митохондрии, лизосомы, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи) имеются специфические органеллы. Так у лямблий это две эластичные нити – аксостиль и присасывательный диск; у трихомонад и трипаносом – ундулирующая мембрана; у токсоплазм – коноид и система микротрубочек; у балантидия – подобие ротовой полости (цитостом) и анальная пора (цитопрокт), сократительные вакуоли.

Большинство простейших подвижны и передвижение осуществляется с помощью псевдоподий (*амебы*), жгутиков (*лямблии*, *лейшмании*), ресничек (*балантидий*).

Псевдоподии – временные выпячивания цитоплазмы, выпуская которые простейшие все время меняют форму тела.

Жгутики – длинные тонкие выросты, состоящие из фибрилл (две центральных и девять периферических).

Реснички по строению сходны со жгутиками, но в отличие от них короткие и работают наподобие весел.

Простейшим свойственны определенные жизненные циклы, во время которых при неблагоприятных условиях вегетативные формы превращаются в цисты. Простейшее округляется, теряет подвижность и покрывается двухслойной плотной оболочкой. Особенности формы и строения цисты имеют диагностическое значение.

Простейшие могут размножаться бесполым и половым путем. Размножение некоторых видов бывает сложным, со сменой бесполого и полового циклов.

Простейшие относятся к подцарству *Protozoa* (от греч. *protos* – первый, *zoon* – животное), к царству животных – *Animalia*. Некоторые из них являются

безвредными обитателями кишечника (например, *кишечная амеба*), другие реализуют свою патогенность обычно при массивном заражении на фоне иммунодефицитных состояний (*лямблии*, *пневмоцисты*) и, наконец, часть видов представлена тканевыми и кровяными паразитами, вызывающими острые или хронические заболевания (*лейшмании*, *трипаносомы*, *малярийные плазмодии*).

Медицинское значение имеют:

1. *Tun Sarcomastigophora*, подтип *Sarcodina*. Тело саркодовых лишено пелликулы, передвигаются за счет псевдоподий, с помощью которых так же происходит захват и погружение в цитоплазму питательных веществ. Половой путь размножения у саркодовых отсутствует. При неблагоприятных условиях они образуют цисту. К этому подтипу относятся различные виды амеб. У человека паразитирует дизентерийная амеба (*Entamoeba histolytica*) (рис. 41), вызывающая амебную дизентерию или амебиаз.



Рис. 41. *Entamoeba histolytica*
(<https://autogear.ru>)

2. *Tun Sarcomastigophora*, подтип *Mastigophora* (*жгутиконосцы*). Характерная особенность – наличие одного или нескольких жгутиков. Принципиальное отличие жгутиков простейших от жгутиков бактерий заключается в наличии кинетопласта – особой органеллы, расположенной у основания жгутика и вырабатывающей энергию для его движения. У некоторых видов жгутиконосцев движение обеспечивает ундулирующая мембрана – тонкая гребнеобразная перепонка, продольно соединяющая жгутик с телом простейшего. Из паразитических простейших в этот подтип входят трипаносомы (*Trypanosoma gambiense*), лямблии (*Giardia lamblia*), лейшмании (*Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*) вызывающие соответственно африканскую сонную болезнь (трипаносомоз), лямблиоз и лейшманиоз (рис. 42).

3. *Tun Ciliophora* (*реснитчатые, инфузории*). Тело этих простейших покрыто пелликулой со множеством коротких ресничек, при помощи которых они передвигаются. Патогенным представителем ресничных является *Balantidium coli* – возбудитель балантидиоза, поражающий толстый кишечник человека (рис. 43). Их жизненный цикл состоит из двух фаз – бесполой (размножение поперечным делением) и половой (конъюгация).

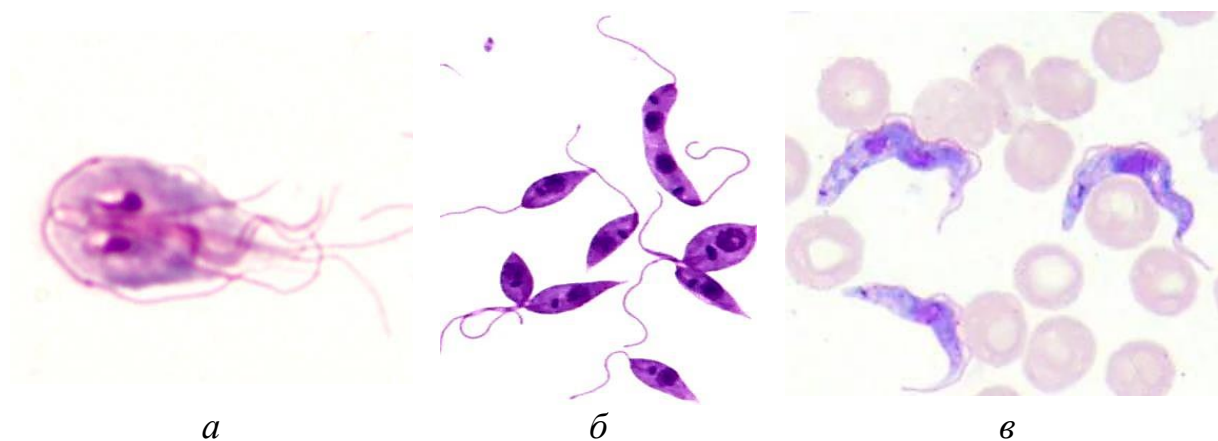


Рис. 42. Морфология жгутиконосцев:
а – лямблии, б – лейшмании, в – трипаносомы (<https://medicine-live.ru>)

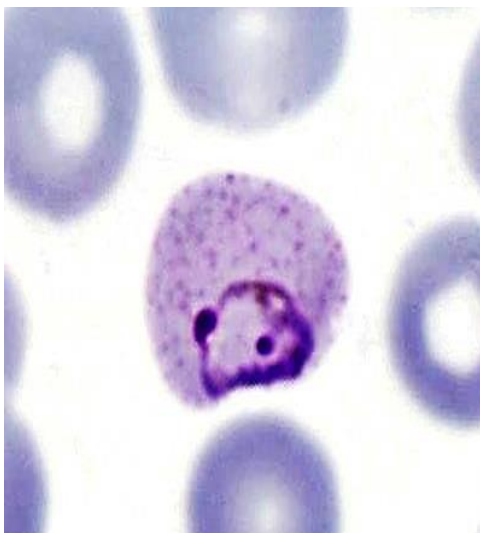


Рис. 43. *Balantidium coli*
(<https://medicine-live.ru>)

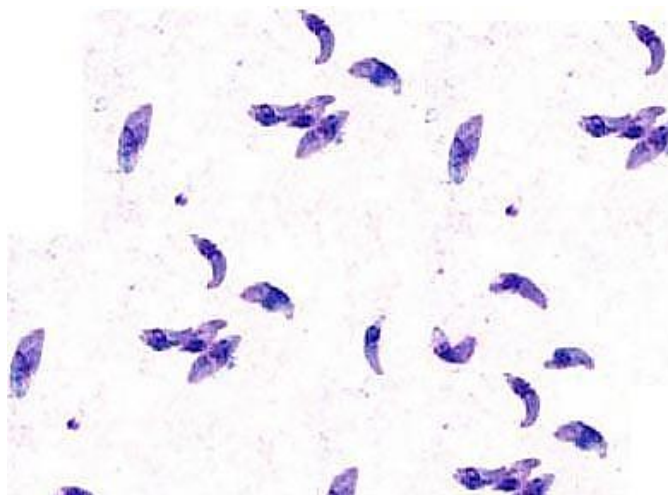
4. *Тун Apicomplexa, класс Sporozoa (споровики).* Класс состоит исключительно из паразитических простейших, многие споровики – внутриклеточные паразиты. Органеллы движения у большинства отсутствуют. Для них характерны как исключительно половой путь развития, так и чередование полового и бесполого поколений, обычно связанное с переменой хозяев. К классу относятся малярийные плазмодии (*Plasmodium vivax, malariae, ovale, fallciparum*), вызывающих малярию и токсоплазмы (*Toxoplasma gondii*), вызывающая токсоплазмоз (рис. 44).

Методы исследования. Для изучения простейших готовят временные (нативные) и постоянные (окрашенные) препараты. Нативные препараты готовят методом «раздавленной капли» или «висячей капли» с добавлением теплого физиологического раствора или витальных прижизненных красителей: трипанового синего или нейтрального красного. При микроскопии нативных препаратов используется малое (×80) или большое увеличение (×400) светлого или фазово-контрастного микроскопов. При исследовании простейших в окрашенном виде чаще всего используют окраску по Романовскому–

Гимзе, в результате – цитоплазма простейшего окрашивается в голубой цвет, ядро и жгутики – в красновато-фиолетовый.



а



б

*Рис. 44. Морфология споровиков: а – малярийный плазмодий (стадия шизонта),
б – токсоплазмы (<https://medicine-live.ru>)*

Раздел 2. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Физиология микроорганизмов – раздел общей микробиологии, изучающий особенности развития, питания, энергетического обмена и других процессов жизнедеятельности микроорганизмов. Изучение физиологии патогенных и условно-патогенных микроорганизмов важно для постановки микробиологического диагноза, понимания патогенеза, назначения лечения и проведения профилактики инфекционных заболеваний, а также для регуляции взаимоотношений человека с окружающей средой и т.д.

2.1. ПИТАНИЕ, ДЫХАНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Питание бактерий

Транспорт веществ в бактериальную клетку. Для осуществления процессов метаболизма питательные вещества проникают в бактериальную клетку извне через цитоплазматическую мембрану, при этом, клеточная стенка не служит препятствием для прохождения ионов и мелких молекул. Высокомолекулярные соединения сначала расщепляются ферментами микробных клеток, а затем поглощаются.

Различают следующие механизмы транспорта:

- 1) простая или пассивная диффузия;
- 2) облегченная диффузия;
- 3) активный транспорт;
- 4) транслокация радикалов.

Простая (пассивная) диффузия идет по градиенту концентрации (рис. 45 а), затрат энергии при этом не происходит. Путем простой диффузии в клетку проникают вода, чужеродные для нее вещества – яды, ингибиторы, лекарственные препараты. Простая диффузия не специфична, для нее имеет значение только величина молекул.

Облегченная диффузия осуществляется по градиенту концентрации, без затрат энергии, с участием мембранных белков-переносчиков *пермеаз*. Пермеазы на внешней стороне клетки соединяются с субстратом, переносят его в клетку, где комплекс расщепляется с его высвобождением (рис. 45 б). При облегченной диффузии в клетку проникают те молекулы, концентрация которых в цитоплазме ниже, чем в окружающей среде.

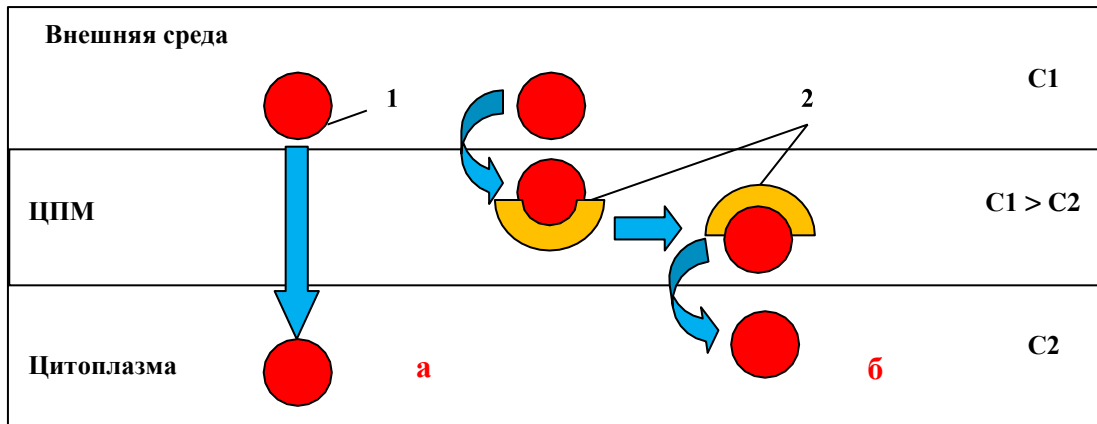


Рис. 45. Простая (а) и облегченная (б) диффузия: ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, С – концентрация веществ/ионов, транспортируемые вещества (1), белки – пермеазы (2)

Активный транспорт идет против градиента концентрации. Он тоже происходит с участием субстратных белков ферментов, но при этом затрачивается энергия, а проникшие в клетку вещества накапливаются в ней (рис. 46 а). Транслокация радикалов. При транслокации радикалов происходит химическая модификация переносимых молекул, тогда как при пассивной диффузии, облегченной диффузии и активном транспорте они поступают в клетку в химически неизменном виде (рис. 46 б).

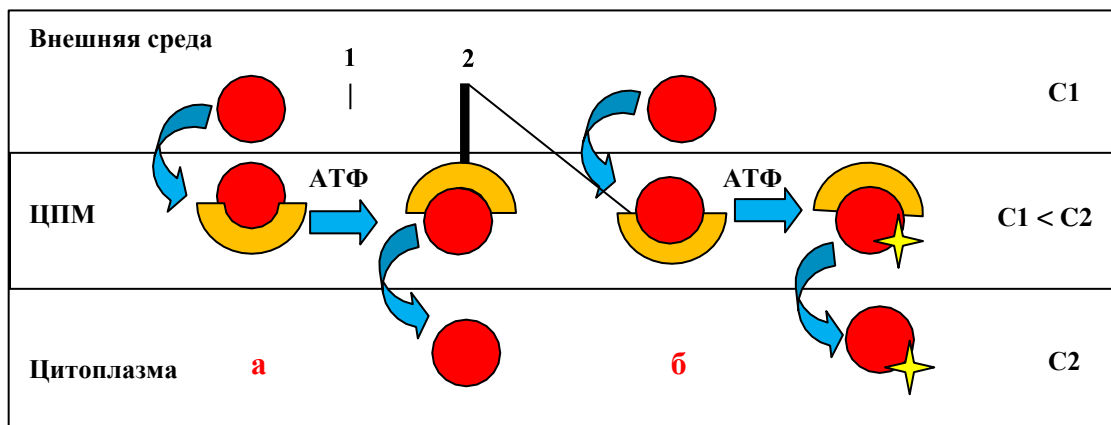


Рис. 46. Активный транспорт (а) и транслокация радикалов (б): ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, С – концентрация веществ/ионов, транспортируемые вещества (1), белки – пермеазы (2)

Бактериальная клетка выделяет продукты метаболизма, ферменты, токсины, которые выходят тремя путями:

1. Фосфотрансферная реакция. Происходит при фосфорилировании переносимой молекулы.
2. Котрансляционная секреция (сигнальный транспорт). В этом случае син-

тезируемые молекулы должны иметь особую лидирующую последовательность аминокислот, чтобы прикрепиться к мембране и сформировать канал, через который молекулы белка смогут выйти в окружающую среду. Таким образом, выходят из клетки бактерий токсины столбняка, дифтерии и др.

3. Почкование мембраны. Молекулы, образующиеся в клетке, окружаются мембранным пузырьком, который «отшнуровывается» в окружающую среду.

Химический состав бактериальной клетки

Основу микробной клетки составляет вода – 80–90% общей массы. Вода находится в свободном и связанном состоянии. Свободно содержащаяся в клетке вода необходима бактериям как растворитель органических и минеральных соединений, дисперсионная среда для коллоидов, источник водородных и гидроксильных ионов, фактор осмотического давления (тургор клетки). С водой связаны основные процессы жизнедеятельности бактериальной клетки – питание, дыхание, рост и размножение.

Сухой остаток (10–20% массы клетки бактерий) представляет смесь органических и минеральных соединений (рис. 47). Органические компоненты химического состава бактерий – это белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, витамины и др.

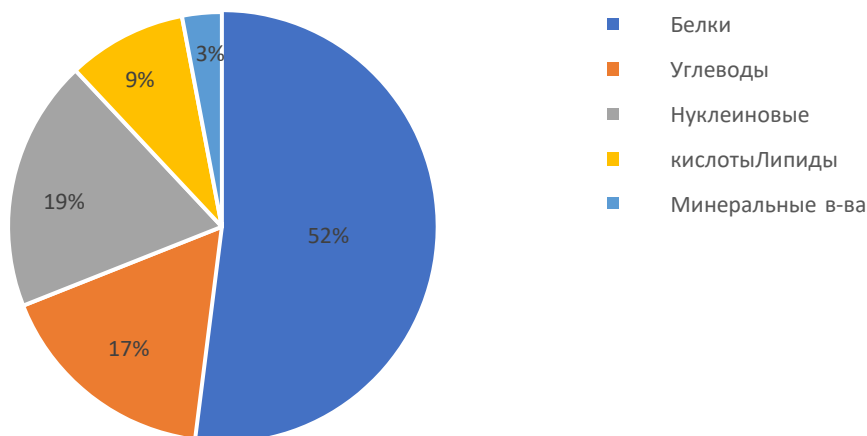


Рис. 47. Химический состав сухого остатка бактериальной клетки

Белки составляют более 50% сухого остатка клетки микроорганизмов, распределены в цитоплазме, нуклеоиде, входят в состав структуры клеточной стенки. Они выполняют пластическую и строительную функции, участвуют в процессе роста и размножения, определяют видовые особенности бактерий; характеризуют антигенные и иммуногенные свойства, обладают токсичностью и вирулентностью, в составе ферментов характеризуют биохимическую активность бактерий. Различают простые и сложные белки бактерий. Простые белки (протеины) при гидролизе распадаются до аминокислот и используются клеткой как источник углерода. Сложные белки в зависимости от характера

соединений небелковой природы делятся на нуклеопротейны, хромопротейны, липопротейны и др. Сложные белки наиболее важны для жизнедеятельности микроорганизмов.

Нуклеиновые кислоты представлены двумя типами – ДНК и РНК. ДНК содержится в нуклеоиде и обуславливает генетические свойства микроорганизмов. РНК принимает участие в биосинтезе клеточных белков, содержится в рибосомах и цитоплазме. Общее количество нуклеиновых кислот колеблется от 10 до 30% сухого вещества микробной клетки и зависит от ее вида и возраста.

Углеводы (12–18% сухого вещества) используются в качестве источника энергии и углерода. Клетки микроорганизмов содержат простые (моно- и дисахариды) и высокомолекулярные (полисахариды) углеводы. У ряда бактерий могут быть включения, по химическому составу напоминающие гликоген и крахмал, они играют роль запасных питательных веществ. Углеводный состав различен у разных видов микроорганизмов и зависит от их возраста и условий развития.

Липиды у большинства бактерий составляют 5–10%, у дрожжеподобных грибов и микобактерий достигают до 40% сухого остатка. Значительная часть липидов находится в комплексной связи с белками и углеводами. Они являются необходимыми компонентами цитоплазматической мембраны и клеточной стенки и выполняют роль запасных питательных веществ, энергетического материала, фактора устойчивости микроорганизмов к действию внешней среды (спора, клеточная стенка микобактерий).

Основу органических веществ составляют четыре элемента: азот, углерод, водород и кислород. Эти элементы относят к макроэлементам наряду с серой, калием, кальцием, фосфором, магнием, железом. Микроэлементы нужны бактериям в очень малых, следовых количествах. Они представлены марганцем, молибденом, цинком, медью, кобальтом, никелем, хлором, бромом и др.

Одним из самых необходимым химическим элементом для бактерий является углерод, он составляет основу белков, углеводов, жирных кислот и т.д. По источнику углерода бактерии делятся на две большие группы: *автотрофы* и *гетеротрофы* (рис. 48).

Автотрофы (от греч. *autos* – сам и *trophe* – пища, питание) – бактерии, которые синтезируют все необходимые для жизни органические вещества из неорганических веществ (в основном, двуокиси углерода, карбонатов). *Гетеротрофы* (греч. *heteros* – другой, разный и *trophe* – питание) – организмы, использующие для своего питания готовые органические соединения. В зависимости от индивидуальных особенностей микроорганизмов источником углерода могут быть спирты, углеводы, ароматические соединения, органические кислоты. Гетеротрофы, в свою очередь, разделяются на *сапрофитов*, живущих за счет органических соединений, поступающих в бактериальную клетку из

внешней среды (продукты гниения), и *паразитов* (паратрофов), способных утилизировать только продукты метаболизма внутри живой клетки. Паразитизм может быть факультативным и облигатным.

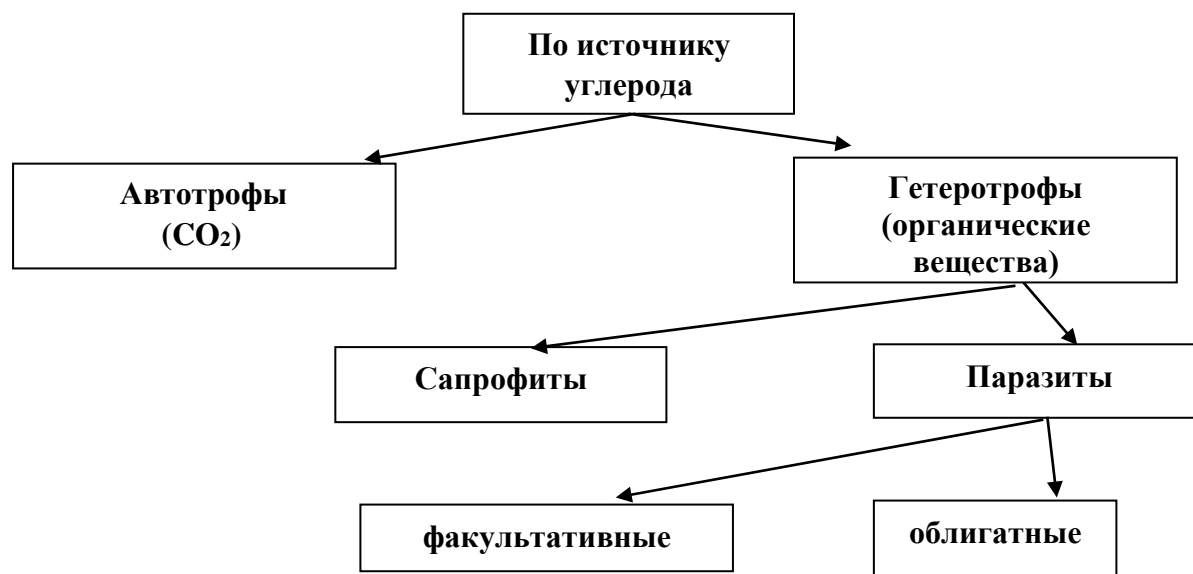


Рис. 48. Классификация бактерий по источнику углерода

Для роста микроорганизмов также необходим азот, который входит в состав органических соединений. Это могут быть соли аммония, нитраты или отдельные аминокислоты. Для удовлетворения потребности бактерий в азоте используют продукты неполного расщепления белков животного происхождения – гидролизаты, пептоны и сложные белковые смеси – нативную сыворотку животных, асцитическую жидкость и др.

Кроме углерода, азота и других химических элементов, многие бактерии нуждаются в факторах роста, к которым относятся витамины, основания нуклеиновых кислот и другие биологически активные вещества. По этому признаку микроорганизмы можно разделить на две группы: *ауксотрофы*, для которых в среде необходимо наличие одного или нескольких факторов роста и *прототрофы*, они могут сами синтезировать факторы роста и не нуждаются в добавлении их в питательные среды.

Для осуществления биохимических процессов бактерии нуждаются в энергии. По способу получения энергии бактерии принято делить на две группы: *хемотрофы* и *фототрофы*. Фототрофы для удовлетворения энергетических потребностей используют энергию света. Хемотрофы используют энергию окисления различных соединений. В зависимости от окисляемого субстрата среди хемотрофных организмов выделяют *литотрофы* и *органотрофы*. Хемолитотрофы в качестве доноров электронов используют неорганические вещества, а хемоорганотрофы в качестве доноров электронов используют органические соединения (рис. 49).

Энергия у бактерий аккумулируется в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Синтез АТФ у бактерий может происходить в результате:

- дыхания (окислительного метаболизма);
- брожения (ферментативного или бродильного метаболизма);
- смешанного метаболизма.



Рис. 49. Классификация бактерий по источнику энергии

Дыхание бактерий

Дыхание бактерий (энергетический метаболизм) – это цепь последовательных окислительно-восстановительных реакций, сопровождающихся переносом электронов от окисляемого вещества к восстанавливаемому при участии ферментов. В процессе дыхания высвобождается энергия (АТФ). Дыхание предполагает функционирование *дыхательной цепи*. В зависимости от конечного акцептора электронов различают *анаэробное* и *аэробное* дыхание. Если конечным акцептором электронов выступает молекулярный кислород (O_2), тогда осуществляется аэробное дыхание. Если в качестве акцептора электронов выступают неорганические соединения (NO_2 , SO_4 , SO_3), возникает анаэробное дыхание. В том случае, когда органические вещества служат одновременно и донорами, и акцепторами водорода, метаболический процесс называется *брожением (ферментацией)*. В результате брожения образуются органические кислоты, спирты, газы. В зависимости от конечных продуктов различают спиртовое, молочнокислое, уксуснокислое, маслянокислое брожение.

По потребности в кислороде микроорганизмы можно разделить на 5 групп (рис. 50):

1. Строгие (облигатные) аэробы – рост и размножение этих микроорганизмов прекращается в отсутствие O_2 . К ним относятся, например, *менингококки*.

2. Строгие (облигатные) анаэробы не переносят присутствия кислорода, так как образующиеся токсические производные кислорода (перекись водорода, супероксидный и гидроксильный радикалы) губительны для самих же бактерий из-за отсутствия у них ферментов, разрушающих эти токсические продукты (каталазы, пероксидазы). К строгим анаэробам относятся *клостридии столбняка, ботулизма, газовой гангрены*, некоторые *бактероиды*.

3. Факультативные анаэробы наиболее обширная группа патогенных микроорганизмов, которые способны использовать в качестве акцепторов электронов как молекулярный кислород, так и органические соединения, а также переключаться на процесс брожения в отсутствии молекулярного кислорода.

4. Микроаэрофильные бактерии хорошо растут при сниженном парциальном давлении кислорода, но при повышенном содержании CO₂ (представители рода *Brucella*).

5. Аэрофилы нуждаются в повышенном содержании кислорода (*холерный вибрион, возбудители дифтерии, туберкулеза*).

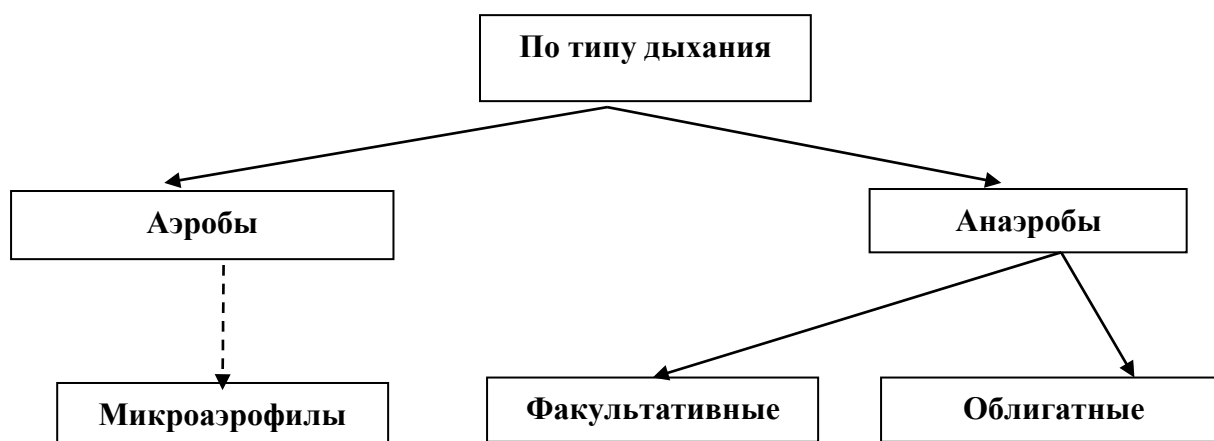


Рис. 50. Разделение бактерий по типу дыхания

В процессе дыхания образуется огромное количество энергии (АТФ), которая используется для синтеза органических веществ, передвижения, поддержания осмотического давления и др. Но биологическое значения дыхания этим не ограничивается. В результате химических реакций, сопровождающих дыхание, образуется большое количество промежуточных соединений, из которых могут синтезироваться аминокислоты, жиры, белки, витамины.

Рост и размножение бактерий

Полученные микробной клеткой питательные вещества и энергия используется для роста и размножения бактерий. *Рост* – это увеличение размера и массы отдельной клетки в результате синтеза клеточного материала. После

достижения определенных размеров клетка прекращает рост и начинает делиться (размножаться). *Размножение бактерий* – это способность бактерий к самовоспроизведению (увеличению количества особей). Для подавляющего большинства бактерий характерно бинарное поперечное деление. Перед делением у бактериальных клеток происходит удвоение молекулы ДНК. Процесс деления микробной клетки считается законченным, когда цитоплазма дочерних клеток разделена перегородкой или перетяжкой (рис. 51). У некоторых микроорганизмов размножение происходит путем образования почки, которая по величине меньше исходной клетки.

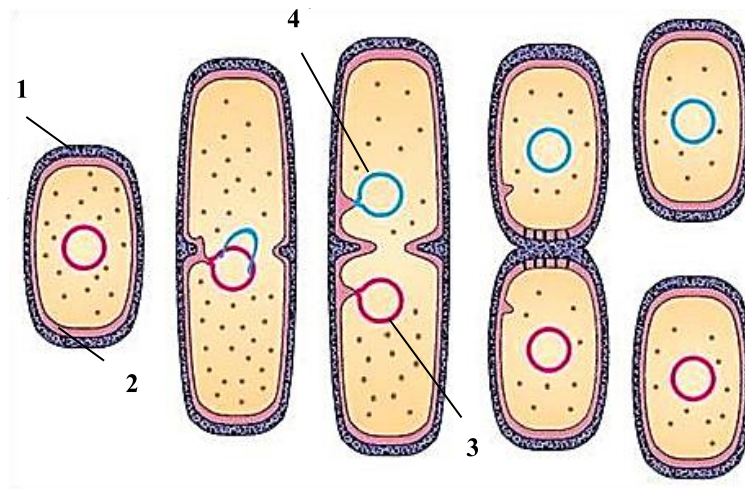


Рис. 51. Схема бинарного деления бактериальной клетки: 1 – клеточная стенка; 2 – цитоплазматическая мембрана; 3, 4 – хромосомы (<https://studfile.net>)

У большинства бактерий каждая клетка делится в течение 15–30 мин. Есть виды, которые делятся медленно, 1 раз в 24 ч, например, микобактерии туберкулеза.

2.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ

Питательные среды

Для культивирования бактерий используют среды, которые должны удовлетворять потребностям бактерий в питательных веществах, иметь адекватное значение величины рН, изотоничность и быть стерильными, а по возможности, и прозрачными.

Питательные среды принято делить на несколько групп: среды, которые отличаются по составу и происхождению, физическому состоянию или консистенции и функциональному или целевому назначению

По происхождению среды бывают естественными (натуральными) и искусственными (синтетическими). К *естественным средам* относят те, в состав

которых входят продукты растительного или животного происхождения. Они содержат все компоненты, необходимые для роста и развития бактерий, но имеют непостоянный химический состав, то есть они нестабильны. Поэтому такие питательные среды не пригодны для изучения метаболизма бактерий, а используются, в основном, для накопления биомассы, поддержания культур бактерий в жизнеспособном состоянии и для диагностических целей, например, для выделений чистых культур бактерий. К естественным средам относятся молоко, кровь и сыворотка крови, отвары и экстракты из природных субстратов, пептонная и мясная вода, мясопептонный бульон и агар, дрожжевые экстракты, картофельные, яичные и желчесодержащие среды. *Синтетические (искусственные) среды* имеют определенный химический состав и точное количественное содержание питательных веществ. Их используют для изучения физиологии микроорганизмов. Примерами синтетических сред могут служить среды Козера и Симмонса, используемые для изучения способности бактерий утилизировать цитраты.

В практической микробиологии, как правило, используются комбинированные питательные среды, в которых сочетаются естественные компоненты с неорганическими солями. Примерами таких сред являются среда Цейслера, в состав которой входит мясопептонный агар (МПА), кровь и сахар; среды Гисса, содержащие пептон, агар, сахар и индикатор; среда Раппопорт, состоящая из желчного бульона, глюкозы и индикатора и др.

По составу среды можно разделить на простые и сложные. К *простым* относятся мясная и пептонная вода, мясопептонный бульон и агар. Добавление к таким средам одного или нескольких ингредиентов – углеводов, крови, сыворотки и других составляющих делают их *сложными*.

По физическому состоянию (консистенции) питательные среды могут быть жидкими, полужидкими, плотными или твердыми, сыпучими или сухими. *Жидкие* среды представлены, как правило, водными растворами необходимых для жизни веществ. Их используют для накопления биомассы, обогащения культур бактерий, изучения метаболизма. *Полужидкие и плотные* питательные среды получают из жидких, добавляя к ним агар-агар или желатин. Концентрация агара для полужидких сред 0,5–0,7%, а для плотных 1,5–2%. Полисахарид агар получают из некоторых видов морских водорослей, его высушивают и хранят в виде пластин или порошка. Бактерии не используют агар в качестве субстрата, и поэтому состав плотной питательной среды зависит от состава жидкой среды, к которой добавлен агар. Агар плавится примерно при температуре 100 °С и застывает при 40 °С. Агаризированные среды разливают в пробирки или чашки Петри в расплавленном состоянии, а затем охлаждают. Применение желатина ограничено тем, что он разжижается протеолитическими ферментами бактерий и его применяют, в основном, в питательных средах для диагностических целей.

Сухие питательные среды представляют смеси составляющих питательных сред определенного состава. Перед использованием их растворяют в воде в соответствии с инструкцией, указанной на этикетке, устанавливают необходимое значение pH и стерилизуют.

По целевому назначению питательные среды делят на несколько групп. *Основные* или *универсальные среды*, например, мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ); на них могут расти многие виды неприхотливых микроорганизмов. *Специальные среды* используют для культивирования тех бактерий, которые не могут расти на универсальных средах; в состав специальных сред вводят, например, углеводы для роста стрептококков, желчь для культивирования сальмонелл, дефибринированную кровь для дифтерийной палочки. Среди специальных сред можно выделить *избирательные* (элективные, селективные) среды. Они предназначены для выделения и культивирования определенного вида бактерий из материала, содержащего большое количество различных микроорганизмов. Например, для выделения возбудителя туберкулеза из мокроты больного используют среду Левинштейна–Йенсена, сальмонелл из испражнений – среду Плоскирева. В сложном составе таких сред содержатся вещества, ингибирующие рост посторонней микрофлоры, но не влияющие на жизнедеятельность искомого вида бактерий. В состав некоторых сред входят не только вещества, подавляющие рост отдельных групп микроорганизмов, но и стимуляторы роста отдельных видов бактерий.

Дифференциально-диагностические среды (ДДС) предназначены для идентификации бактерий по биохимическим свойствам. В основе использования этих сред лежат различия в ферментативном составе бактерий и способности ферментов расщеплять тот или иной субстрат (рис. 52). Существуют среды для определения гликолитической активности бактерий, в их состав входят один (среды Гисса) или два (среды Ресселя) сахара. Протеолитическую активность бактерий изучают на средах с желатиной, свернутой сыворотке. Возможность ферментировать более простые азотсодержащие соединения изучают на питательных средах с аминокислотами, бульоне с мочевиной.

Разновидностью дифференциально-диагностических сред являются *хромогенные питательные среды*. Это питательные среды со специальными хромогенными субстратами, которые в присутствии определенного вида микроорганизмов вызывают появление специфического окрашивания колоний (рис. 53) и применяются для культивирования, дифференциации и селекции микроорганизмов.

Консервирующие среды используют для транспортировки и хранения в течение длительного времени материала, содержащего бактерии. В их состав входят глицерин, хлорид натрия и фосфатно-буферные растворы.

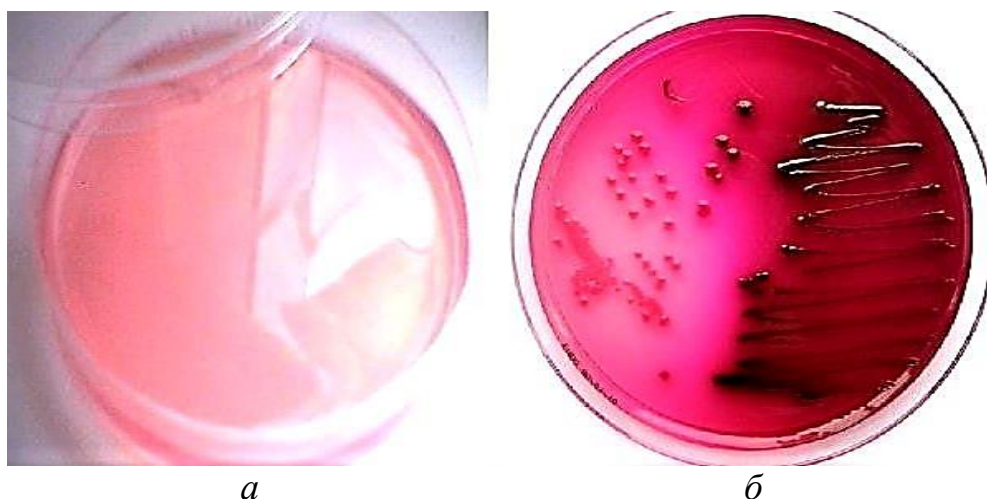


Рис. 52. Дифференциально-диагностическая среда Эндо:
а – среда без посева; б – среда с посевом

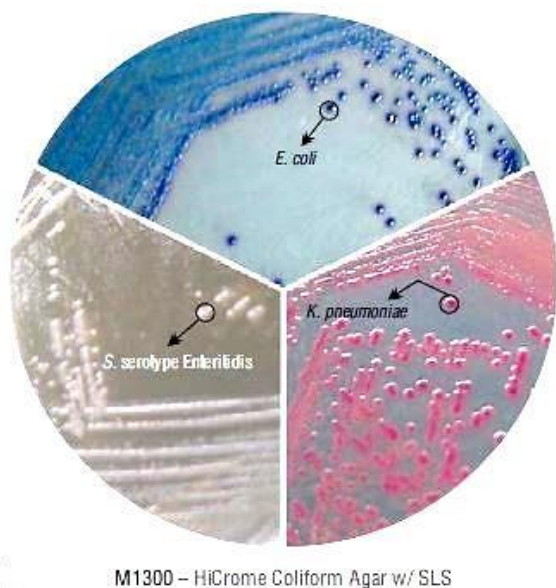


Рис. 53. Хромогенные среды.
Среда М 1300 – HiCromt Coliform Agar w/SLS
(<https://bio-media.ru>)

Условия культивирования бактерий

Для роста бактерий, кроме состава питательной среды, имеют значение кислотность среды, аэрация, температура, свет и влажность. Большинство бактерий растет при рН – 6,8–8,0; то есть в нейтральной среде.

Газовый состав среды также важен для роста и размножения микроорганизмов. Для бактерий, культивируемых на плотных питательных средах или в небольших объемах жидких сред достаточно кислорода, присутствующего в атмосфере. Для культивирования бактерий-аэробов в промышленных масштабах требуется принудительная аэрация путем продувания кислорода в реактор или ферментёр, а для культивирования анаэробов – создание бескислородных условий. Для этого бактерии засевают уколом в столбик плотной питательной

среды, помещают посевы в специальные приборы – анаэроостаты, где газовая фаза представлена инертным газом или создан вакуум, а кислород из среды удаляют с помощью кипячения или химических методов (рис. 54). Для выделения чистых культур анаэробов используют специальную среду Китта–Тароцци, а также культивирование в стеклянных трубках по методу Виньяль–Вейона.



Рис. 54. Оборудование для культивирования анаэробных бактерий: анаэроостат I-CUBE (а) и анаэроостат GasPak 100 (б)

Рост и размножение микроорганизмов происходит при благоприятной температуре. Поэтому культивирование их осуществляют в специальных шкафах – термостатах, где поддерживается оптимальная температура.

При культивировании микроорганизмов в лабораторных или производственных условиях, для получения больших количеств биомассы, используют две различные технологические системы: *постоянное* или *периодическое и непрерывное* или *проточное* культивирование. В первом случае размножение бактерий происходит в закрытом сосуде до тех пор, пока плотность клеточной популяции не достигнет критической концентрации и не будут исчерпаны запасы питательной среды, а продукты метаболизма не начнут проявлять токсические свойства. Культуры бактерий, которые при росте находятся в закрытой системе, называют *периодическими* и имеют закономерное развитие, характеризующееся кривой роста (рис. 55). При этом выделяют следующие фазы:

1. Начальная – лаг-фаза (от англ. *lag* – отставать). Период от посева бактерий до начала размножения. В это время происходит адаптация бактериальных клеток к новым условиям культивирования. Продолжительность составляет в среднем 2–5 ч.

2. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза. В этот период происходит постоянное деление клеток с максимальной скоростью. Эта скорость зависит от вида бактерий и питательной среды. Время удвоения клеток называется *временем генерации*.

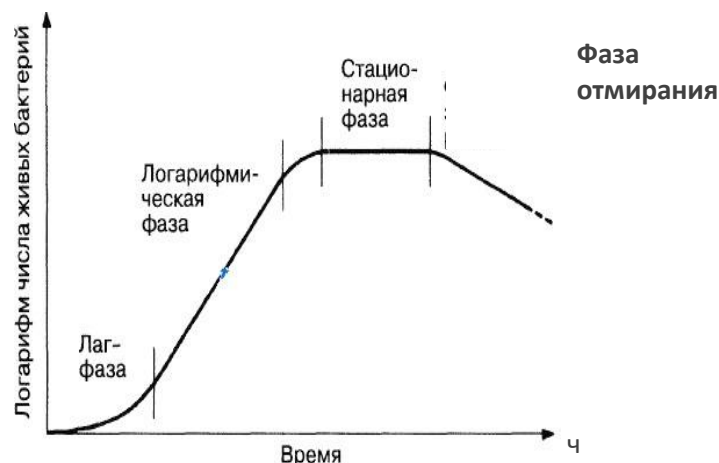


Рис. 55. Кривая роста бактерий в жидкой питательной среде.
Фазы размножения бактерий

3. Стационарная фаза. Характеризуется постоянным числом бактериальных клеток, уменьшением концентрации питательных веществ в среде, накоплением токсических продуктов обмена.

4. Фаза отмирания. Наступает в результате накопления токсических продуктов обмена в среде или в результате аутолиза бактерий.

В промышленных условиях часто используют проточное, или непрерывное культивирование. При этом в реактор или ферментёр непрерывно при перемешивании поступает свежая питательная среда, а продукты метаболизма и накопившаяся бактериальная масса автоматически удаляются. Такое культивирование можно осуществлять в специальных аппаратах — *хемоста-тах* и *турбидостатах*, где необходимый объем питательной среды поступает автоматически, в зависимости от концентрации бактериальных клеток (рис. 56).

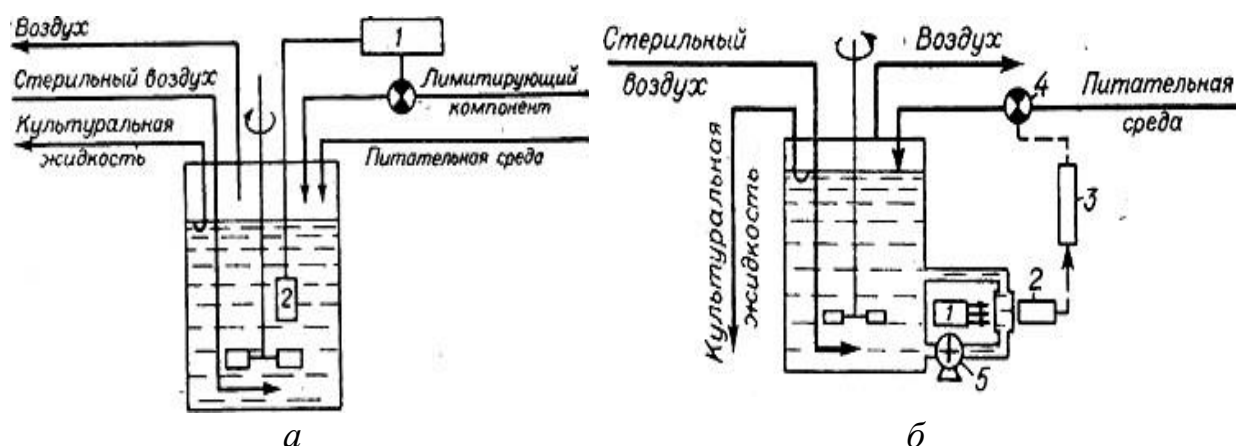


Рис. 56. Принципиальная схема хемостата (а) и турбидостата (б)

Время генерации большинства патогенных бактерий составляет 20–30 мин. Такие культуры формируются в течение 18–24 ч. Клетки некоторых видов бактерий делятся с большими временными интервалами, поэтому

увеличение численности популяций таких культур происходит в течение длительного времени, например, лептоспиры растут 8–10 сут, микобактерии туберкулеза – 3–4 недели.

Культуральные свойства бактерий

К культуральным или макроморфологическим свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. На плотных питательных средах в зависимости от посева микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха или сплошного газона. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросших из одной клетки (клон клеток). В зависимости от того, где растет микроорганизм (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее), различают *поверхностные, глубинные и донные колонии*. Поверхностные колонии (выросшие на поверхности среды), отличаются разнообразием, они видоспецифичны, и их изучение используется для определения видовой принадлежности (идентификации) исследуемой культуры (рис. 57).

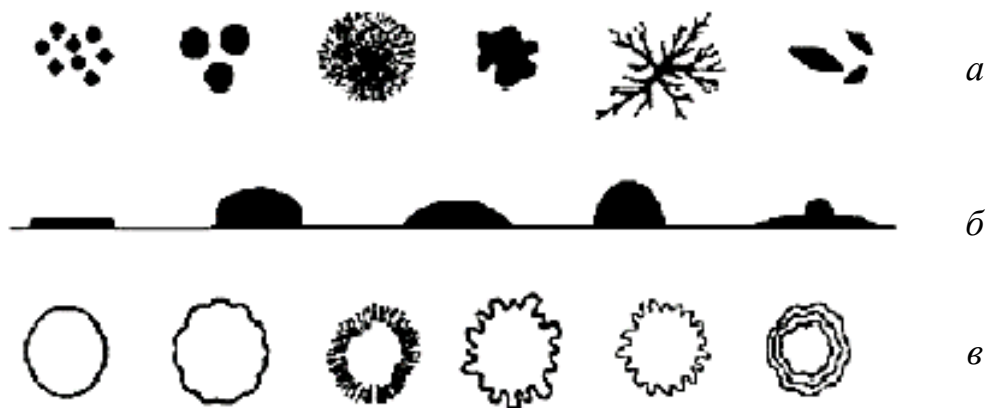


Рис. 57. Характер роста бактерий на плотной питательной среде: форма колонии (а); поверхность (б); характеристика края колоний (в) (<https://lifelib.info>)

При описании колоний учитывают следующие признаки:

- форма колонии – округлая, амёбовидная, ризоидная, неправильная и т.д.;
- размер (диаметр) колонии – очень мелкие (точечные) (0,1–0,5 мм), мелкие (0,5–3 мм), средних размеров (3–5 мм) и крупные (более 5 мм в диаметре);
- поверхность колонии – гладкая, шероховатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;
- профиль колонии – плоский, выпуклый, конусовидный и т.д.;
- прозрачность – тусклая, матовая, блестящая, прозрачная, мучнистая;
- цвет колонии (пигмент) – бесцветная или пигментированная (белая, желтая, золотистая, красная, черная), особо отмечают выделение пигмента в среду с ее окрашиванием;

- край колонии – ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т.д.;
- структура колонии – однородная, мелко или крупнозернистая, струйчатая; край и структуру колонии определяют с помощью лупы или на малом увеличении микроскопа, поместив чашку Петри с посевом на столик микроскопа крышкой вниз;
- консистенция колонии – определяют, прикасаясь к поверхности петлей, колония может быть плотной, мягкой, врастающей в агар, слизистой (тянется за петлей), хрупкой (легко ломается при соприкосновении с петлей).

Различают два основных типа колоний – S и R типы.

Колонии S-типа – круглые, гладкие, блестящие, выпуклые, с ровными краями, влажные.

Колонии R-типа – плоские, шероховатые, матовые, неправильной формы, с исчерченными краями. Однако форма колоний подвержена изменчивости. R-формы колоний могут переходить в S-формы и наоборот.

Глубинные колонии чаще всего похожи на более или менее сплюснутые чечевички (форма овалов с заостренными концами), иногда комочки ваты с нитевидными выростами в питательную среду.

Донные колонии имеют обычно вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну.

Описание роста микроорганизмов при посеве штрихом включает его особенности: скудный, умеренный, обильный; сплошной с ровным или волнистым краем; диффузный; перистый; ризоидный; древовидный. Так же характеризуют цвет, поверхность, консистенцию.

В жидких питательных средах при росте микроорганизмов наблюдается помутнение среды, образование пленки или осадка (рис. 58).

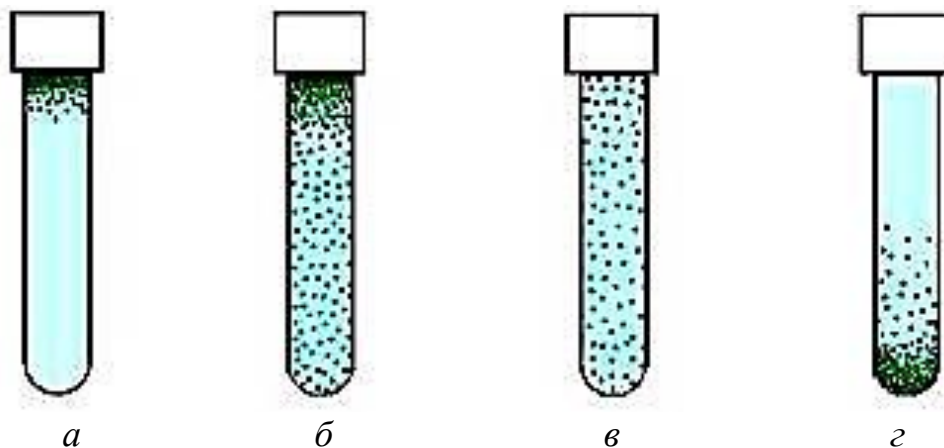


Рис. 58. Характер роста бактерий в МПБ: поверхностный рост (а); диффузное помутнение (б и в); придонный рост (г) (<http://old.gsu.by>)

1. Рост бактерий с равномерным помутнением среды (диффузный рост) характерен для факультативных анаэробов. Степень помутнения может быть

слабая, умеренная, сильная.

2. Придонный рост бактерий является типичным для строгих анаэробов, при этом образуется осадок: скудного, обильного, рыхлого, слизистого, хлопьевидного, зернистого. Питательная среда может быть прозрачной или мутной.

3. Пристеночный рост – образование зерен, рыхлых хлопьев на внутренней поверхности стенок сосуда. Питательная среда при этом остается прозрачной.

4. Поверхностный рост бактерий характеризуется появлением на поверхности среды пленки: тонкой, плотной, рыхлой, гладкой, складчатой, влажной, сухой, кольцеобразной или сплошной. Такой рост наблюдается при культивировании аэробных бактерий.

При росте на полужидких питательных средах подвижные микроорганизмы вызывают выраженное помутнение, неподвижные формы растут только по ходу посева уколом в среду.

Нередко рост микробов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Характерный запах культур некоторых видов бактерий связан с образованием различных эфиров (уксусноэтилового, уксусноамилового и др.), индола, меркаптана, сероводорода, скатола, аммиака, масляной кислоты.

Способность образовывать пигменты присуща многим видам микроорганизмов. Химическая природа пигментов разнообразна: каротиноиды, антоцианы, меланины. Считается, что пигменты защищают бактерии от губительного действия солнечных лучей, поэтому в воздухе так много пигментированных бактерий.

В природе существуют, так называемые, флуоресцирующие бактерии, культуры которых светятся в темноте зеленовато-голубоватым или желтоватым светом. Такие бактерии встречаются, главным образом, в речной или морской воде. К светящимся бактериям (фотобактериям) относятся аэробные бактерии (вибрионы, кокки, палочки).

Ферменты бактерий

Биохимические процессы микроорганизмов осуществляются благодаря наличию в клетке различных ферментов, катализирующих все жизненно необходимые реакции. Так как состав ферментов определяется геномом, то он является видовым признаком. Совокупность ферментативных свойств бактерий называется *биохимическими свойствами бактерий*.

Ферменты – это биологические катализаторы белковой природы. Микробная клетка, подобно клеткам высших организмов, оснащена достаточно активным ферментативным аппаратом. Ферменты микроорганизмов обладают теми же свойствами и функциями, что и ферменты высших организмов. В соответствии с катализирующими реакциями все ферменты разделяют на шесть классов:

1. Оксидоредуктазы – катализируют реакции окисления-восстановления.
2. Трансферазы – катализируют реакции переноса различных групп от донора к акцептору.
3. Гидролазы – катализируют разрыв связей в субстратах с присоединением воды.
4. Лиазы – катализируют реакции разрыва связей в субстрате без присоединения воды или окисления.
5. Изомеразы – катализируют превращения в пределах одной молекулы (внутримолекулярные перестройки).
6. Лигазы (синтетазы) – катализируют присоединение двух молекул с использованием энергии фосфатных связей.

Несмотря на малые размеры микробной клетки, распределение в ней ферментов строго упорядоченно. Ферменты энергетического обмена и транспорта питательных веществ локализованы в цитоплазматической мембране и ее производных. Ферменты белкового синтеза связаны с рибосомами. Многие ферменты не связаны с определенными структурами клетки, а находятся в цитоплазме в растворенном виде.

Ферменты бактерий подразделяются на экзо- и эндоферменты. *Эндоферменты* функционируют только внутри клетки. Они катализируют реакции биосинтеза и энергетического обмена. *Экзоферменты* выделяются клеткой в среду и катализируют реакции гидролиза сложных органических соединений на более простые, доступные для ассимиляции микробной клеткой. К ним относятся гидролитические ферменты, играющие важную роль в питании микроорганизмов.

В зависимости от условий образования ферментов их разделяют на конститутивные и индуцибельные. *Конститутивными* называют ферменты, синтезируемые клеткой вне зависимости от субстрата, на котором развиваются бактерии. Например, ферменты гликолиза. *Индукцибельные ферменты* синтезируются только в ответ на присутствие в среде необходимого для клетки субстрата-индуктора. Индуцированный синтез ферментов идет, пока в среде присутствует индуктор. Индукторами биосинтеза являются многие питательные вещества. К индуцибельным относится большинство гидролитических ферментов.

Известны также ферменты, которые получили название *аллостерических*. Кроме активного центра у них имеется регуляторный или аллостерический центр, который в молекуле фермента пространственно разделен с активным центром. Аллостерическим (от греч. *allos* – иной, чужой) он называется потому, что молекулы, связывающиеся с этим центром, по строению (стерически) не похожи на субстрат, но оказывают влияние на связывание и превращение субстрата в активном центре, изменяя его конфигурацию. Молекула фермента может иметь несколько аллостерических центров. Вещества, связы-

вающиеся с аллостерическим центром, называют аллостерическими эффекторами. Они влияют на функцию активного центра: или облегчают ее, или затрудняют. Соответственно аллостерические эффекторы называются положительными (активаторы) или отрицательными (ингибиторы). Аллостерические ферменты играют важную роль в тонкой регуляции метаболизма бактерий.

У возбудителей инфекционных заболеваний имеются *ферменты патогенности*, разрушающие ткани и клетки макроорганизма, обуславливая тем самым распространение патогенных микроорганизмов и их токсинов в инфицированных тканях. К таким ферментам относятся *плазмокоагулаза, нейраминидаза, коллагеназа, лецитиназа, гиалуронидаза* и др. Гиалуронидаза стрептококков, например, расщепляет гиалуроновую кислоту в мембранах клеток соединительных тканей макроорганизма, что способствует распространению возбудителей и их токсинов в организме. Плазмокоагулаза является главным фактором патогенности стафилококков, так как участвует в превращении протромбина в тромбин, который вызывает образование фибриногена, в результате чего каждая бактерия покрывается пленкой, предохраняющей ее от фагоцитоза.

Ферменты микроорганизмов нашли широкое применение в биотехнологии, в том числе в генетической инженерии, для получения иммунобиологических препаратов (например, вакцин), различных биологически активных веществ, а также ряда продуктов в легкой и пищевой промышленности.

Ферменты микроорганизмов характеризуют их видовые свойства и поэтому их исследуют с целью идентификации бактерий. В зависимости от субстрата *гидролитические ферменты* принято делить на две большие группы:

1. *Гликолитические или сахаролитические ферменты*, субстратом для которых являются различные сахара, а продуктами их расщепления – кислоты, спирты, альдегиды, H_2O и CO_2 .

2. *Протеолитические ферменты*, расщепляющие белки с образованием полипептидов, аминокислот, аммиака, индола, сероводорода.

Для изучения активности ферментов при идентификации микроорганизмов широко используют ДДС, в состав которых входят определенные субстраты – сахара или белки.

При исследовании сахаролитической активности бактерий распространены монособстратные дифференциально-диагностические среды Гисса (пестрый ряд Гисса), лактозосодержащие среды Эндо, Левина, Плоскирева, дисубстратные среды Ресселя (рис. 59), полисубстратные среды Клиглера и Олькеницкого. Последние могут служить и для изучения протеолитических свойств бактерий, так как содержат компоненты, способные выявить аммиак и сероводород, высвобождающиеся при расщеплении аминокислот некоторыми микроорганизмами (рис. 60).

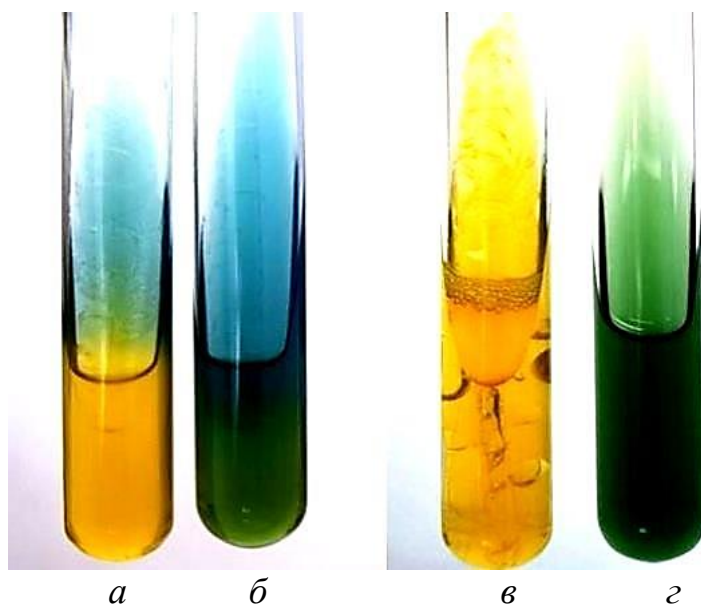


Рис. 59. Идентификация бактерий по гликолитическим свойствам.
Среда Ресселя I: *S. flexneri* (а); *A. faecalis* (б); *E. coli* (в); контроль (г)

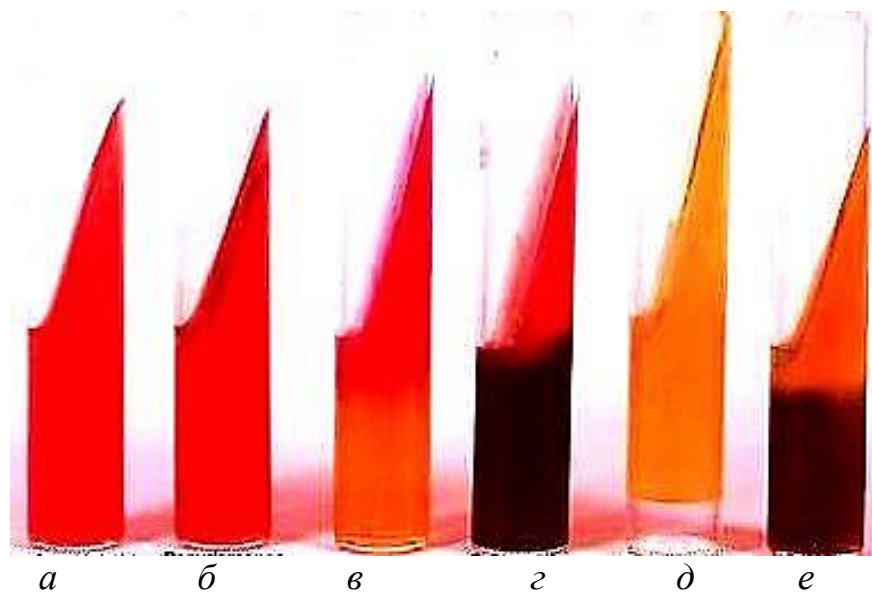


Рис. 60. Идентификация бактерий по гликолитическим и протеолитическим свойствам.
Среда Клиглера: контроль (а); *P. aeruginosa* (б); *S. sonnei* (в);
S. typhi (г); *E. coli* (д); *P. mirabilis* (е)

Протеолитические ферменты бактерий определяются по выделению индола, сероводорода, расщеплению некоторых аминокислот, например, фенилаланина, лизина, цистина. Протеолитические ферменты способны изменять (разжижать) желатин.

В бактериологических лабораториях широко применяют тест-системы и экспресс-методы для ориентировочного изучения биохимических свойств микроорганизмов. Наиболее часто используют систему индикаторных бумаг

(СИБ). СИБы представляют диски фильтровальной бумаги, пропитанные растворами сахаров или других субстратов в сочетании с индикаторами. Такие диски опускают в пробирку с выросшей в жидкой питательной среде культурой. По изменению цвета диска с субстратом судят о работе фермента. Микротест-системы для изучения идентификации энтеробактерий представлены одноразовыми пластиковыми контейнерами со средами, содержащими различные субстраты, с добавлением индикаторов. Посев чистой культуры микроорганизмов в такие тест-системы позволяет быстро выявить способность бактерий утилизировать цитраты, глюкозу, сахарозу, выделять аммиак, индол, разлагать мочевины, лизин, фенилаланин и т.д. (рис. 61).



Рис. 61. Тест-система для энтеробактерий – API.
Верхний планшет – все тесты положительные, нижний – все отрицательны

Выделение чистых культур микроорганизмов

Чистой культурой называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы одного вида. Выделение чистых культур бактерий – обязательный этап бактериологического исследования в микробиологической диагностике инфекционных болезней, в изучении микробной загрязненности различных объектов окружающей среды, и, в целом, при работе с микроорганизмами. Исследуемый материал (гной, мокрота, испражнения и другой материал от больных; вода, почва, воздух, пищевые продукты,) обычно содержит ассоциации микроорганизмов. Выделение чистой культуры позволяет изучить морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие признаки, по совокупности которых определяется видовая и типовая принадлежность возбудителя, то есть проводится его *идентификация*.

Для выделения чистых культур микроорганизмов используют методы:

1. **Метод секторов** предполагает посев бактериологической петлей исследуемого материала на поверхность агаризованной среды в чашках Петри. На первом этапе петлей с культурой наносят ряд параллельных штрихов на агаризованной среде (рис. 62 А). Петлю стерилизуют и проводят серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым (рис. 62 Б). Затем петлю вновь стерилизуют и штрихи наносят в направлении В (рис. 62), а после очередной

стерилизации – в направлении Γ (рис. 62). Чашки помещают в термостат и через определенное время учитывают результаты. Обычно на штрихах A и B вырастает большое число колоний (иногда сплошной рост), тогда как на штрихах B и Γ формируются изолированные колонии.

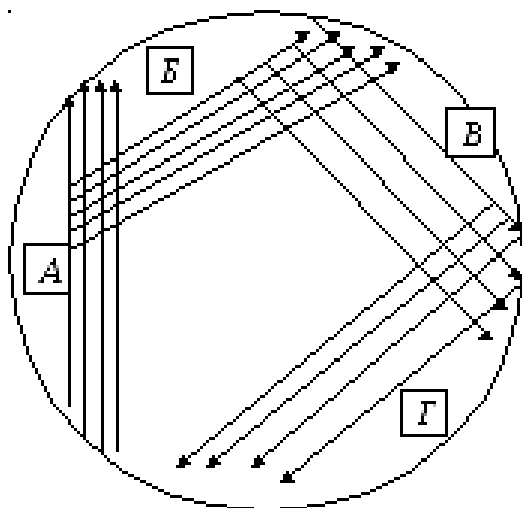


Рис. 62. Схема посева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

2. Метод Коха («пластинчатые разводки») – последовательное разведение исследуемого материала в расплавленном агаре (температура 48–50 °С), с последующим розливом в чашки Петри, где агар застывает. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений, где бактерий становится мало и, в дальнейшем, при росте на чашках Петри появляются изолированные колонии, образующиеся из одной исходной материнской клетки. Из изолированных колоний в глубине агара получают чистую культуру бактерий пересевом на свежие среды.

3. Метод Шукевича – применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов, обладающих «ползущим» ростом. Посев исследуемого материала производят в конденсационную воду у основания, скошенного агара. Подвижные микробы (протей) способны подниматься вверх по скошенному агару, неподвижные формы остаются расти внизу на месте посева. Пересевая верхние края культуры можно получить чистую культуру.

4. Метод Дригальского – широко применяется в бактериологической практике, при этом исследуемый материал разводят в пробирке стерильным физиологическим раствором или бульоном. Одну каплю материала вносят в первую чашку и стерильным стеклянным шпателем распределяют по поверхности среды. Затем этим же шпателем (не прожигая его в пламени горелки) делают такой же посев во второй и третьей чашках. С каждым посевом бактерий на шпателе остается все меньше и меньше и, при посеве на третью чашку, бактерии будут распределяться по поверхности питательной среды отдельно друг от друга. Через 1–7 сут выдерживания чашек в термостате (в зависимости от скорости роста микроорганизмов) на третьей чашке каждая бактерия дает

клон клеток, образуя изолированную колонию, которую пересевают на скошенный агар с целью накопления чистой культуры.

В ходе выделения чистой культуры бактерий можно выделить следующие этапы:

I. Исследуемый материал. Микроскопия и посев нативного материала на питательную селективную среду с целью получения изолированных колоний.

II. Изолированные колонии. Изучение «подозрительных» колоний (по культуральным свойствам). Микроскопия окрашенного мазка (определение морфологических и тинкториальных свойств бактерий). Пересев на среду накопления.

III. Чистая культура. Микроскопия окрашенного мазка. Идентификация выделенной чистой культуры по биохимическим свойствам, антигенной структуре, чувствительности к бактериофагам.

Методы культивирования и выделения чистой культуры облигатных анаэробов имеют свои особенности. Необходимым условием при выделении чистой культуры является отсутствие кислорода на всех этапах выделения анаэробов. Выделяют следующие методы создания анаэробных условий:

- 1) физические;
- 2) химические;
- 3) биологические.

Физические методы включают: кипячение среды с последующей изоляцией посева в среде стерильным вазелиновым маслом или парафином; посев анаэробов уколом в высокий столбик агара или полужидкой среды; удаление воздуха из специальных герметических сосудов – анаэроостатов с посевами.

Химические методы предполагают использование в замкнутых сосудах химических веществ – адсорбентов кислорода (щелочной раствор пирагаллола, гидросульфит натрия), редуцентов кислорода (тиогликат натрия, аскорбиновая кислота, цистин и др.). Анаэробные условия можно создать при помощи газогенерирующих систем в анаэроостатах: таблетки боргидрид натрия, которые при взаимодействии с водой, образуют водород. Водород, связываясь с кислородом воздуха в присутствии катализатора, образует воду.

Биологические методы: совместное культивирование аэробов и анаэробов на твердых питательных средах (метод Фортнера), культивирование некоторых облигатных анаэробов в организме лабораторных животных.

Методы выделения чистой культуры анаэробов:

1. Метод Вейнберга. Сущность его заключается в том, что исследуемый материал разводят в расплавленной и охлажденной до 45–50 °С агаризированной питательной среде. Делают 6–10 последовательных разведений, затем среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем смеси парафина и вазелинового масла, чтобы помешать проникновению воздуха в толщу питательной среды.

2. Метод Вейона–Веньяля. Готовят разведения исследуемого материала в сахарном агаре. Из каждого разведения материал набирают в пастеровские пипетки, концы которых запаивают. После культивирования пипетку надпиливают, разламывают и переносят колонию в среду накопления (например, среду Китта–Тароцци).

3. Метод Цейслера. Исследуемый материал рассевают штрихом по поверхности кровяного сахарного агара, помещают в анаэробные условия (например, анаэроустат) и культивируют при оптимальной температуре в термостате. Полученные изолированные колонии пересевают в среду накопления.

Для культивирования строгих анаэробов используют среды: Китта–Тароцци, Вильсон–Блера, Виллиса–Хоббса.

2.3. ОСНОВЫ ВИРУСОЛОГИИ

Строение и классификация вирусов

Вирус – неклеточная форма жизни, обладающая геномом (РНК или ДНК), но лишенная собственного синтезирующего аппарата и, поэтому, способная к воспроизведению лишь в клетках более высокоорганизованных существ.

Морфологию и структуру вирусов изучают с помощью электронного микроскопа, так как их размеры малы и сравнимы с толщиной оболочки бактерий. Форма вирионов может быть различной: палочковидной (вирус табачной мозаики), пулевидной (вирус бешенства), сферической (вирусы полиомиелита, ВИЧ), в виде сперматозоида (многие бактериофаги). Размеры вирионов колеблются от 20–30 нм (пикорна-, парвовирусы) до 150–250 нм (герпес-, рабдовирусы) и даже 350–400 нм (поксвирусы).

Для вирусов характерны две формы существования: внеклеточная (покоящаяся) и внутриклеточная (репродуцирующаяся, вегетативная). Внеклеточная форма называется вирусной частицей или вирионом. Вирионы состоят из нуклеиновой кислоты, окруженной снаружи белковой оболочкой – *капсидом* (от лат. capsula – футляр). Капсид вместе с нуклеиновой кислотой называют *нуклеокапсидом*. Морфологическими субъединицами капсида являются капсомеры, состоящие из одной или нескольких молекул белка. Существуют три типа строения капсидов, основанных на расположении морфологических субъединиц (рис. 63):

- 1) вирионы со спиральной симметрией;
- 2) вирионы с кубической (икосаэдрической) симметрией;
- 3) вирионы, имеющие смешанный тип симметрии.

У первого типа капсомеры расположены в виде спирали, нуклеиновая

кислота (преимущественно РНК) также скручена в виде пружины, располагаясь между витками белковых молекул. У вирусов с кубической симметрией капсомеры расположены в виде правильного икосаэдра со скрученной в клубок нитью ДНК или РНК. У третьего типа присутствуют оба типа симметрии, такой тип симметрии свойственен вирусам бактерий (бактериофаги). Капсид головки фага имеет кубический тип симметрии, а отросток – спиральный тип.

Тип симметрии вирусов и характер расположения капсомеров придают вирусам форму. Когда капсомеры расположены в виде многогранника вирус имеет сферическую форму. Капсомеры также могут придавать вирусу палочковидную форму, поэтому вирионы со спиральным типом симметрии в электронном микроскопе имеют вытянутую палочковидную или нитевидную форму. Бактериофаги со смешанным типом симметрии имеют форму сперматозоидов.

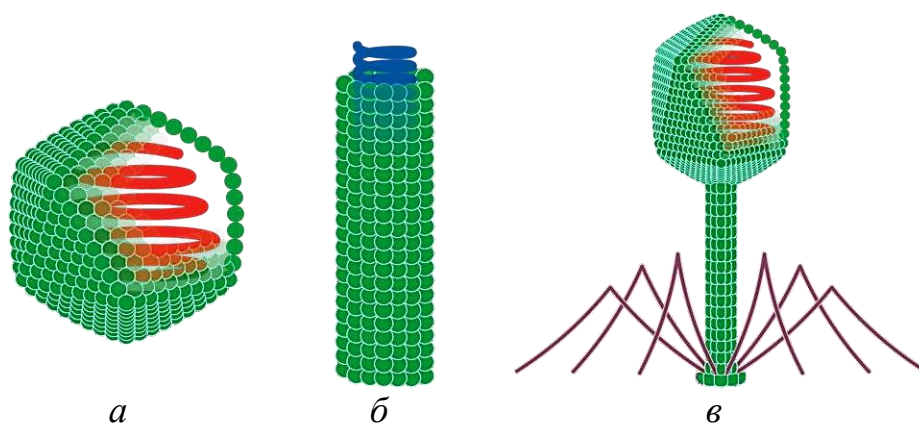


Рис. 63. Типы строения вирусных капсидов: икосаэдрический (а), спиральный (б) и смешанный (в). Цитируется по «Введение в вирусы» (<https://ru.khanacademy.org/science/biology/biology-of-viruses/virus-biology/a/intro-to-viruses?modal=1>)

По строению вирусы принято подразделять на простые и сложные. *Просто устроенные* вирусы (голые) состоят из нуклеокапсида, *сложноустроенные* вирусы (одетые) имеют еще дополнительную внешнюю оболочку – *суперкапсид* или *пеплос* (производное мембранных структур клетки-хозяина). Суперкапсидные белки формируют морфологические субъединицы (пепломеры), которые в электронном микроскопе выглядят в виде шипов (рис. 64).

Капсид и суперкапсид защищают вирионы от воздействий окружающей среды, обуславливают избирательное взаимодействие (адсорбцию) с рецепторами определенных клеток, а также антигенные и иммуногенные свойства вирионов.

Вирионы состоят из *нуклеиновых кислот, белка, липидов и углеводов*.

Нуклеиновые кислоты. Вирусы содержат только один тип нуклеиновой кислоты – либо ДНК, либо РНК, поэтому различают ДНК-содержащие и

РНК-содержащие вирусы. Подавляющее большинство вирусов являются РНК-содержащими. Вирусы обычно гаплоидны, то есть имеют один набор генов.

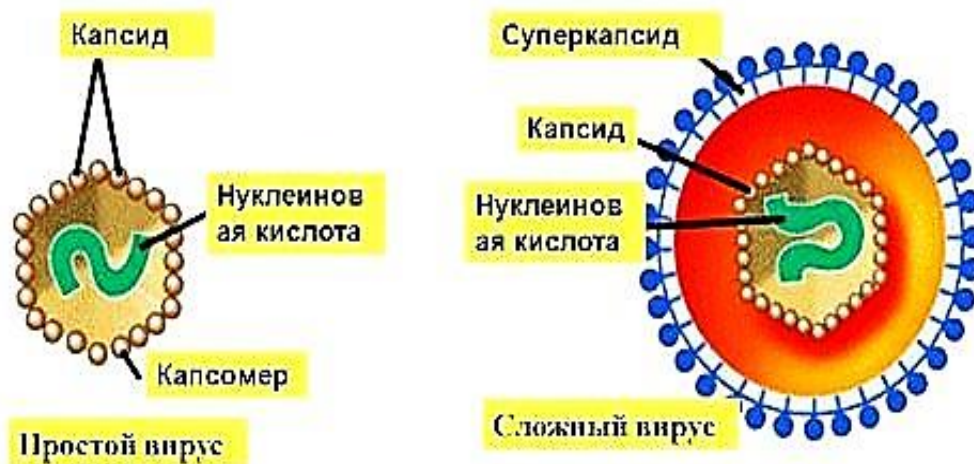


Рис. 64. Строение простых и сложных вирусов (<https://studopedia.org>)

ДНК вирусов может быть:

- одноцепочечная линейная ДНК (парвовирусы);
- одноцепочечная кольцевая ДНК (бактериофаги);
- двухцепочечная линейная ДНК (вирусы герпеса);
- двухцепочечная кольцевая ДНК (вирусы гепатита В).

РНК вирусов может быть:

- одноцепочечная нефрагментированная РНК (парамиксовирусы);
- одноцепочечная фрагментированная РНК (вирусы гриппа);
- двухцепочечная фрагментированная РНК (реовирусы);
- одноцепочечная кольцевая РНК (вирус гепатита D);
- две одинаковые одноцепочечные РНК (ретровирусы).

Среди РНК-содержащих вирусов различают вирусы с положительным геномом (+РНК). Плюс-нить РНК этих вирусов выполняет наследственную функцию и функцию матричной РНК (мРНК), является инфекционной, т.е. при попадании в клетку она может самостоятельно вызвать инфекционный процесс. Имеются также РНК-содержащие вирусы с отрицательным геномом (–РНК). Минус-нить РНК этих вирусов выполняет только наследственную функцию, не обладает матричной активностью, поэтому до начала трансляции на ней должна быть синтезирована +РНК при помощи фермента РНК-зависимой-РНК-полимеразы.

Геном вирусов способен функционировать автономно от генома клетки-хозяина или может включаться в состав генетического аппарата клетки в виде провируса, проявляя себя генетическим паразитом клетки.

Вирусные белки принято разделять на две группы: структурные и неструктурные (функциональные). Структурными являются белки, которые

формируют вирион, количество их у разных вирусов различно и зависит от степени организации и размеров вируса. Их подразделяют на (рис. 65):

Капсидные белки:

- NP-белки (нуклеокапсидные);
- собственно капсидные (коровские) белки;

Суперкапсидные белки:

- наружные белки (шипы, пепломеры, рецепторные);
- мембранный белок;
- матриксный белок.

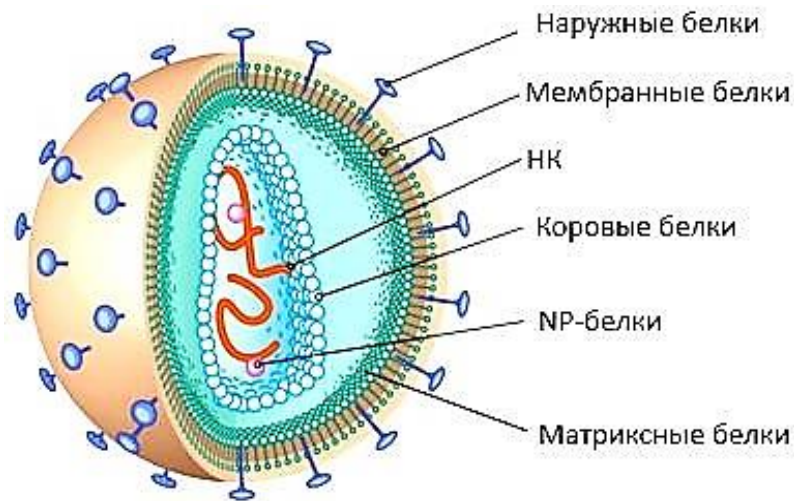


Рис. 65. Структурные белки вирусов

Неструктурные белки (NS) – это ферменты, которые либо входят в состав вириона (вирионные), либо кодируются вирусным геномом (вирусиндуцированные). Вирусные ферменты функционируют на разных стадиях онтогенеза вирусов: при прикреплении к клетке-хозяину, её заражении, репликации вирусного генома, сборке вирионов и выходе их из хозяйской клетки. К таким ферментам относятся: нейроминидаза, полимеразы, обратная транскриптаза, протеазы, эндонуклеазы, лигазы и др.

Липиды вирусов (фосфо- и гликолипиды) имеют клеточное происхождение. Они могут составлять до 20–30% от массы сложного вириона и включаются в оболочку при выходе вируса из клетки и присутствуют в составе суперкапсида. Липиды стабилизируют вирусную частицу, определяют конформацию суперкапсидных белков, а также способствуют проникновению вируса через гидрофобную клеточную мембрану.

Углеводы. В составе вириона входят рибоза и дезоксирибоза, которые являются обязательными составными частями нуклеиновых кислот. Также присутствует галактоза, манноза. Все углеводы участвуют в упаковке капсида. Кроме того, углеводы присутствуют в составе гликопротеинов суперкапсида.

Типичным примером такого гликопротеина является рецептор гемагглютинин, который вызывает склеивание эритроцитов и обладает антигенной специфичностью.

Современная таксономия и классификация вирусов разрабатывается Международным комитетом по таксономии вирусов (МКТВ).

Все известные вирусы относят к царству *Vira*, которое подразделяется на два подцарства: *дезоксивирусы* (ДНК-вирусы) и *рибовирусы* (РНК-вирусы). В современной классификации вирусов выделяют следующие таксономические уровни: порядок, семейство, подсемейство, род и вид. Название порядка вирусов имеет окончание «-*virales*», семейства – «-*viridae*», подсемейства – «-*virinae*», рода – «-*virus*». Например, вирус ветряной оспы относится к порядку *Herpesvirales*, семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Alphaherpesvirinae*, роду *Varicellovirus*. Наименование вида вируса может включать название местности выявления вируса, заболевания, которое он вызывает, организм хозяина или порядковый номер вида. В настоящее время известно свыше 300 видов вирусов, принадлежащих более чем к 50 родам и 30 вирусным семействам.

Кроме обычных вирусов, известны и, так называемые, неканонические вирусы: *прионы* и *виroidы*. *Прионы* – это белковые инфекционные частицы, имеющие вид фибрилл размером 10–20×200 нм, они вызывают у животных и человека энцефалопатии в условиях медленной вирусной инфекции (болезнь Крейтцфельда–Якоба, куру и др.). *Виroidы* – это небольшие молекулы одноцепочечной кольцевой, суперспирализованной РНК (250–370 нуклеотидов), не содержащие белка и вызывающие заболевания растений.

Репродукция вирусов

Вирус является облигатным внутриклеточным паразитом и для размножения ему требуется живая клетка. Различают три типа взаимодействия вируса с клеткой:

- 1) продуктивный, или цитотоксичный тип, при котором в зараженных клетках образуется новое поколение вирионов;
- 2) абортивный тип, характеризующийся прерыванием инфекционного процесса в клетке, поэтому новые вирионы не образуются;
- 3) интегративный тип, или вирогенез, заключающийся в интеграции, т.е. встраивании вирусной ДНК в виде провируса в хромосому клетки и их совместном сосуществовании.

Продуктивный тип взаимодействия вируса с клеткой осуществляется в результате размножения, т.е. репродукции вируса (от англ. reproduce – воспроизводить). Репродукция вируса происходит в несколько стадий (рис. 66):

- 1) адсорбция вирионов на клетке;
- 2) проникновение вирусов в клетку;

- 3) депротеинизация или «раздевание» вирусов и высвобождение вирусного генома;
- 4) биосинтез компонентов вируса;
- 5) формирование вирусной частицы;
- 6) выход вирионов из клетки.

Вирусное инфицирование клетки начинается с адсорбции вируса на ее поверхности. *Адсорбция* обеспечивается взаимодействием поверхностных белков вируса со специфическими мембранными рецепторами чувствительных клеток. Взаимодействие обеспечивается в первую очередь комплементарностью между вирусным и клеточным рецепторами, а также силами неспецифического межмолекулярного взаимодействия (разностью зарядов, водородными или гидрофобными связями). Первоначально адсорбция обратима из-за единичных связей между вирусом и клеткой; необратимую адсорбцию обеспечивает множественное поливалентное прикрепление вирусов. Соответствие клеточных рецепторов и поверхностных вирусных белков определяет тропизм вируса, то есть способность избирательно поражать определенные клетки. Вирусы, репродуцирующиеся в клетках печени, называются гепатотропными, в клетках нервной системы – нейротропными и т.д.

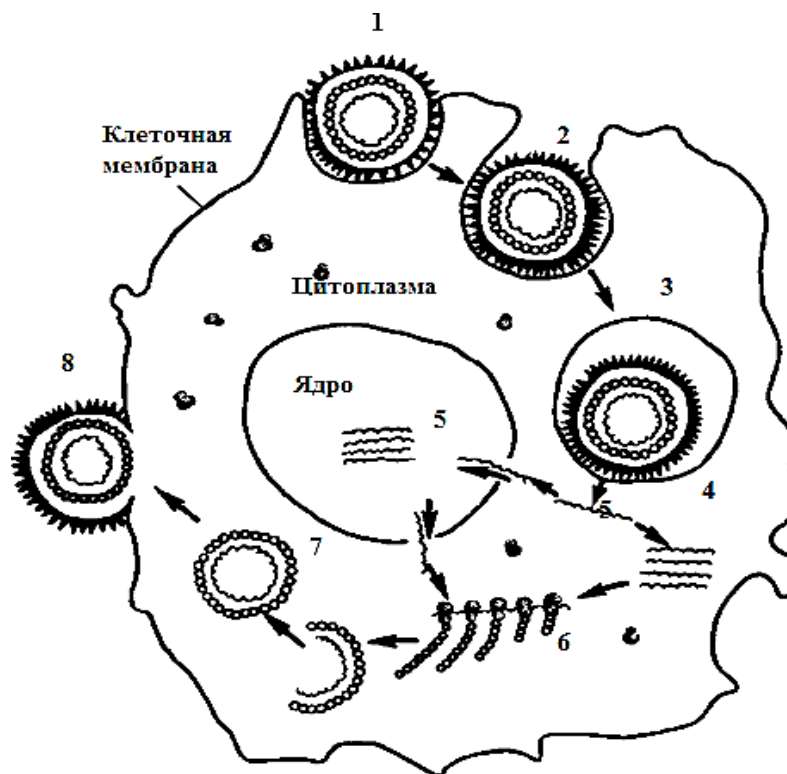


Рис. 66. Репродукция вирусов в клетке: адсорбция вируса на клетке (1), проникновение вируса в клетку эндоцитозом (2), депротеинизация (3), репликация вирусной нуклеиновой кислоты (4), ядро клетки (5), синтез вирусных белков на клеточных рибосомах (6), сборка вирионов (7), выход вируса из клетки почкованием (8) (<https://students-library.com>)

Проникновение вируса в клетку происходит либо путем виropексиса (рецепторного эндоцитоза), либо слияния оболочки вируса с клеточной мембраной (при наличии белка слияния), или в результате сочетания этих двух механизмов. При рецепторном эндоцитозе возникает инвагинация клеточной мембраны и образование внутриклеточной вакуоли (эндосомы). Вакуоль с вирусом может попадать в разные участки цитоплазмы или в клеточное ядро с последующим выходом вируса за пределы эндосомы. Процесс слияния активируется связыванием вирусных белков капсидной или суперкапсидной оболочек с клеточными рецепторами. Оболочки вируса далее сливаются с цитоплазматической мембраной клетки хозяина, чему способствует их гидрофобность. У ряда возбудителей (например, парамиксовирусов) имеется специальный F-белок, вызывающий слияние клеточных и вирусных мембран.

Эндоцитозом в клетку поступают простые вирусы (аденовирусы, пикорнавирусы), а также некоторые сложные вирусы – ортомиксовирусы (вирус гриппа), рабдовирусы (вирус бешенства) и др. Путем слияния проникают сложные вирусы – герпесвирусы, парамиксовирусы, ретровирусы (ВИЧ).

В процессе проникновения вириона в клетку при участии клеточных ферментов происходит его *депротеинизация*, в результате которой удаляются поверхностные структуры вируса, и высвобождается его внутренний компонент (сердцевина, нуклеокапсид, нуклеиновая кислота).

Биосинтез вирусных компонентов осуществляется в разных частях клетки, поэтому называется дизъюнктивным (от лат. *disjunctus* – разобщенный). Все РНК-содержащие вирусы, за исключением вирусов гриппа и ретровирусов, репродуцируются в цитоплазме клетки, а ДНК-содержащие вирусы (исключение поксвирусы) – в ядре клетки-хозяина, где осуществляются транскрипция и репликация, в цитоплазме происходит синтез вирусных белков. Белки вируса синтезируются в результате транскрипции, т.е. «переписывания» информации с генома вируса на информационную РНК (иРНК) и последующей трансляции (считывание иРНК на рибосомах) с образованием белка вируса. Синтез вирусных нуклеиновых кислот происходит в процессе репликации (от лат. *replicatio* – повторение).

Формирование вирионов происходит путем самосборки: составные части вириона транспортируются в места сборки вируса в ядре или цитоплазме. Сборка компонентов вириона происходит за счет гидрофобных, ионных, водородных связей и стерического соответствия. В результате самосборки капсомеров, образовавшихся из вирусных полипептидов, и взаимодействия их с нуклеиновыми кислотами вируса образуются нуклеокапсиды. Суперкапсидная оболочка сложноорганизованных вирусов включает в себя кроме вирус-специфических белков еще компоненты мембраны клетки.

Выход вирионов из клетки реализуется двумя основными путями. Первый тип – взрывной: из погибающей клетки одновременно выходит большое количество вирионов. По взрывному типу выходят из клетки просто устроенные

вирусы, не имеющие суперкапсида. Второй тип – почкование, присущ вирусам, имеющим суперкапсид. Сначала синтезированный нуклеокапсид транспортируется к клеточным мембранам, в которые уже встроены вирус-специфические белки. Затем начинается выпячивание этих участков. Сформировавшаяся почка отделяется от клетки в виде сложно устроенного вируса. При этом клетка способна длительно сохранять жизнеспособность и продуцировать вирусное потомство.

Кроме продуктивного типа взаимодействия вируса и клетки возможно *интегративное* или вирогения. *Вирогения* характеризуется интеграцией (встраиванием) нуклеиновой кислоты вируса в геном клетки, а также репликацией и функционированием вирусного генома как составной части генома клетки. Нуклеиновая кислота ДНК-геномных вирусов встраивается непосредственно в молекулярную нуклеиновую кислоту (*гепадनावирусы, паповавирусы и др.*). Нуклеиновая кислота РНК-геномных вирусов не может встраиваться непосредственно в ДНК клетки из-за различия в их химическом строении. В этой связи РНК-содержащие вирусы (*ретровирусы*) сначала синтезируют на цепи РНК нить ДНК. Такой обратный синтез нуклеиновых кислот возможен благодаря присутствию в составе вирионов ретровирусов фермента – *обратной транскриптазы* (ревертазы). Встроенная в состав хромосомы клетки вирусная ДНК называется *провирсом*. Провирус реплицируется в составе хромосомы и переходит в геном дочерних клеток, т.е. состояние вирогении наследуется. Под влиянием некоторых физических или химических факторов провирус может переходить в автономное состояние с развитием продуктивного типа взаимодействия с клеткой. Дополнительная генетическая информация провируса при вирогении сообщает клетке новые свойства, что может быть причиной развития опухолей, аутоиммунных и хронических заболеваний. На способности вирусов к интеграции с геномом клетки основаны *персистенция* (от лат. *persisto* – постоянно пребывать, оставаться) вирусов в организме и развитие персистентных вирусных инфекций. Например, вирус гепатита В способен вызывать персистирующие поражения с развитием хронического гепатита и часто опухолей печени.

Методы культивирования и индикации вирусов

Так как вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, их культивирование проводят в живых клеточных системах: *в организме лабораторных животных, в развивающихся куриных эмбрионах и культурах клеток*. Основными задачами культивирования являются:

- изучение механизмов патогенеза вирусной инфекции;
- разработка методов лабораторной диагностики вирусных заболеваний;
- получение препаратов для профилактики, лечения и диагностики вирусных инфекций.

Культивирование вирусов в организме лабораторных животных. Выбор экспериментальных животных определяется целью работы и видовой чувствительностью к изучаемому вирусу. Для заражения используют обезьян, кроликов, морских свинок, хомячков, белых крыс и мышей.

Лабораторных животных заражают различными способами в зависимости от тропизма вируса к определенным тканям. Так, например, для культивирования нейротропных вирусов заражение производят преимущественно в мозг (вирусы бешенства, клещевого энцефалита и др.), культивирование респираторных вирусов осуществляется при интраназальном инфицировании животных (вирусы гриппа), дерматотропных (вирус оспы) – путем кожного и внутрикожного заражения. Наиболее часто используются кожное, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное и внутримозговое заражение. При первичном заражении животные могут не заболеть, поэтому через 5–7 дней внешне здоровых животных умерщвляют, а из их органов готовят суспензии, которыми заражают следующие партии животных. Такие последовательные заражения называются «*пассажами*».

Индикацию, т.е. обнаружение факта размножения вируса, устанавливают на основании развития типичных признаков заболевания, патоморфологических изменений органов и тканей животных или положительной *реакции гемагглютинации* (РГА). РГА основана на способности некоторых вирусов вызывать агглютинацию (склеивание) эритроцитов различных видов животных, птиц и человека за счет поверхностного вирусного белка – *гемагглютинина*.

В настоящее время использование животных для культивирования вирусов ограничено.

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах. Куриный эмбрион представляет собой удобную и простую модель для выращивания вирусных культур. Его полости защищены твердой оболочкой и стерильны. Большинство известных вирусов способны размножаться в курином эмбрионе. Этот метод широко используется при промышленном культивировании вирусов. Используют эмбрионы в возрасте от 8 до 14 дней в зависимости от вида вируса, способа заражения и задач исследования. Вирусы гриппа культивируются в 9–10-дневных эмбрионах, осповакцины – в 12-дневных, паротита – в 7-дневных. Размножение вируса в куриных эмбрионах происходит в разных частях зародыша, что связано с особенностями тропизма вируса. Заражение куриного эмбриона осуществляют на хорионаллантоисную оболочку, в аллантоисную и амниотическую полости, желточный мешок, тело эмбриона (рис. 67).

Индикацию вирусов в курином эмбрионе осуществляют на основании специфических поражений оболочек и тела эмбриона (оспины, кровоизлияния), а также в РГА.

Культивирование вирусов в культуре клеток. Этот метод наиболее широко применяется в настоящее время.

Культура клеток – это совокупность клеток, полученных из различных

органов и тканей человека, животных или растений, живущих и размножающихся в искусственной питательной среде в условиях *in vitro*.

Для выращивания культуры клеток используют специальную лабораторную посуду («матрасы», флаконы, пробирки, планшеты, чашки Петри и др.).



Рис. 67. Строение и способы заражения куриного эмбриона (<https://studopedia.ru>)

В зависимости от техники приготовления различают три вида культур клеток:

- 1) однослойные – клетки, способные прикрепляться и размножаться на поверхности химически нейтрального стекла лабораторной посуды в виде монослоя;
- 2) суспензионные – клетки, размножающиеся во всем объеме питательной среды при постоянном ее перемешивании, их активно применяют в биотехнологии с целью получения большого количества вирусной биомассы в промышленных биореакторах для приготовления вакцин или вирусных диагностикомов;
- 3) органные – цельные кусочки органов и тканей, сохраняющие исходную структуру вне организма (применяются ограничено).

Максимальное распространение получили однослойные клеточные культуры. Они различаются по числу жизнеспособных генераций в зависимости от числа пассажей. *Пассаж* (или субкультивирование) – это перенос небольшой части клеток из выросшей клеточной культуры во флакон или другую посуду для культивирования со свежей питательной средой для дальнейшего размножения. При обычном культивировании наступает ускоренное старение клеток из-за их высокой плотности и накопления продуктов метаболизма, а пассажи обеспечивают длительное поддержание клеточной культуры.

1. Первичные культуры – их получают из тканей человека или животных (клетки почек обезьян, человеческие или куриные фибробласты и др.). Они способны размножаться только на первых генерациях, т.е. в нескольких пассажах после выделения из тканей, а затем погибают.

2. Полуперевиваемые или диплоидные культуры содержат неизмененный диплоидный геном и имеют ограниченную продолжительность жизни (40–50 пассажей). Источник таких клеток – эмбриональные человеческие или животные клетки (человеческие легочные и панкреатические фибробласты, эпителиальные клетки молочной железы и др.). Они активно используются как для культивирования вирусов, так и для получения вирусных вакцин (для профилактики полиомиелита, краснухи, бешенства и др.).

3. Перевиваемые или стабильные (непрерывные) культуры способны размножаться в лабораторных условиях неопределенно длительный срок посредством постоянного пассирования. Многие из них происходят из злокачественных опухолевых клеточных линий (опухолевая трансформация клеток). Обычно они имеют измененный набор хромосом. К таким культурам относятся клетки *HeLa* из аденокарциномы шейки матки, *Her-2* из клеток карциномы гортани и др. Широко используются перевиваемые клеточные линии животного происхождения (клетки почек золотистого сирийского хомячка – *BHK*, клетки почек африканских зеленых мартышек – *Vero* и др.).

Для получения клеточных культур проводят выделение и гомогенизацию тканей, содержащих необходимые клетки. Далее их обрабатывают протеазой (трипсином или коллагеназой) для разрушения межклеточных перегородок и вносят в лабораторный сосуд со средой для культивирования. После начала инкубации в термостате клетки начинают делиться и покрывают в один слой (монослой) дно сосуда. При необходимости выполняют дальнейшие пассажы клеточной культуры. Питательные среды для культивирования разделяют на ростовые и поддерживающие. *Ростовые питательные среды* обогащают для стимуляции активного деления клеток и формирования монослоя. *Поддерживающие среды* сохраняют жизнеспособность клеток в уже готовом монослое, а также применяются при размножении в клетке вирусов. Основой всех питательных сред является сбалансированный буферный солевой раствор. В него добавляют факторы роста (аминокислоты, витамины) и антибиотики для предупреждения бактериальной или грибковой контаминации. Широко используются стандартные среды, такие как среда 199, среда Игла и др.

Выбор клеточных культур определяется их чувствительностью к отдельным группам вирусов.

Индикацию вирусов в культуре клеток проводят на основании следующих феноменов:

1. Цитопатическое действие (ЦПД) – видимые под микроскопом морфологические изменения клеток, вплоть до их отторжения от стекла, которые возникают в результате внутриклеточной репродукции вирусов. Характер

ЦПД при различных вирусных инфекциях неодинаков. При репродукции одних вирусов (парамиксовирусы, герпесвирусы) наблюдается слияние клеток с образованием синцития, других (энтеровирусы, реовирусы) – сморщивание и деструкция клеток, третьих (аденовирусы) – агрегация клеток и т.д.

2. Вирусные включения – скопление вирусных частиц или отдельных компонентов вирусов в цитоплазме или ядре клеток, выявляемые под микроскопом при специальном окрашивании. Характерные ядерные включения формируются в клетках, зараженных вирусами герпеса, аденовирусами, гриппа, бешенства, оспы и др.

3. Бляшки, или негативные колонии – ограниченные участки, состоящие из дегенеративных клеток, которые вирусы способны образовывать в монослое клеток под агаровым покрытием. Одна бляшка соответствует потомству одного вириона.

4. Гемадсорбция – способность культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты определенных видов животных и птиц.

5. Интерференция – ингибиторное действие одного вируса на репродукцию другого вируса. При этом клетка, внутри которой находится вирус, становится устойчивой к заражению другим вирусом.

Бактериофаги

Бактериофаги (фаги) – это вирусы, являющиеся специфическими паразитами бактериальных клеток. Они не способны размножаться в клетках эукариот. Бактериофаги распространены в природе повсеместно – там, где присутствуют бактерии. При инфекциях бактериофаги выделяются из организма с испражнениями, мочой, слюной одновременно с бактериальными возбудителями заболеваний и являются важными эпидемиологическими маркерами инфекции. Фаги участвуют в поддержании баланса в биосфере планеты, регулируя численность микробных клеток. Бактериофаги обеспечивают перенос генов между бактериями, что приводит к ускоренной эволюции бактериальной популяции. В них видят способ борьбы с устойчивыми к антибиотикам бактериями.

Классификация фагов определяется типом их нуклеиновой кислоты и структурой фаговой частицы. Только два семейства представлены РНК-содержащими бактериофагами, остальные содержат ДНК, представители двух семейств имеют в геноме однонитевую ДНК, остальные – двухнитевую. Геномная ДНК может быть, как кольцевой, так и линейной.

Большинство фаговых частиц напоминают по форме сперматозоид. Основными элементами структуры фага являются головка, содержащая упакованную нуклеиновую кислоту, и отросток («хвост фага»), который заканчивается базальной пластинкой с короткими шипами и нитями (фибриллы) для

прикрепления к бактериальной клетке (рис. 68).

У некоторых фагов головка может быть покрыта липидным суперкапсидом, отросток может быть окружен сократительной белковой оболочкой (чехлом). Фаг такой структуры имеет смешанный тип симметрии (головка – кубический, хвост – спиральный). Размеры фага в среднем колеблются от 20 до 200 нм (нитевидные фаги – до 800 нм). Общее содержание белков в фаговой частице составляет 50–60%, нуклеиновой кислоты – до 40–50%, липидов – до 1,5–3%.

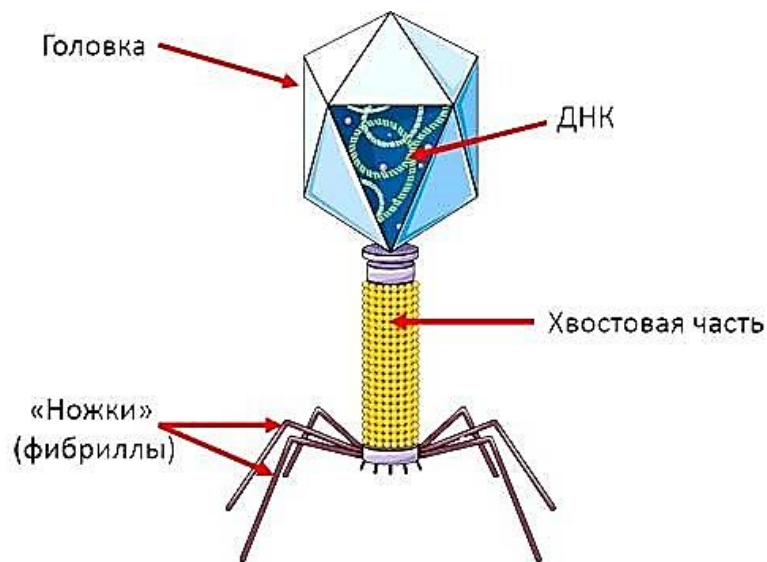


Рис. 68. Строение
бактериофага
(<https://nikafarm.ru>)

Хорошо изучены Т-фаги кишечной палочки (англ. *type* – типовые). По морфологии различают пять основных типов бактериофагов:

- 1) ДНК-содержащие нитевидные фаги;
- 2) РНК-содержащие фаги с рудиментом (аналогом) отростка;
- 3) ДНК-содержащие фаги с коротким отростком;
- 4) ДНК-содержащие фаги отростка с длинным отростком и несокращающимся чехлом;
- 5) ДНК-содержащие фаги с сокращающимся чехлом отростка с базальной пластинкой.

Для проникновения в микробную клетку под чехлом у фагов содержится фермент эндолизин (муреин-гидролаза), аналогичный по функции ферменту лизоциму. Также здесь находятся АТФаза и ионы кальция, необходимые для сокращения чехла. В головке внутренние белки содержат полиамины (спермин, путресцин) для связывания с нуклеиновой кислотой. Это способствует суперспирализации нуклеиновой кислоты и ее плотной упаковке. В головке также содержится фермент транскриптаза для транскрипции фаговой ДНК.

Бактериофаги по типу взаимодействия с бактериальной клеткой подразделяются на:

- 1) *вирулентные* – способные к продуктивной инфекции, лизису бактерий и образованием новых фаговых частиц;

2) *умеренные* – способны встраивать свою ДНК в геном бактериальной клетки, в результате чего возникает интегративная инфекция (*лизогения*).

Выделяют следующие стадии взаимодействия бактериофагов с чувствительными бактериальными клетками:

- 1) адсорбция;
- 2) проникновение нуклеиновой кислоты фага в бактерию;
- 3) репродукция бактериофага;
- 4) выход фаговых частиц (для вирулентных фагов) или лизогения (для умеренных фагов).

Адсорбция происходит за счет рецепторов фаговой частицы (шипы и фибриллы базальной пластинки), которые взаимодействуют с рецепторами оболочки бактериальной клетки (липополисахарид, тейхоевые кислоты, белки). На одной клетке может адсорбироваться до 300 фагов. *Проникновение* нуклеиновой кислоты фага в бактерию зависит от сократительных белков чехла фага. Эндолизин разрушает участок клеточной стенки бактерии, происходит активация АТФазы, сокращение белков чехла и центральный стержень отростка прокалывает мембрану клетки. Далее осуществляется впрыскивание (инъекция) нуклеиновой кислоты фага. При этом белки головки и отростка остаются снаружи. *Репродукция* фага протекает в несколько этапов, сначала происходит остановка клеточного метаболизма с прекращением синтеза бактериальных нуклеиновых кислот и белков, затем происходят процессы трансляции, транскрипции и репликации с образованием фаговых белков и их нуклеиновых кислот. Созревание фаговых частиц (или сборка бактериофагов) заключается в заполнении фаговой ДНК или РНК вновь сформированных пустотелых капсидов головки. Параллельно формируются базальная пластинка и отросток, которые далее соединяются с головкой фага. Время репродукции составляет от 10–15 мин до нескольких часов. *Выход* зрелых фагов наиболее часто происходит путем лизиса с разрушением бактериальной клетки. Лизис осуществляется фаговыми эндолизинами. В одной клетке может образоваться несколько сотен фаговых частиц. У некоторых нитевидных фагов выход фаговых частиц происходит путем просачивания через клеточную стенку, при этом бактерия сохраняет жизнеспособность.

Взаимодействие фагов с бактериальной клеткой характеризуется высокой специфичностью. *Моновалентные фаги* реагируют только с бактериями определенного вида; *типовые фаги* – только с отдельными вариантами (типами) данного вида бактерий. Типоспецифические бактериофаги используют для выявления соответствующих бактерий, т.е. для их фаготипирования. *Поливалентные фаги* могут связываться с несколькими родственными видами бактерий.

При взаимодействии *умеренных фагов* с бактериальной клеткой происходит адгезия, проникновение нуклеиновой кислоты фага, а затем интеграция – встраивание ее в хромосому бактерии (профаг). Иногда ДНК умеренных фагов

может находиться в цитоплазме бактерии в виде плазмиды. Профаг, ставший частью нуклеоида, при размножении бактерии, реплицируется одновременно с ее геномом. Лизиса бактерии не происходит, однако ДНК фага передается по наследству от клетки к клетке неограниченному числу потомков. Интеграция генома бактерии с умеренным фагом называется *лизогенией*, а бактерии, имеющие профаг – *лизогенными*. Бактериальная клетка, несущая в себе профаг, становится резистентной к действию идентичного фага. В такой клетке продуцируются репрессоры – фаговые белки, препятствующие его размножению и проникновению в клетку идентичных фагов. Под влиянием внешних факторов – ультрафиолетового или радиоактивного излучения, действия химических соединений, возможно превращения профага в вирулентный бактериофаг, с последующим образованием зрелых фаговых частиц и лизисом бактерии. Изменение свойств микроорганизма под влиянием встроенного профага обозначается как фаговая или лизогенная конверсия. Лизогенная конверсия характерна для многих видов бактерий. Она сопровождается выраженным изменением их культуральных, биохимических, антигенных или других свойств. В клинических ситуациях важность приобретает появление в результате трансдукции, антибиотикоустойчивых или высоковирулентных штаммов бактерий. В частности, передача тох-генов бактериофагами определяет продукцию экзотоксинов у возбудителей дифтерии, ботулизма, холеры.

Применение бактериофагов основано на их строгой специфичности в отношении чувствительных к ним бактериальных клеток. В медицине фаги используют для диагностики, лечения или профилактики бактериальных инфекций. При проведении диагностики бактериофаги применяют для идентификации выделенных культур бактерий. С помощью типоспецифических фагов проводят фаготипирование, т.е. устанавливают принадлежность неизвестной выделенной культуры бактерии к определенному фаготипу. Определение фаготипов и последующее их сравнение у разных штаммов одного вида позволяет установить источник и пути распространения инфекций.

Кроме того, обнаружение специфических бактериофагов в объектах окружающей среды или клиническом материале может указывать на наличие в них соответствующих бактерий (например, определение коли-фагов в воде).

В связи с широким распространением антибиотикоустойчивых штаммов бактерий наблюдается повышенный интерес к бактериофагам как высокоспецифичным средствам для лечения бактериальных инфекций. При этом фаги способны проникать и размножаться в микробных биопленках. Налажено производство брюшнотифозного, сальмонеллезного, дизентерийного, клебсиеллезного, протейного, синегнойного, стафилококкового фагов, коли-фагов и комбинированных фагов. Их выпускают в жидком виде, в таблетках с кислотоустойчивым покрытием, в форме мазей, аэрозолей.

В биотехнологии бактериофаги используют в качестве векторов для ген-

ной инженерии, с их помощью в бактерии встраивают гены человека, синтезирующие гормоны, цитокины, антитела или другие субстанции, а также для изучения функции белковых молекул и создания библиотек генов и кодируемых ими белков, например, с применением технологии «фагового дисплея».

2.4. ДЕЙСТВИЕ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Физические факторы (температура, давление, излучение и др.) на микроорганизмы могут оказывать как негативное, так и благоприятное действие. Неблагоприятное воздействие может замедлять рост и размножение микроорганизмов (статическое действие) или вызывать их гибель (бактерицидное, фунгицидное действие). Благоприятное действие способствует росту и размножению микроорганизмов, что можно использовать при их культивировании.

Температура. По отношению к существованию в различных температурных режимах микроорганизмы делят на *мезофильные*, *психрофильные*, *термофильные* формы.

Для *мезофилов* оптимальной температурой является 25–40 °С. К этой группе относится подавляющее большинство как сапрофитных, так и патогенных бактерий.

Среди микроорганизмов – обитателей глубин океанов, тундровых почв встречаются сапрофитные виды – *психрофилы*, которые размножаются при температуре ниже 20 °С. *Термофилы*, заселяющие воды горячих источников, способны размножаться при температуре выше 70 °С.

Бактерии-мезофилы в вегетативном состоянии чувствительны к повышению температуры до 50–55 °С. При этом происходит денатурация белков бактериальной клетки, что ведет к гибели. Спорообразующие бактерии – бациллы, клостридии – более устойчивы к повышению температуры, многие из них способны выдерживать в течение нескольких часов нагревание до 100–110 °С. При температуре ниже оптимальной на 5–10 °С бактерии не погибают, но их размножение задерживается в связи с замедлением обмена веществ.

Высушивание. При относительной влажности менее 30 % у большинства бактерий происходит замедление всех процессов жизнедеятельности.

Высушивание под вакуумом из замороженного состояния – *лиофилизацию* используют для продления жизнеспособности, консервирования микроорганизмов при приготовлении иммунобиологических препаратов.

Осмотическое и гидростатическое давление. Бактерии, дрожжи и плесневые грибы устойчивы к гидростатическому давлению. Они переносят давление 1000–3000 атм, а спороносные бактерии – до 20000 атм. При таком высоком давлении снижается активность бактериальных ферментов и токсинов.

Осмотическое давление отрицательно влияет на биохимическую активность микроорганизмов. Повышение концентрации солей задерживает развитие многих бактерий, однако, есть виды способные развиваться в присутствии концентрированных растворов солей, такие бактерии называют *осмофильными (галофильными)*.

Действие излучения. Большинство патогенных бактерий плохо переносят прямой солнечный свет. На этом основано использование ультрафиолетового света с целью обеззараживания (стерилизации) воздуха в помещениях медицинских учреждений. Как УФ-свет, так и рентгеновские лучи, и другие виды ионизирующего излучения оказывают на микроорганизмы летальное или мутагенное действие. Наиболее эффективны короткие лучи ультрафиолетового спектра с длиной волны около 280 нм. Такие лучи поглощаются нуклеиновыми кислотами клетки, при этом поражаются пиримидиновые основания и клетки погибают в результате возникновения летальных мутаций.

Радиоактивное излучение также губительным образом действует на микроорганизмы. В то же время были обнаружены бактерии, устойчивые к действию ионизирующих излучений. Устойчивость определяют морфологическое и физиологическое состояние микроорганизма, экспозиция, доза облучения. Бактерии более чувствительны к ионизирующему облучению, чем вирусы. Ионизирующая радиация в отдельных случаях используется в практике здравоохранения для стерилизации лекарственных веществ, медицинских изделий из пластика, хирургических материалов.

Ультразвуковые волны при частоте колебания 1–1,3 мГц в течение 10 мин оказывает бактерицидный эффект на клетки микроорганизмов. Влияние ультразвука основано на механическом разрушении микроорганизмов в результате возникновения высокого давления внутри клетки. Это позволяет использовать его в качестве стерилизующего агента, а также применять для инактивации и дезинтеграции вирусов с целью получения антигенов и вирусных вакцин.

Химические вещества и концентрация их в питательной среде оказывают большое влияние на жизнедеятельность микробов. Проявления различного влияния химических веществ зависит от времени контакта и индивидуальных свойств микроба. Химические вещества, способные оказывать бактерицидное действие используют для стерилизации и дезинфекции.

Дезинфекция

Дезинфекция – это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов во внешней среде до уровня, не представляющего опасности для здоровья.

Дезинфекция включает в себя мероприятия, направленные на разрыв свя-

зей между звеньями эпидемического процесса и используется как с профилактической, так и с противоэпидемической целями в борьбе с инфекционными болезнями.

Дезинфекция включает в себя три раздела: собственно дезинфекцию, дезинсекцию, дератизацию.

Собственно дезинфекция – уничтожение патогенных микроорганизмов.

Дезинсекция – способы и средства борьбы с насекомыми, которые передают человеку инфекционные заболевания.

Дератизация – ряд мероприятий направленных на уничтожение грызунов, наносящих вред человеку.

Таким образом, все три раздела дезинфекции представляют механическое воздействие на различные живые организмы и являются частью общего противоэпидемиологического комплекса, направленного на снижение уровня заболеваний среди населения.

Свойства возбудителей инфекционных заболеваний, механизмы и пути их передачи, способы их выведения из организма человека определяют выбор средств и методов дезинфекции.

Цель дезинфекции – удаление или уничтожение возбудителей инфекционных заболеваний с объектов внешней среды, палат, функциональных помещений, отделений ЛПУ, на медицинском оборудовании и инструментарии, при производстве лекарственных препаратов. Например, источниками микроорганизмов в медицинских организациях могут быть пациенты и медицинский персонал, работники фармацевтических предприятий и аптек, занесенные с улицы грязь, пыль и т.д.

В медицинских организациях дезинфекции подвергаются:

- контаминированные изделия медицинского назначения, не подлежащие стерилизации;
- контаминированные изделия медицинского назначения, подлежащие стерилизации;
- поверхность оборудования, мебели, аппаратуры и т.д., в профилактических целях или по эпидемиологическим показателям.

Виды дезинфекции:

1. **Профилактическая**, включающая плановую дезинфекцию, дезинфекцию по санитарно-эпидемическим показаниям и дезинфекцию по санитарно-гигиеническим показаниям.
2. **Очаговая**, включающая текущую дезинфекцию и заключительную.

Профилактическая дезинфекция – это мероприятия, которые проводятся при отсутствии очага инфекции для защиты человека от возможного заражения.

Плановая профилактическая дезинфекция, проводится систематически в медицинских организациях при отсутствии в них возбудителей ВБИ, когда источник возбудителя не выявлен и возбудитель не выделен, с целью:

- уменьшения микробной обсемененности объектов внутрибольничной среды и предупреждения возможности размножения микроорганизмов;
- предупреждения распространения микроорганизмов через изделия медицинского назначения, руки и кожные покровы медицинского персонала и больных;
- освобождения помещений ЛПО, фармацевтических предприятий и окружающей территории от членистоногих и грызунов.

Профилактическая дезинфекция по эпидемиологическим показаниям проводится с целью не допустить распространения возбудителей инфекционных заболеваний. Профилактическая дезинфекция по эпидемиологическим показаниям проводится с учетом эпидемиологических особенностей конкретной инфекции (инкубационный период, устойчивость и длительность выживания возбудителя на объектах, имеющих наибольшее эпидемиологическое значение) и режимов применения средств обеззараживания (дезинфекции, дезинсекции, дератизации).

Профилактическая дезинфекция по санитарно-гигиеническим показаниям проводится как разовое мероприятие в помещениях организаций, находящихся в неудовлетворительном санитарном состоянии, по методике проведения генеральных уборок.

Очаговая дезинфекция – это мероприятия при появлении очага инфекции.

Текущая дезинфекция проводится многократно в домашних условиях, лечебных учреждениях или на фармацевтических производствах. Организует ее персонал, работающий в данном учреждении. Сводится к мероприятиям, направленным на предупреждение возникновения и распространения инфекции внутри помещения, за его пределы.

При проведении текущей дезинфекции в присутствии больных (персонала) не допускается применять способ орошения поверхностей дезинфицирующими растворами, а при способе протирания – применять препараты, обладающие раздражающим действием и вызывающие аллергические реакции.

Заключительная дезинфекция проводится однократно после госпитализации, перевода, выздоровления или смерти пациента, а также на фармацевтических предприятиях, после получения неудовлетворительных результатов микробиологического мониторинга объектов производства. При производстве лекарственных препаратов заключительной дезинфекции подвергаются помещения классов А, В, С, D и находящееся в них оборудование.

Методы дезинфекции:

1) **физический метод** основан на удалении микроорганизмов путем кипячения, сжигания, прокаливания, воздействии горячего сухого воздуха, ультрафиолетового облучения, водяного насыщенного пара, радиационного воздействия, электромагнитного излучения и т. д.;

2) **химический метод** основан на применении различных химических веществ (антисептиков и дезинфектантов);

3) **биологический метод** основан на антагонистическом действии между различными микроорганизмами, применяется на биологических станциях при очистке сточных вод;

4) **механический метод** основан на удалении микроорганизмов путем мытья, влажной уборки, обработки пылесосом, вентиляции, проветривания, стирки, фильтрации и т.д.;

5) **комбинированный метод** основан на сочетании нескольких из перечисленных методов.

Выбор метода стерилизации зависит от:

- материала, из которого состоит изделие;
- конструкции изделия;
- необходимости длительного сохранения изделия;

На эффективность дезинфекции влияют следующие факторы:

- биологическая устойчивость микроорганизмов к различным средствам дезинфекции;
- физические свойства дезинфектанта;
- характер обрабатываемых материалов;
- массивность микробных обсеменений;
- способ дезинфицирующей обработки;
- время воздействия (экспозиция).

Изделия медицинского назначения, оборудование фармацевтических предприятий подвергаются обработке в три этапа:

- 1) дезинфекция;
- 2) предстерилизационная очистка;
- 3) стерилизация.

Характеристика различных групп дезинфицирующих средств

1. **Механические средства** дезинфекции обеспечивают удаление патогенных и условно-патогенных микроорганизмов с объектов путем механического воздействия (встряхивания, влажного протирания). При этом объекты или полностью освобождаются от микроорганизмов или уменьшается их обсеменение.

2. **Физические средства:**

- Ультрафиолетовое обеззараживание осуществляется с помощью бактерицидных установок, их применяют с целью снижения микробной обсемененности воздуха и поверхностей различных объектов.

- Сухой горячий воздух, температура которого 100–170 °С, оказывает бактерицидное, вирулицидное, фунгицидное, спороцидное воздействие. Применяют в воздушных стерилизаторах, камерах для дезинфекции посуды, инструментов, медицинских изделий из металла, стекла.

- Водяной пар оказывает антимикробное воздействие на споровые формы при температуре 120 °С, вегетативные формы – при 80 °С. Используется в камерах для обеззараживания постельного белья, одежды. В паровых стерилизаторах дезинфицируют посуду, медицинский инструментарий из стекла, резины, латекса, стойко-коррозийных металлов.

- Горячий воздух воздействует на вегетативные формы микроорганизмов и применяется для дезинфекции подготовленных изделий медицинского назначения в еще влажном состоянии. Объекты дезинфекции помещаются в специальную портативную камеру и подвергаются воздействию горячего воздуха, идущего в различных направлениях. Изделия одновременно высушиваются и обеззараживаются. Применяется для обработки посуды, игрушек и других изделий во фтизиопульмонологических стационарах, в гематологических отделениях, то есть там, где даже обычные изделия должны пройти дополнительную обработку. Температура 60–70 °С используется для мытья посуды, температура 100 °С для обеззараживания белья, посуды, игрушек.

3. **Химическая дезинфекция:** применение химических веществ в качестве дезинфицирующих средств.

Требования к дезинфицирующим средствам

- широкий спектр антимикробной активности. Дезинфицирующее средство должно обладать бактерицидным, вирулицидным, фунгицидным действием;
- моментальный обеззараживающий эффект (быстрая гибель микроорганизмов после однократного нанесения);
- устойчивость к влиянию окружающих факторов среды (активность дезинфектанта в присутствии органического субстрата – крови, мочи, мокроты и др.);
- малая токсичность, т.е. дезинфицирующее вещество должно быть безопасным для человека и животных во время приготовления, применения и после окончания его использования;
- длительный срок хранения концентратов и рабочих растворов, возможность многократного использования;
- многофункциональность – возможность дезинфекции всеми способами (путем протирания, погружения, орошения);
- короткая экспозиция (не более 60 мин);
- низкая степень агрессивности по отношению к дезинфицируемым предметам;
- лёгкая отмываемость.

Классификация и характеристика дезинфицирующих средств

Дезинфицирующие вещества по химическим группам классифицируются на:

- 1) хлорсодержащие дезинфицирующие средства;

- 2) кислородосодержащие соединения;
- 3) основе катионных поверхностно-активных веществ;
- 4) основе третичных аминов (амфотензиды);
- 5) основе спиртов: этанола, пропанола и изопропанола;
- 6) альдегиды;
- 7) гуанидины;
- 8) фенолы;
- 9) комбинированные дезинфицирующие средства.

Характеристика групп дезинфицирующих средств

1. Хлорсодержащие дезинфицирующие средства. (*хлорамин Б, сульфохлорантин паста, хлор-актив, хлорилонг 200, хлорапин, хлорекс, хлорификс, хлортаб, жавель ХТХ, хлорная известь, анолит АНК нейтральный, белодез и т. д.*).

Механизм действия: бактерицидный эффект галогенов обусловлен денатурацией белков микроорганизмов с образованием хлораминов, происходит разрушение водородных связей, нарушение вторичной структуры белков, потеря функциональной активности и гибель микроорганизмов.

Преимущества: обладают широким спектром антимикробного действия, имеют относительно небольшую экспозицию, совместимы с мылами.

Недостатки: высокая коррозионная активность, обесцвечивание тканей, раздражающее действие на слизистые оболочки органов дыхания и зрения, возможность возникновения аллергических реакций, в связи, с чем требуется применение средств защиты.

2. Дезинфицирующие средства на основе активного кислорода. (*перекись водорода (пергидроль), перал С, Аниоксид-1000, ПФК-А, оксидезин, оксигенон S, дисмозон пур*).

Препараты на основе перекиси водорода, перекисных соединений, надкислот – разлагаются на кислород и воду, являются наиболее безопасными для окружающей среды.

Механизм действия основан на выделении гидроксильных свободных радикалов, обладающих бактерицидными, противовирусными, спороцидными, фунгицидными свойствами и активностью против микобактерий туберкулеза. **Преимущества:** малотоксичны, без специфического запаха, могут применяться в присутствии людей. Новые препараты из этой группы используются и для предшествующей стерилизационной очистки, так как, в рецептуру добавлены компоненты, обладающие моющими свойствами. Выпускаются в форме порошка, гранул, что упрощает применение, хранение и транспортировку.

Недостатки: корродируют металлы.

3. Дезинфицирующие средства на основе катионных поверхностно-ак-

тивных веществ (*биодез-оптима, биодез-экстра, абсолюпол, афлоран, биомол-КСЗ, дезинфорте*).

Четвертично-аммониевые соединения (ЧАС) получили в настоящее время самое широкое распространение. К этой группе относятся обладающие антимикробным действием ЧАС, амины и амфолитные поверхностные вещества. Отличительными особенностями поверхностно-активных веществ (ПАВ) являются: узкий спектр антимикробного действия, моющее действие, отсутствие запаха и коррозионного эффекта.

Механизм действия: ПАВ повышают проницаемость мембраны и даже вызывают ее разрывы. Их противомикробное действие ослабляет анионные поверхностно-активные вещества, поэтому не следует перед применением detergentов смывать грязь с помощью мыла. ПАВ широко используются в сочетании с другими дезинфицирующими веществами. ЧАС обладают бактерицидной, фунгицидной и вирулицидной активностью в отношении вирусов, но не обладают спороцидной активностью и часто неэффективны в отношении микобактерий туберкулеза, не действуют на гидрофильные вирусы.

Преимущества: обладают моющими свойствами, используются для стерилизационной очистки изделий медицинского назначения, в том числе совмещенной с дезинфекцией, не повреждают инструменты и оборудование, малотоксичны, не оказывают раздражающего действия, не имеют резких запахов.

Недостатки: возможность появления устойчивых штаммов микроорганизмов.

4. Дезинфицирующие средства на основе третичных аминов (амфотензиды) (*биолок, мистраль, триацит N, дезигрин C*).

Новый тип дезинфектантов, интерес к которым обусловлен их высокой микробиологической активностью в отношении бактерий (включая микобактерии), грибов и вирусов, обладают невысокой токсичностью и хорошими моющими свойствами. Особенностью третичных алкиламинов является то, что они сочетают в себе свойства поверхностно активных веществ и свойства четвертичных аммониевых солей. А за счет наличия свободных аминогрупп и атома третичного азота формируют щелочную среду, что способствует повышению их антимикробной активности, особенно в композиции с другими веществами.

Механизм действия: изменяют проницаемость оболочки микробной клетки, обладают антимикробной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных (включая микобактерии туберкулеза) микроорганизмов, вирусов (включая аденовирусы, вирусы гриппа, парагриппа и др., возбудителей острых респираторных инфекций, энтеровирусы, ротавирусы, вирус полиомиелита, вирусы энтеральных, парентеральных гепатитов А, В, С, герпеса, атипичной пневмонии, птичьего и свиного гриппа, ВИЧ и др.), грибов

рода Кандида и плесневых грибов, возбудителей внутрибольничных и анаэробных инфекций.

Преимущества: невысокая токсичность, моющие свойства, биоразлагаемы, взрыво-, пожаробезопасно, хорошо растворимы в воде, эффективны при низких концентрациях и невысоких температурах, хорошо смываются с поверхностей, могут использоваться для обработки любых щелочестойких поверхностей (нержавеющая сталь, пластмасса, резина, стекло, окрашенные и деревянные поверхности), замерзают, после размораживания (возможна опалесценция) физико-химические и бактерицидные свойства сохраняются, рабочие растворы не вызывают раздражения кожи.

Недостатки: концентрат обладает местно-раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки глаз.

5. Дезинфицирующие средства на основе спиртов (этанол, пропанол-1, пропанол-2, 2-этиленгексанол, н-пропанол, а также композиционные средства на их основе в сочетании с другими действующими веществами) (*септодерм, актодерм, стериллиум, октенидерм, октенисепт, сагросепт и т.д.*).

Дезинфицирующие средства этой группы обладают бактериостатическими, туберкулоцидными, фунгицидными свойствами, однако, не уничтожают споры бактерий, в основном используются в качестве кожных антисептиков. Для дезинфекции кожных покровов используется 70% спирт. Кроме этого используется в комплексе с альдегидами в виде аэрозолей для обработки небольших труднодоступных поверхностей. Средства, содержащие спирты, фиксируют органические загрязнения, поэтому необходима предварительная очистка от крови, слизи, гноя, либо комбинация с компонентами, обладающими моющими свойствами. Этиловым спиртом рекомендуется обеззараживать изделия из металла.

Механизм действия: основан на денатурации структурных и ферментных белков микробных клеток, грибов и вирусов.

Преимущества: используются в комплексе с альдегидами в виде аэрозолей, не оставляют следов, обладают широким антимикробным спектром (кроме спор), быстро испаряются, не вызывают коррозию металлов.

Недостатки: пожаро- и взрывоопасны. Отсутствует спороцидный эффект. Возможно быстрое снижение концентрации за счет испаривания.

6. Дезинфицирующие средства на основе альдегидов (*гигасепт ФФ, деконекс 50 ФФ, дезоформ, лизоформин 3000, септодор форте, сайдекс, клин-дезин-3000 и др.*).

Альдегидсодержащие дезинфицирующие средства являются препаратами выбора при обработке эндоскопической аппаратуры, гибких эндоскопов и инструментов к ним, относятся к дезинфектантам высокого уровня. Широкий спектр антимикробного действия позволяет применять их в отделениях и кабинетах, требующих асептических условий работы и низкого уровня микробной обсемененности. Высоко токсичны, что не позволяет их использовать в

присутствии пациентов, а способность фиксировать органические загрязнения требует тщательной предварительной очистки изделий.

Механизм действия: альдегиды взаимодействуют с NH_2 -группой белков, вызывая нарушение их вторичной структуры, что приводит к необратимой коагуляции белков и гибели микроорганизмов.

Преимущества: действуют на все виды микроорганизмов, в том числе на споры, не повреждают обрабатываемые изделия, что даёт возможность использовать их для дезинфекции оборудования сложной конфигурации.

Недостатки: высокотоксичны.

7. Дезинфицирующие средства на основе гуанидинов (*полигекса-метилenguанидин гидрохлорид (ПГМГ), полигексаметиленгуанидин фосфат, БИО-ПАГ, Хлоргексидина биглюконат 20%, Биомол-С, Аквин и др.*).

В эту группу входят препараты, активно действующими веществами которых являются: поли-гексаметиленгуанидин фосфат, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, хлоргексидин биглюконат, ацетат кокоспропилендиамингуанидин и композиционные средства на их основе. Эффективны по отношению к грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам, в том числе бактерий, вирусов, грибов, плесеней, водорослей и др. Средства, содержащие гуанидины, обладают так называемым остаточным действием, то есть образуют на поверхности бактерицидную пленку. На основе гуанидинов разработаны лаки и краски с антимикробным действием.

Механизм действия: бактерицидные свойства гуанидиновых веществ обусловлены разрушительным электрохимическим воздействием на оболочку клетки,

Чтобы подействовать на клетку, антибактериальный препарат должен проникнуть через этот слой. Контактируя с поверхностью клеточной оболочки, молекулы ПГМГ, вызывают отток компонентов, обеспечивающих целостность клеточной мембраны. Можно сказать, что молекулы ПГМГ «обманывают» компоненты наружного слоя оболочки клетки и вместо того, чтобы связываться с внутренним (пептидогликановым) слоем, связываются с находящимися снаружи молекулами, тем самым образуя брешу, через которые проникают к цитоплазматической мембране остаточные количества ПГМГ. Далее, молекулы ПГМГ нарушают целостность цитоплазматической мембраны.

Преимущества: обладают низкой токсичностью, высокой стабильностью и щадящим действием на объекты, используют для дезинфекции питьевой воды и воды в плавательных бассейнах.

Недостатки: растворы фиксируют органические загрязнения, пленка обладает липкостью, тяжело удаляется с поверхностей.

8. Дезинфицирующие средства на основе фенолов (*«Амоцид», бензилфенол, хлорбетанафтол, гексахлорофен*).

Особенностью фенолов является их способность создавать остаточную

пленку на дезинфицируемых поверхностях. К этой группе дезинфицирующих средств, разрешенных для применения в ЛПУ, относятся средства на основе 2-бифенола. Они не активны в отношении вирусов и споровых форм бактерий. Препараты, содержащие производные фенолов используются для обеззараживания поверхностей, применяются в косметологии и технических сферах в качестве консервантов. Препарат «Амоцид» – концентрат на основе производного фенола, является активным туберкулоцидом. Рекомендуются для проведения текущей и заключительной дезинфекции.

Механизм действия: обладают как бактерицидным, так и бактериостатическим действием в зависимости от концентрации. В низких концентрациях блокируют дегидрогеназы, что нарушает обменные процессы в клетках, тормозит деление, рост и развитие микроорганизмов. В высоких концентрациях за счет денатурации белков приводит к увеличению проницаемости мембраны, осмозависимому лизису клетки и ее гибели.

Преимущества: эффективны против возбудителей туберкулеза.

Недостатки: гепатотоксичность, раздражение слизистой кишечника, нарушение кроветворения, эмбриотоксичность, тератогенность, неприятный запах.

9. Комбинированные дезинфицирующие средства (*Диасептик 30, Бактол, Бактол окси, Гигасепт Инстру АФ, АЛМАДЕЗ*).

Современные дезинфектанты этой группы – это многокомпонентные составы, включающие зачастую несколько различных активных действующих веществ. В их состав также входят растворители, ингибиторы коррозии, сгустители, антиоксиданты, красители, отдушки. Обладают бактерицидной, туберкулоцидной, вирулицидной и фунгицидной активностью. Комбинированные дезинфектанты позволяют избавиться от «минусов» с сохранением всех положительных качеств активных действующих веществ.

Преимущества: безопасны для человека, не повреждают обрабатываемые поверхности, обладают приятным запахом и моющим эффектом.

По классу опасности/безопасности дезинфицирующие вещества делят на 4 класса опасности:

Средства 1-го класса чрезвычайно токсичны. Не используют в лечебно-профилактических учреждениях и на фармацевтических предприятиях. Применяют только в экстремальных ситуациях, в спецкостюмах и противогазах.

Средства 2-го класса высокоопасны – к этой группе по ингаляционному воздействию (поступление в виде паров, газов, аэрозоля или комбинированное поступление – пары + аэрозоль) относятся широко известные химические средства: хлорактивные, некоторые альдегиды и др. Применяют при отсутствии людей. При этом используют средства индивидуальной защиты. Нельзя применять в детских учреждениях, на объектах питания, в организациях здравоохранения. После использования необходимы проветривание и уборка.

Средства 3-го класса умеренно опасны. Можно использовать без средств

защиты, но в отсутствие людей. Обязательно должны соблюдаться условия использования препаратов, а также важно последующее проветривание и уборка.

Средства 4-го класса малоопасны, их используют без ограничения. К ним относятся Септабик (Израиль) – порошок, Перформ (Германия) – порошок, Велтолен (Россия) – раствор, Самаровка (Россия) – концентрат и др. Работать с данными дезинфицирующими средствами можно в присутствии людей. При работе следует защищать кожу рук резиновыми перчатками.

В медицине для дезинфекции допускается только те препараты, которые по ГОСТу 12.1.007-76 относятся к 4-му классу малоопасных или 3-му классу умеренно опасных соединений.

Дезинфицирующие средства производятся в виде следующих форм:

- твёрдые (таблетки, гранулы, порошки);
- жидкие концентраты (растворы, эмульсии, пасты, кремы и др.);
- газы;
- готовые формы применения (рабочие растворы, бактерицидные салфетки, лаки, краски, аэрозольные баллоны).

Способы применения дезинфицирующих средств:

- протирание;
- орошение с применением распыляющей аппаратуры;
- распыление с помощью аэрозольного генератора;
- погружение в растворы;
- засыпание;
- использование ультразвуковых установок.

Вследствие применения дезинфектантов и антисептиков с заниженными концентрациями происходит формирование резистентных (устойчивых) штаммов.

Формирование устойчивости к дезинфектантам и антисептикам усиливает возможность контаминации микроорганизмами дезинфицирующих средств, в результате чего препараты сами становятся факторами передачи инфекции.

Устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам

Устойчивость (резистентность) микроорганизмов к дезинфектантам – свойство микробов, проявляющееся в их способности к росту и размножению в присутствии ДС.

Выделяют следующие виды устойчивости:

1. Естественная (исходная/природная устойчивость к ДС).
2. Приобретенная (отсутствует исходная/природная устойчивость к ДС).

Естественная устойчивость микроорганизмов к ДС – генетически закрепленное свойство микробов, относящихся к одному таксону, проявляющееся в устойчивости (сниженной чувствительности, нечувствительности) микроорганизмов к воздействию некоторых ДС. Такая устойчивость является

врожденным свойством микробов и характерна для всех представителей данного семейства, рода, вида. Устойчивость различных видов микроорганизмов к ДС существенно варьирует, что связано со строением и функционированием клеток, благодаря чему микроорганизмы по-разному взаимодействуют с различными антимикробными веществами и обладают неодинаковой резистентностью к воздействию химических соединений разных классов (рис. 69).

Исходная устойчивость является естественным, хромосомно-контролируемым свойством бактериальных клеток, что позволяет им ускользать от действия ДС. Данный вид резистентности обусловлен, прежде всего, строением внешних структур клетки (клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана), которые обеспечивают избирательное проникновение веществ внутрь клетки.

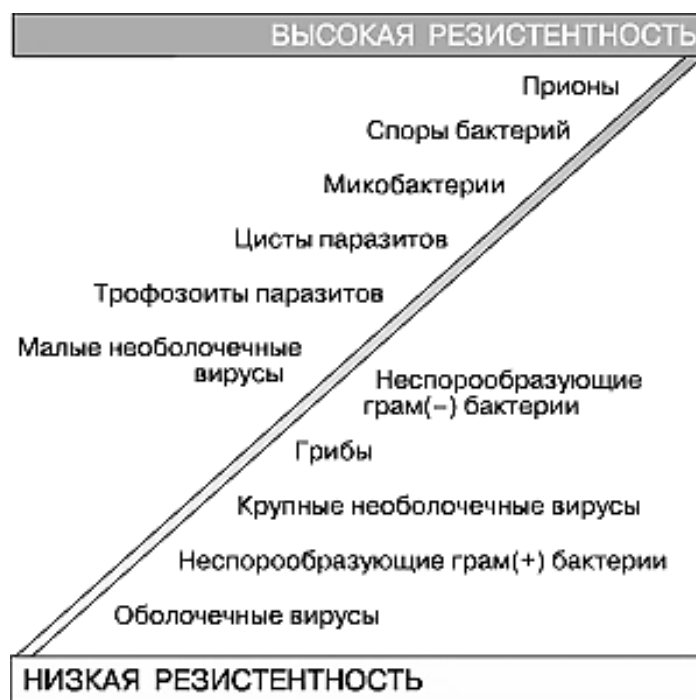


Рис. 69. Сравнительная устойчивость микроорганизмов к химическим дезинфицирующим средствам

Споры выдерживают концентрации ДС в несколько тысяч раз превышающие концентрации эффективные в отношении вегетативных клеток. Соединения ртути, ЧАС, хлоргексидин, фенолы и спирты практически не обладают спороцидной активностью, хотя могут задерживать прорастание спор. Этилена оксид, β -пропиолактон, формальдегид, глутаровый альдегид, водорода пероксид и галогены убивают споры, однако их действие достаточно медленное, процесс стерилизации должен продолжаться от 30 мин до нескольких часов. Резистентность спор обеспечивает их уникальная клеточная оболочка, которая препятствует проникновению биоцидов внутрь клетки и, возможно, нейтрализует действие некоторых из них.

Кроме того, природная устойчивость может быть связана с конститутивной выработкой микроорганизмами ферментов, вызывающих трансформацию и/или деградацию ДС, эффлюксом (активным выведением веществ из клетки), модификацией мишени действия биоцидов.

Приобретенная устойчивость микроорганизмов к ДС – адаптация микробов к воздействию этих средств, характеризующаяся формированием резистентности к бактерицидным концентрациям одного или нескольких дезинфектантов, к которым отсутствует исходная (природная) устойчивость.

Базовым признаком, заложенным в основу классификации приобретенной резистентности, являются *механизмы ее формирования*, в зависимости от которых можно выделить:

1. Генотипическую устойчивость, обусловленную:
 - мутациями;
 - переносом плазмид и транспозонов;
 - другими изменениями хромосомной и внехромосомной ДНК.
2. Фенотипическую устойчивость:
 - формирование биопленок;
 - индуцированную устойчивость.

Приобретенная генотипическая устойчивость микроорганизмов к ДС – генетически закрепленная резистентность, сформировавшаяся под влиянием ДС в результате изменений хромосомной и внехромосомной ДНК микроорганизмов.

Генотипическая устойчивость может быть связана с различными изменениями хромосомной или внехромосомной ДНК в результате мутаций или передачи плазмид, транспозонов. Так, плазмиды могут определять множественную резистентность к биоцидам. У *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* описаны плазмиды, обеспечивающие устойчивость к соединениям ртути. Плазмиды узкого спектра контролируют образование редуктазы, переводящей Hg^{++} в металлическую ртуть. Плазмиды широкого спектра помимо редуктазы кодируют одну или несколько гидролаз, которые освобождают Hg^{++} из ртутьорганических соединений, разрывая связь ртуть-углерод. Образующаяся металлическая ртуть испаряется из среды. Существование таких процессов трансформации ртутьорганических соединений делает проблематичным их использование в качестве консервантов в фармацевтике. Широкий круг хозяев у генов резистентности способствует их сохранению в природе, причем такие гены могут стабильно существовать даже в отсутствие селективного давления, т.е. в среде, не содержащей биоцидов. Селективные условия создаются в растворах дезинфектантов с концентрацией, ниже рекомендуемой, и при нарушении сроков их хранения. Помимо концентрации биоцида для развития резистентности популяции имеет значение состав среды (наличие защитных агентов, факторов роста), фаза развития и скорость размножения клеток. Например, *Pseudomonas aeruginosa* выращенная на среде с

недостаточным количеством магния, высокоустойчива к бензалкониума хлориду, тогда как выращенная на среде с недостатком углерода – высокочувствительна. Большое значение имеет температура и время культивирования. Медленнорастущие клетки менее чувствительны к биоцидам, чем быстрорастущие. Поэтому необходимо строго соблюдать стандартные условия испытания активности антимикробных агентов.

Приобретенная фенотипическая устойчивость микроорганизмов к ДС – резистентность, формирующаяся в результате воздействия дезинфектантов, не закрепленная генетически.

Одним из механизмов формирования приобретенной фенотипической устойчивости бактерий к ДС является образование *биопленок*. Микроорганизмы в составе биопленок значительно менее чувствительны к воздействию ДС по сравнению с планктонными клетками этих же видов.

Причинами пониженной чувствительности бактерий в биопленках являются:

- 1) снижение доступа ДС через матрикс к клеткам внутри биопленки;
- 2) изменение/снижение метаболической активности;
- 3) собственно химическое взаимодействие между ДС и биопленкой;
- 4) модификация микроокружения;
- 5) продукция деградационных ферментов (и нейтрализация химических веществ);
- 6) генетический обмен между клетками в биопленке.

Индукцированная устойчивость микроорганизмов к ДС – резистентность, формирующаяся в результате воздействия ДС, характеризующаяся адаптацией микробов, сопровождающейся фенотипическими изменениями клеток.

Другим признаком, положенным в основу классификации устойчивости микроорганизмов к ДС, является наличие одновременной резистентности к ДС и антибиотикам. Исходя из наличия/отсутствия устойчивости можно выделить:

1. Устойчивость к одному ДС (монорезистентность).
2. Устойчивость к другим ДС и антисептикам:
 - перекрестную
 - ассоциированную
 - сочетанную.
3. Комбинированную устойчивость.

Перекрестная устойчивость микроорганизмов к ДС – резистентность к различным дезинфектантам, относящимся к одной группе химических соединений. Так, например, микроорганизмы могут быть одновременно устойчивы к ДС разных наименований, созданных на основе одного и того же химического соединения.

Ассоциированная устойчивость микроорганизмов к ДС – резистентность к ДС, относящимся к разным группам химических соединений.

Сочетанная устойчивость микроорганизмов к ДС – устойчивость к двум и более ДС из одной группы химических соединений.

Комбинированная устойчивость микроорганизмов – одновременная устойчивость к ДС и антибиотикам.

Пути преодоления резистентности к дезинфицирующим средствам

Устойчивость микроорганизмов к применяемым дезинфектантам является одной из актуальнейших проблем, требующих решения для предупреждения формирования и распространения устойчивых к ДС штаммов микроорганизмов в учреждениях здравоохранения.

Для предотвращения устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам необходимо придерживаться ряда правил:

1. Бициды необходимо использовать в *оптимальных концентрациях*, чтобы избежать селекции устойчивых форм патогенов.
2. Необходимо осуществлять *ротацию ДС*, т.е. использовать несколько химических веществ, применяя их в определенном порядке.
3. Соблюдать время экспозиции ДС.
4. Проводить дезинфекцию воздуха в помещениях, так как микроорганизмы, присутствующие в воздухе быстро оседают на продезинфицированные объекты.
5. Использовать бактериофаги в качестве биологических дезинфектантов.

Контроль качества дезинфекции

Контроль качества дезинфекции проводят ответственные лица в рамках производственного контроля, а также органы, уполномоченные осуществлять государственный санитарно-эпидемиологический надзор. Контролируемые объекты и периодичность проведения данного вида контроля регламентируются нормативными документами, соответствующими инструкциями (методиками), утвержденными на предприятии. Контроль качества дезинфекции в производственных аптеках проводится не реже 2 раз в год.

Критериями оценки качества проведения дезинфекционных мероприятий являются:

- 1) отрицательные результаты посевов проб со всех объектов внутрипроизводственной среды фармпредприятий, в том числе аптек (отсутствие роста санитарно-показательных микроорганизмов: представителей семейства *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* и др.);
- 2) показатели обсемененности воздуха, не превышающие установленные нормативы.

Успех антимикробных мероприятий определяется адекватным выбором средств и способов обеззараживания, своевременностью проведения дезинфекции, химическим состоянием активного действующего вещества (АДВ) дезинфицирующего средства (ДС), условиями хранения дезинфектаната и др.

Контроль качества дезинфекции проводят визуальным, химическим, бактериологическим методами.

Визуальный контроль качества дезинфекции

При визуальном контроле оценивается санитарное состояние помещения, кратность и своевременность выполнения дезинфекции, знание и соблюдение инструкции, соблюдение правил использования дезинфицирующей аппаратуры, правил и норм при приготовлении рабочих растворов и их применения персоналом, ответственным за проведение генеральной уборки и дезинфекции.

Химический контроль качества дезинфекции

Определение активности и токсичности ДС осуществляется химическими методами в несколько этапов:

- 1) входной контроль вновь поступившей партии ДС;
- 2) контроль свежеприготовленного рабочего раствора на рабочем месте (контроль концентрации АДВ);
- 3) определение концентраций АДВ рабочих растворов в процессе их эксплуатации, то есть изменения химических свойств препарата при проведении дезинфекционных мероприятий;
- 4) качество отмывки объекта от остатков рабочих растворов.

Для определения антимикробной активности дезинфектантов и антисептиков используют различные методы.

1. Качественный тест: взвесь микроорганизма вносят в раствор антимикробного препарата. После определенной экспозиции (2–60 мин.) 0,1 см³ взвеси с препаратом (аликвоту) вносят в пробирку с нейтрализатором и делают высев на агаризованную среду для определения жизнеспособности тест-культуры.

2. Количественный тест: взвесь микроорганизма вносят в раствор антимикробного препарата. После экспозиции (2–60 мин.) аликвоту (0,1 см³) вносят в пробирку с нейтрализатором и делают высев на агаризованную среду с последующим подсчетом выросших колоний. Контроль – та же взвесь микроорганизма, не подвергшаяся действию антимикробного вещества.

Антимикробную активность определяют по формуле:

$$MA = \log N_c - \log N_d,$$

где: $\log N_c$ – число колоний, выросших при посеве контрольной взвеси;
 $\log N_d$ – число колоний, выросших при посеве из взвеси с антимикробным агентом.

3. Определение влияния бионагрузки:

- в раствор антимикробного вещества добавляют определенное количество микробной взвеси и выдерживают определенное время;
- делают высев и определяют число выросших колоний;

- через 10 мин в этот же раствор вносят новую дозу микроорганизма и выдерживают определенное время;
- делают высев и определяют число выросших колоний;
- повторяют операцию еще через 10 мин.

Метод позволяет определить способность антимикробного агента сохранять активность в присутствии увеличивающейся микробной нагрузки, а также время сохранения им антимикробной активности.

4. Тест, приближенный к условиям практического применения (для антисептиков):

- проводится на людях-добровольцах;
- на кожу кисти рук наносят взвесь микроорганизма (*E. coli*), подсушивают 3 мин на воздухе;
- протирают кожу испытуемым раствором антисептика;
- делают смыв с рук жидкой питательной средой;
- определяют количество жизнеспособных клеток в смывах.

Аналогичным образом микробную взвесь наносят на поверхность оборудования, стен, пола помещения с последующей обработкой и определением количества жизнеспособных клеток.

Бактериологический контроль качества дезинфекции

Бактериологический контроль применяется главным образом при оценке качества заключительной дезинфекции. Основным методом данного контроля является метод смывов. Смывы делают с объектов, которые могут быть источниками микробной контаминации конечного продукта (готовых лекарственных средств).

Объектами для бактериологического контроля являются:

- воздушная среда;
- поверхности помещений и оборудования;
- дезинфекционные камеры* и стерилизаторы;
- трубопроводы подачи воды очищенной**;
- посуда;
- исходные, промежуточные и готовые продукты;
- вода очищенная;
- готовые лекарственные формы;
- вспомогательные вещества и материалы;
- руки и санитарная технологическая одежда персонала.

* *бактериологический контроль качества работы дезинфекционных камер проводится ежемесячно с использованием специальных биотестов.*

** *контроль дезинфекции трубопровода производят после его сборки, в процессе эксплуатации не реже 1 раза в 14 дней, а также при неудовлетворительных результатах микробиологических анализов.*

По результатам бактериологического контроля, который в аптеках осуществляется не реже двух раз в квартал, проводится освидетельствование санитарно-гигиенического состояния объекта. При обнаружении санитарно-показательных микроорганизмов в одной из проб проводятся гигиенические и противоэпидемические мероприятия, первым из которых является дезинфекция.

Определение эффективности обеззараживания посуды. Контролю подлежат не менее трех единиц обработанной посуды. Стерильные марлевые салфетки (5×5 см) захватывают стерильным пинцетом, увлажняют стерильной нейтрализующей жидкостью (водопроводная вода и нейтрализатор, концентрация которого в 10 раз меньше концентрации дезинфектанта). Если в качестве дезинфектанта применяли хлорсодержащие средства, для нейтрализации используют раствор тиосульфата натрия, если щелочные – раствор уксусной кислоты; для формальдегидсодержащих препаратов используют нашатырный спирт; при отсутствии специфического нейтрализатора (фенолсодержащие препараты и др.) – стерильную воду. Смоченной салфеткой протирают в течение 1 мин поверхности посуды. После этого салфетку помещают в пробирку со стеклянными бусами и встряхивают в течение 5 мин.

Для контроля дезинфекции поверхностей производят смывы стерильной марлевой салфеткой. Это делается не ранее чем через 45 мин и не позднее 2 ч после дезинфекции.

Смыв делают на нескольких площадях размером 10×10 см, ограниченных шаблоном. Общая площадь исследуемой поверхности должна быть не менее 500 см² с двух или трех смежных участков проверяемого объекта. Марлевые салфетки погружают после смыва в колбы со стерильной водой и нейтрализатором. Вместо салфеток можно использовать стерильные ватные тампоны массой 0,25–0,33 г, которые помешают в колбочки со стерильным нейтрализующим раствором.

В течение 2 ч все смывы доставляют в лабораторию с документом, в котором указывают: название и адрес аптеки, дату и время дезинфекции, дату и время взятия проб, санитарное состояние помещений, качество механической очистки, должность и подпись лица, взявшего пробы для исследования. Пробы в лаборатории исследуют в день их поступления с использованием элективных питательных сред.

Для идентификации кишечной палочки пробы (0,5 см³) высевают на модифицированную среду Хейфеца (5 мл) и выдерживают в термостате при 43 °С в течение 12–18 ч. Помутнение среды Хейфеца и изменение ее цвета после инкубирования в термостате из малинового в зеленый или салатный при газообразовании свидетельствует о наличии в посевах кишечной палочки. Другие цветовые изменения среды, обусловленные ростом другой микрофлоры, не учитывают. Присутствие кишечной палочки в пробе определяют

также посевом на среду Эндо. Колонии лактозоположительной кишечной палочки приобретают на этой среде малиново-красное окрашивание.

Для идентификации стафилококков пробу (0,5 см³) высевают в 5% сахарозный бульон (5 см³) с, последующим пересевом через 24 ч инкубации в термостате при 37 °С на 8,5% солевой МПА и снова выдерживают 24 ч при той же температуре. Выросшую на питательных средах бактериальную культуру исследуют под микроскопом.

Дезинфекцию признают удовлетворительной, если бактериального роста нет при профилактической дезинфекции во всех пробах; текущей – не менее чем в 90% проб; заключительной – во всех пробах.

Метод индикаторных трубок. Качество аэрозольной дезинфекции наряду с бактериологическим можно контролировать и другим, менее трудоемким методом, принцип которого заключается в следующем: об эффективности обеззараживания объекта судят по глубине изменения цвета индикаторной среды, пробирку с которой помещают на поверхности объекта. Индикаторная среда изменяет свой цвет под воздействием формальдегида, который применяют при аэрозольной дезинфекции.

Качество дезинфекции оценивают через 12 или 24 ч экспозиции, измеряя линейкой глубину окрашивания индикаторной среды в пробирке.

Дезинфекцию считают эффективной, если глубина окрашивания после 24-часовой экспозиции будет не менее 30 мм для сульфатной среды и 26 мм для контроля качества дезинфекции также используются «ДЕЗИКОНТЫ» – индикаторные полоски визуального экспресс-контроля концентраций дезинфектантов.

Техника проведения экспресс-контроля

1. В мерный стакан наливают 30–50 мл контролируемого рабочего раствора комнатной температуры.
2. Полоску с нанесенными на нее химическими составами погружают полностью в раствор на 5 с.
3. Затем полоску извлекают, удаляют с нее избыток раствора о край стакана и кладут на белую полимерную подложку.
4. По истечении 20–25 с сопоставляют цвет индикаторной полоски с цветовой шкалой элемента сравнения.

В местах, где используются дезинфицирующие средства, должны применяться несколько типов дезинфектантов. Эффективность дезинфицирующих веществ и процедуры должны отслеживаться. Мониторинг должен проводиться на регулярной основе, чтобы выявить очаги развития устойчивых микроорганизмов. Если в чистом помещении обнаружены микроорганизмы, они должны быть протестированы на чувствительность к дезинфектантам, которые использовались в этом помещении.

Асептика

Асептика – совокупность методов и приёмов работы, направленных на предупреждение попадания инфекции в рану, в организм больного, создание безмикробных, стерильных условий для производства лекарственных путём использования организационных мероприятий, активных обеззараживающих химических веществ, а также технических средств и физических факторов.

В современной асептике сохранили своё значение два основных её принципа:

- 1) всё, что соприкасается с раной, должно быть стерильно;
- 2) всех хирургических больных необходимо разделять на два потока: «чистые» и «гнойные».

В современных условиях асептика обеспечивается:

- организацией мероприятий, препятствующих инфицированию раны и организма больного и загрязнению производственных фармацевтических помещений;
- применением активных обеззараживающих химических веществ;
- использованием технических средств и физических факторов.

Организация асептики заключается в проведении комплекса мероприятий, препятствующих внедрению инфекционных агентов в рану и организм больного:

- стерилизация инструментов, материалов, приборов, имплантов и др.;
- обработка рук хирурга и операционного поля;
- соблюдение особых правил и приемов работы при проведении инвазивных методов лечения и диагностики;
- осуществление специальных санитарно-гигиенических и организационных мероприятий в лечебном учреждении.

Основными источниками инфицирования являются экзогенный и эндогенный.

Экзогенный источник – из внешней среды (естественно-природный и госпитальный), факторами передачи при этом являются:

- воздух с частицами пыли;
- выделения из носоглотки и верхних дыхательных путей больных, посетителей, медперсонала и сотрудников фармацевтических производств;
- инструменты, оборудование, одежда и т.д.;

Эндогенный – из организма человека (инфекции кожи, ротовой полости, желудочно-кишечного тракта и др.).

Таким образом, организация асептических условий необходима не только в лечебных учреждениях, но и при производстве лекарственных препаратов, что обусловлено:

- введением некоторых препаратов с нарушением целостности защитных барьеров организма (кожа, слизистые оболочки);
- введением растворов в стерильные полости организма;

- нанесением препаратов на конъюнктиву глаза, обладающей повышенной чувствительностью к микроорганизмам;
- низкой сопротивляемостью организма детей до 1 года к инфицированию;
- возможной утратой эффективности лекарственных препаратов, под влиянием ферментов микроорганизмов.

В асептических условиях должны изготавливаться следующие группы лекарственных средств:

- растворы для инъекций и инфузий;
- растворы для инстилляций в стерильные полости;
- жидкие лекарственные формы для новорожденных и детей до 1 года;
- препараты в жидкой лекарственной форме, содержащие антибиотики и другие антимикробные вещества;
- препараты для нанесения на раны и ожоговые поверхности;
- офтальмологические препараты;
- жидкие лекарственные препараты в виде внутриаптечной заготовки.

При производстве фармацевтической продукции под асептикой понимают *условия и комплекс мероприятий, направленных на предотвращение микробного и другого загрязнения при изготовлении стерильной продукции на всех этапах технологического процесса.*

Источниками микробной контаминации лекарственных препаратов при их производстве являются:

- воздух;
- поверхность оборудования;
- персонал;
- вспомогательные и упаковочные материалы;
- химические субстанции;
- вода.

Для создания асептических условий при производстве качественных лекарственных препаратов необходимо:

- наличие помещений асептического блока;
- наличие специального оборудования для поддержания асептических условий (воздушного шлюза, ламинарного бокса, бактерицидных облучателей, ковриков для обеспыливания обуви);
- наличие устройств кондиционирования, фильтрации и стерилизации воздуха;
- соблюдение порядка обработки помещений и оборудования;
- подготовка персонала к работе в асептических условиях;
- соблюдение обработки, мойки тары и вспомогательных материалов;
- соблюдение правил стерилизации лекарственных препаратов, вспомогательных веществ, тары и материалов.

Под асептическим блоком понимают *специально выделенные и оборудованные помещения, обеспечивающие снижение проникновения, препятствующие образованию микробиологических загрязнений и их задержку.*

Структура асептического блока:

- моечная;
- стерилизационная для посуды;
- производственные чистые помещения;
- фасовочной;
- стерилизационная для лекарственных препаратов;
- контрольно-маркировочной комнаты.

Требования к асептическому блоку установлены в международном стандарте «Good Manufacturing Practices» (GMP) – «Правила правильного производства», которые приняты на территории России (GMP – единая система требований по организации производства и контролю качества лекарственных средств на всех этапах производства) и ГОСТ Р 52249-2009 (Правила производства и контроля качества лекарственных средств).

Стерилизация

Слово «стерилизация» в переводе с латинского означает обеспложивание. В практической работе под **стерилизацией** понимают методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни включая, бактерии и их споры, грибы, вирусы, а также прионового белка, как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов, на оборудовании и лекарственных средствах.

Термин «стерильность» имеет абсолютное значение и в результате стерилизации, объект становится свободным, как от патогенных, так и от сапрофитных микробов.

Сложность проблемы стерилизации в фармации заключается, с одной стороны, в высокой жизнеспособности и большом разнообразии микроорганизмов, с другой – термолабильностью многих лекарственных веществ и лекарственных форм (эмульсий, суспензий и др.) Отсюда исходят требования к методам стерилизации, основным из которых является сохранение свойств лекарственных форм и освобождение их от микроорганизмов. Методы стерилизации должны быть удобными для использования в условиях фармацевтического производства, особенно аптек лечебно-профилактических учреждений, в рецептуре которых инъекционные растворы составляют до 60–80%.

Существуют различные методы и способы стерилизации.

Способы стерилизации:

- 1) физические, основанные на действии высокой температуры, ультрафиолетовых лучей, токов высокой частоты, ионизирующих излучений, вызывающих гибель микроорганизмов;

- 2) механические, заключающиеся в отделении микробов фильтрованием жидкостей через микропористые фильтры, задерживающие микробы в своих порах;
- 3) химические, основанные на бактерицидности различных химических веществ.

Методы стерилизации

1. *Термическая стерилизация:*
 - паровая;
 - воздушная;
 - гласперленовая;
 - инфракрасная стерилизация.
2. *Химическая стерилизация:*
 - применение растворов химических веществ;
 - газовая.
3. *Холодная стерилизация:*
 - фильтрация;
 - радиационная;
 - плазменная;
 - озоновая.

Возможность и целесообразность применения того или иного способа определяются:

- 1) материалом, из которого состоит изделие;
- 2) конструкцией изделия;
- 3) сроками стерильности изделия;
- 4) оперативностью метода.

Преимущества и недостатки различных методов стерилизации указаны в таблице 3.

Таблица 3

Преимущества и недостатки различных методов стерилизации

Метод	Преимущества	Недостатки
Паровая стерилизация	<ul style="list-style-type: none"> • Наиболее распространенный метод стерилизации. • Безопасен для окружающей среды и персонала. • Короткая экспозиция. • Не обладает токсичностью. • Низкая стоимость. • Не требует аэрации. 	<ul style="list-style-type: none"> • Качество стерилизации может быть нарушено при неполном удалении воздуха, повышенной влажности материалов и плохом качестве пара. • Могут повреждаться изделия, чувствительные к действию температуры и влажности.
Воздушная стерилизация	<ul style="list-style-type: none"> • Низкие коррозионные свойства. • Глубокое проникновение в материал. • Безопасен для окружающей среды. • Не требует аэрации. 	<ul style="list-style-type: none"> • Длительная экспозиция. • Очень высокая энергопотребляемость. • Могут повреждаться термочувствительные изделия.

Стерилизация окисью этилена	<ul style="list-style-type: none"> • Проникновение в упаковочные материалы и пластиковые пакеты. • Можно использовать для стерилизации большинства медицинских изделий. • Прост в обращении и контроле. 	<ul style="list-style-type: none"> • Требуется время для аэрации. • Маленький размер стерилизационной камеры. • Окись этилена токсична, является вероятным канцерогеном, легко воспламеняется.
Стерилизация плазмой перекиси водорода	<ul style="list-style-type: none"> • Низкотемпературный режим. • Не требует аэрации. • Безопасен для окружающей среды и персонала. • Конечные продукты нетоксичны. • Прост в обращении, работе и контроле. 	<ul style="list-style-type: none"> • Нельзя стерилизовать бумажные изделия, белье и растворы. • Маленький размер стерилизационной камеры. • Нельзя стерилизовать изделия с длинными или узкими внутренними каналами. • Требуется синтетическая упаковка.
Стерилизация парами раствора формальдегида	<ul style="list-style-type: none"> • Пожаро- и взрывобезопасен. • Можно использовать для стерилизации большинства медицинских изделий. 	<ul style="list-style-type: none"> • Необходимость отмывания поверхности от остатков формальдегида. • Обладает токсичностью и аллергенностью. • Длительная экспозиция. • Длительная процедура удаления формальдегида после стерилизации.
Стерилизация озоном	<ul style="list-style-type: none"> • Низкий температурный режим. • Короткая экспозиция. • Глубокое проникновение в материал. • Возможность стерилизации термоустойчивых изделий. • Стерилизация бумажных изделий и белья, оптических деталей, изделий из полимеров и стекла. • Большой объем стерилизационной камеры. • Не требует аэрации. • Не обладает токсичностью. • Безопасен для окружающей среды. • Низкая стоимость. 	<ul style="list-style-type: none"> • Нельзя стерилизовать изделия в упакованном состоянии.

Термическая стерилизация

Прокаливание на огне (фламбирование) – надежный метод стерилизации бактериологических петель, металлических и стеклянных предметов, фильтров, фарфоровых чашек и т.д. Прокаливание осуществляется в муфельных или тигельных печах нагреванием объекта до 500–800 °С или же его прокаливанием на прямом огне. Однако применяется ограниченно ввиду их порчи.

Стерилизация сухим жаром или горячим воздухом производится в сушильных шкафах или печах Пастера при температуре 160–200 °С в течение 1–1,5 ч по достижении заданной температуры. Эффективность стерилизации зависит от температуры и времени. Равномерность прогрева объектов определяется степенью их теплопроводности и точностью расположения внутри стерилизационной камеры для свободной циркуляции горячего воздуха.

Воздушным методом стерилизуют лабораторную посуду, инструменты. Этот метод используется и для стерилизации термостойких порошкообразных лекарственных веществ.

Растворы лекарственных веществ нельзя стерилизовать в сушильных шкафах, так как из-за плохой теплопроводности воздух, имеющий температуру 100–120 °С, не обеспечивает быстрый нагрев растворов до температуры стерилизации. Так, например, раствор натрия хлорида (объем 200 мл), помещенный в сушильный шкаф с температурой 120 °С, через час прогревается всего лишь до 60 °С. Горячий воздух более высокой температуры может вызвать разложение лекарственных веществ и разрыв склянок вследствие разницы давлений внутри и снаружи флаконов.

Предметы, стерилизуют в упаковке из бумаги мешочной непропитанной, бумаги мешочной влагопрочной, бумаги для упаковывания продукции на автоматах марки Е и крафт-бумаге или закладывают в металлические пеналы для предохранения от последующего загрязнения. Необходимо помнить, что при температуре выше 170 °С начинается обугливание бумаги, ваты, марли, а при более низкой температуре не происходит гибели спор.

Паровая стерилизация или стерилизация насыщенным паром под давлением является наиболее надежным и быстрым методом стерилизации. Обеспложивание достигается воздействием пара, температура которого под давлением выше, чем температура кипящей воды: при давлении 0,5 атм 112 °С, при 1 атм. 121 °С, при 1,5 атм 127 °С и при 2 атм 134 °С.

В автоклаве (аппарат для стерилизации паром под давлением) возможно нагревание воды при повышенном давлении (рис. 70).

Это повышает точку кипения воды и, соответственно, температуру пара до 134 °С (при давлении 2 атм).

Паровые стерилизаторы состоят из трех вертикально установленных стальных цилиндров, размещенных один в другом. Внутренний цилиндр (стерилизационная камера) с нижним выпуклым днищем является стерилизационной камерой, в которую загружаются подлежащие стерилизации предметы. Средний цилиндр называется водопаровой камерой, в которую заливается вода, превращающаяся при нагревании в пар. Водопаровая камера закрывается чугунной крышкой, вращающейся на петлях. Водопаровая и стерилизационная камеры сообщаются между собой через выемки, сделанные в бортах стерилизационной камеры.

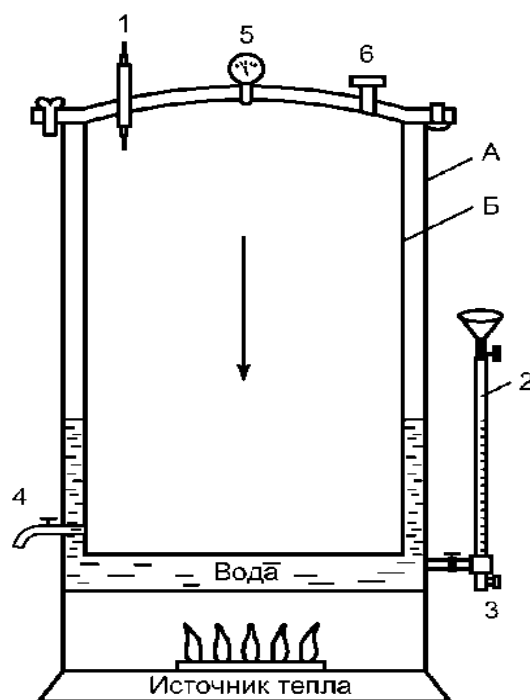


Рис. 70. Автоклав (схема). А и Б – наружная и внутренняя стенки автоклава;
1 – термометр; 2 – водомерное стекло; 3 – впускной кран; 4 – выпускной кран;
5 – манометр; 6 – предохранительный клапан

Наружный цилиндр – кожух, защищает водопаровую камеру от тепловых потерь, а обслуживающий персонал от ожогов. Паровые стерилизаторы снабжаются манометром, предохранительным клапаном. Для заливания воды в водопаровую камеру имеется воронка. Под днищем водопаровой камеры расположен источник нагрева воды. Пар, получающийся в результате кипения воды, поступает в верхнюю часть стерилизационной камеры. Перед началом прогрева краник на отводящей трубе остается открытым, и через трубку выходят воздух и пар. Затем отводящая трубка перекрывается краником, давление повышается и вещи, находящиеся в стерилизаторе, прогреваются паром.

Наряду с простейшими конструкциями в настоящее время существуют паровые стерилизаторы, представляющие собой сложные автоматические устройства, оснащенные различными приборами и аппаратами, в которых применяют различные системы для удаления воздуха и одновременного прогрева стерилизационной камеры, механизмы для автоматической загрузки и выгрузки стерилизуемых предметов, специальную контрольную и регистрирующую аппаратуру.

В стерилизационную камеру стерилизуемые предметы закладывают в стерилизационных коробках (биксах) или в двойном слое хлопчатобумажной ткани (бязь, полотно и т.п.) или в растительном пергаменте марок А и Б, или в бумаге мешочной непроницаемой и влагопрочной, полиэтиленовой пленке высокой прочности, или в поливинилхлоридном пластике. Стерилизационные коробки бывают разных размеров и формы (круглой или квадратной) и

предназначены не только для стерилизации в них перевязочных материалов, белья и инструментов, но и для последующего хранения простерилизованных изделий. Стерилизационные коробки выпускаются с фильтрами и без фильтров. При применении последних перед укладкой в них стерилизуемых изделий коробку изнутри выстилают одним слоем хлопчатобумажной ткани.

В автоклаве обычно стерилизуют при давлении 1–1,5 атм различные питательные среды, растворы, белье, резину, перевязочный материал и др. При давлении 2 атм обеззараживают инфицированный материал и отработанные культуры микробов. Стерилизация в автоклаве таких веществ, как вазелин, масло, песок, малоэффективна вследствие того, что в них пар проникает плохо или совсем не проникает.

Стерилизация текущим паром проводится в паровом стерилизаторе при не завинченной крышке и открытом выпускном кране. На дно наливают воду и нагревают до 100 °С. Образующийся пар движется вверх через заложенный материал и стерилизует его. Так как однократное действие паров воды не убивает споры, применяют **дробную стерилизацию** – 3 дня подряд по 30 мин. Споры, не погибшие при первом прогревании, прорастают до следующего дня в вегетативные формы и погибают при втором и третьем прогревании.

Для веществ, разрушающихся при 100 °С (например, жидкости, содержащие белок), применяют другой вид дробной стерилизации – **тиндализацию**. Стерилизуемое вещество прогревают на водяной бане по 1 ч при 56–60 °С в течение 5–6 дней. Это надежный и бережный способ стерилизации термолабильных лекарственных веществ. Однако, вследствие длительности он малопригоден для аптек и в настоящее время почти не используется.

Для освобождения от вегетативных форм микробов прибегают к **пастеризации** однократному прогреванию при 70 °С в течение 30 мин с последующим быстрым охлаждением и хранением на холоде, чтобы не проросли споры. Этот метод применяют для обеззараживания и сохранения молока.

Гласперленовая стерилизация (стерилизация в среде нагретых стеклянных шариков).

В стерилизаторах, стерилизующим средством в которых является среда нагретых стеклянных шариков (гласперленовые шариковые стерилизаторы), стерилизуют изделия, применяемые в стоматологии, косметологии (боры зубные, головки алмазные, дрельборы, а также рабочие части гладилок, экскаваторов, зондов и др.). Изделия стерилизуют в неупакованном виде по режимам, указанным в инструкции по эксплуатации конкретного стерилизатора, разрешенного для применения. Метод крайне прост – инструмент погружается в среду мелких стеклянных шариков, нагретых до температуры 190–290 °С (таким образом, чтобы над рабочей поверхностью инструмента оставался слой шариков не менее 10 мм) на 20–180 с, в зависимости от размера и массы инструмента. После стерилизации инструменты используют сразу по назначению.

Инфракрасная стерилизация. Инфракрасный метод стерилизации основан на использовании кратковременного импульсного инфракрасного излучения галогеновыми лампами – термоизлучателями, размещёнными внутри в рабочей камере стерилизатора и создающими температуру 200–203 °С.

В зависимости от вида инструмента, продолжительность полного цикла стерилизации составляет от 10 до 25 мин, включая этап выхода на режим и охлаждение, после чего инструменты могут использоваться по назначению. В таких стерилизаторах могут быть простерилизованы без упаковки цельнометаллические термостойкие инструменты, включая щипцы и ножницы.

К недостатку метода следует отнести общий недостаток термических методов – ограничение по материалу обрабатываемых изделий, кроме того – отсутствие упаковки и индикаторов контроля стерилизации.

Химическая стерилизация

Этот метод основан на высокой специфической (избирательной) чувствительности микроорганизмов к различным химическим веществам, что обусловливается физико-химической структурой их оболочки и протоплазмы. Химическая стерилизация подразделяется на стерилизацию газами и стерилизацию растворами.

Стерилизация растворами. Для химической стерилизации растворами используют пероксид водорода и надкислоты (дезоксон-1), стерилизацию проводят в закрытых емкостях из стекла, пластмассы или емкостях, покрытых неповрежденной эмалью. Эффективность стерилизации растворами зависит от концентрации активно действующего вещества, времени стерилизационной выдержки и температуры стерилизующего раствора. Для стерилизации используют 6% раствор пероксида водорода при температуре стерилизующего раствора не менее 18 °С, время стерилизационной выдержки составляет 6 ч, при температуре 50 °С – в два раза меньше. Для стерилизации используют также 1% раствор дезоксона-1 (по надуксусной кислоте) при температуре стерилизующего раствора не менее 18 °С, время стерилизационной выдержки составляет 45 мин. Химическую стерилизацию растворами проводят при полном погружении изделия в раствор, после чего изделие промывают стерильной водой в асептических условиях.

Химическая стерилизация, применяется для обеспложивания растворов, содержащих термолабильные лекарственные вещества. В фармацевтической практике с этой целью находят применение следующие вещества:

Нипагин – метиловый эфир параоксибензойной кислоты, малорастворимый в воде (0,25% при 20 °С) и дающий хорошие результаты уже в концентрации 0,05%. Применяется в концентрации 0,25%, в которой его бактерицидность превышает таковую фенола в 2,6 раза.

Нипазол – пропиловый эфир параоксибензойной кислоты, малорастворимый в воде (0,03% при 20 °С). По бактерицидности действеннее нипагина более чем в 5 раз. Ввиду малой растворимости в воде рекомендуется применять

0,07% раствор смеси 7 частей нипагина и 3 частей нипазола.

Хлорбутанолгидрат (хлорэтон) – бесцветное кристаллическое вещество с запахом камфоры. Применяется в концентрации до 0,5%.

Трикрезол – метилфенол (смесь всех трех изомеров), обладающий большей бактерицидностью, чем фенол, и при этом значительно меньшей ядовитостью. Применяется в концентрации до 0,3%.

Антимикробные вещества ни в коем случае нельзя вводить в состав инъекционного лекарства произвольно. Это делается только с согласия врача и по соответствующей прописи. На сигнатуре должно быть указано наименование и количество использованного антимикробного средства.

Метод рекомендуется для изделий из полимерных материалов, резины, стекла, коррозионностойких материалов.

Контроль параметров химической стерилизации растворами проводят химическим и физическим методами, определяя содержание активно действующего вещества в исходном и рабочем растворах, а также температуру рабочего раствора.

В заключение следует отметить, что среди лекарственных веществ имеются вещества, обладающие сильным бактерицидным действием, поэтому растворы этих веществ не нуждаются в стерилизации. К таким веществам относятся гексаметилентетрамин, аминазин, дипразин, колларгол, протаргол, сулема (0,1% и более), калия перманганат (0,1% и более) и др.

Газовая стерилизация. Этот вид химической стерилизации основан на применении летучих дезинфицирующих веществ, легко удаляемых из стерилизуемого объекта, путем слабого нагревания или вакуума. Применяется для стерилизации чувствительных к нагреванию лекарственных веществ. На практике используются два вещества – окись этилена и р-пропиолактон. Их антимикробное действие основано на спонтанном гидролизе, которому указанные газы подвергаются в растворе, в результате чего образуются соединения, непосредственно действующие на микроорганизмы.

Жидкая окись этилена кипит при 10,7 °С, хранится в стальных баллонах, легко воспламеняется, раздражающе действует на кожу. В концентрации 0,5 мг на 1 мл окись этилена становится безвредной для человека. Для еще большего уменьшения вредного воздействия применяется в смеси с углекислым газом (9+1 часть). Окись этилена используют для стерилизации как термолabile веществ, так и инструментов, аппаратуры, пластмасс, перевязочных материалов. Обработку осуществляют в специальных аппаратах с камерами, где поочередно создают вакуум и давление, после чего производят 2–4-кратную обработку стерильным воздухом. Для стерилизации растворов достаточно 400–500 мг окиси этилена на 1 л при 20 °С; длительность экспозиции 6 ч. Для стерилизации растворов р-пропиолактоном применяют 0,2% объемную концентрацию газа при 37 °С в течение 2 ч. При химической стерилизации газами погибают вегетативные формы микроорганизмов и плесневые

грибы. Чувствительность различных видов микроорганизмов к ядовитым газам весьма индивидуальна. Так, стрептококки погибают в воздухе при концентрации этилена оксида 500 мг/м^3 в течение 6 ч. Для уничтожения стафилококков (за это же время) необходимо повысить концентрацию газа в воздухе до 1000 мг/м^3 , т.е. в два раза. При стерилизации газы поступают в стерилизуемую среду при давлении до 2 кгс/см^2 . Продолжительность стерилизации зависит от проницаемости упаковки, толщины слоя, материала и продолжается от 4 до 20 ч.

Холодная стерилизация

Стерилизация *фильтрованием* через бактериальные фильтры применяется для освобождения жидкостей от бактерий. Этот метод используют в тех случаях, когда стерилизующая жидкость портится от нагревания, при необходимости отделения бактериальных клеток от растворимых продуктов их жизнедеятельности (экзотоксины, антибиотики и др.), фагов, вирусов. Бактериальные фильтры изготовляют из фарфора, каолина, мелко пористого стекла пирекс, асбеста, целлюлозы, нитроцеллюлозы и других мелкопористых материалов. В механизме стерилизации фильтрованием играют роль размер пор и адсорбция микробов на стенках пор фильтров.

Фильтры имеют форму свечей (керамические свечи Шамберлана, Беркефельда) или пластинок из асбеста, нитроцеллюлозы (мембранные фильтры) или фильтры из волокнистых материалов (фильтры Зейтца), которые вкладывают в специальные фильтровальные приборы. Перед работой их фильтры стерилизуют. Фильтрацию производят с разрежением воздуха внутри сосуда-приемника.

Мембранные фильтры применяют для достижения высокой стерильности. Фильтрующей частью является мембрана – пористый диск, изготовляемый из эфиров целлюлозы или фторопласта, толщиной около 100 мкм с порами размером от $0,2$ до 3 мкм . Они устойчивы к действию воды, разбавленных щелочей и кислот. После высушивания мембранные фильтры становятся хрупкими (особенно целлюлозные), поэтому в перерывах между использованием их хранят в дистиллированной воде с добавлением антимикробного средства.

К группе фильтров из волокнистых материалов – бактериальных фильтров – относятся фильтры Зейтца и фильтры Сальникова. Основными частями фильтра Сальникова являются корпус, состоящий из крышек с входными штуцерами и рам (три или семь штук) с сетками и штуцерами. Для фильтрации служат асбестовые пластины, имеющие диаметр до 300 мм .

Пластины вкладывают между рамами и крышками, которые соединяются друг с другом с помощью шпилек и гаек-барашков. Фильтруемая жидкость проходит через асбестовые пластины, попадает в межрамное пространство и выходит наружу через выходные штуцеры рам. Фильтр Сальникова, как и другие бактериальные фильтры, работает под давлением. Перед работой собранный фильтр подвергают тепловой стерилизации.

К керамическим свечам относятся фильтры, имеющие вид полых цилиндров, выполненных из неглазированного фарфора и открытых с одного конца. Фильтрация может осуществляться двумя способами: либо жидкость вводят внутрь фильтра, и она, просачиваясь через пористые стенки, вытекает в стерильный приемный сосуд, либо, наоборот, жидкость просачивается через стенки внутрь свечи и оттуда собирается в стерильный сосуд. Керамические свечи работают под вакуумом. Действие свечей тем совершеннее, чем мельче и равномернее их поры. Свечи требуют аккуратности в работе; малейшая трещина делает их непригодными. Через один фильтр можно пропускать только одноименные растворы. Вследствие прорастания фильтров (засасывание микробов внутрь свечи) необходима их периодическая очистка (выщелачивание бактериальных тел паром в автоклаве) или стерилизация сухим жаром при 150–170 °С в течение 1 ч.

Стеклянные микропористые фильтры чаще, чем другие мелкопористые фильтры, употребляются в аптечном производстве.

В стеклянных сосудах закрепляются фильтры, имеющие вид дисков или пластинок (изготовленных из зерен стекла с диаметром до 2 мкм). Для фильтрации при помощи вакуума удачной моделью являются стеклянные бактериологические фильтры-воронки, впаянные в колокол, производимые в Германии на заводах Шотта. В боковой поверхности колокола имеется трубка, посредством которой создаются условия вакуума. Фильтруемые растворы пропускаются через стеклянные пластины с диаметром пор 0,7–1,5 мкм (фильтр-воронку). Далее стерильный фильтрат поступает в склянку, расположенную внутри колокола под фильтром-воронкой. Перед применением фильтры-воронки стерилизуют паром при избыточном давлении при температуре 120 °С в течение 20 мин или воздушным методом при температуре 180 °С в течение 1 ч. После использования фильтрационные пластины промываются струей дистиллированной воды. Если с поверхности пластин требуется удалить не только механические частицы, то проводят химическую очистку: пластины на 10–12 ч погружают в смесь равных частей 2% раствора натрия или калия нитрата и перхлората в концентрированной кислоте серной, подогретой до температуры 100 °С (образовавшиеся продукты реакции растворимы в воде и не адсорбируются фильтром). По возможности для каждого раствора применяют отдельный фильтр.

Стерилизация фильтрованием очень удобна и экономически выгодна для использования в аптечных условиях (например, для стерилизации глазных капель (особенно с витаминами), которые готовят в аптеках в большом количестве). Другим преимуществом по сравнению с методами термической стерилизации является возможность стерилизации термолабильных веществ. Таким образом, стерилизация фильтрованием – перспективный метод стерилизации инъекционных растворов, глазных капель, жидких лекарственных форм для новорожденных и детей до 1 года.

Радиационный метод стерилизации осуществляют путем облучения продукта ионизирующим излучением. Данный метод может быть использован при промышленной стерилизации однократного применения – полимерных шприцев, систем переливания крови, чашек Петри, пипеток и других хрупких и термолабильных изделий, а также для стерилизации лекарственного растительного сырья, лекарственных растительных препаратов, лекарственных средств растительного происхождения и др.

γ -излучение, источником которого может быть либо радиоизотопный элемент (например, кобальт-60), либо пучок электронов, подаваемый соответствующим ускорителем электронов.

Для этого метода стерилизации дозу поглощения устанавливают от 10 до 50 кГр. Допускается использование других доз, если предварительно доказано, что выбранный режим обеспечивает необходимый и воспроизводимый уровень летальности микроорганизмов. Используемые процедуры и меры предосторожности должны обеспечивать уровень обеспечения стерильности не более 10^{-6} .

Преимуществом радиационной стерилизации является ее низкая химическая активность и легко контролируемая доза излучения, которая может быть точно измерена. Радиационная стерилизация проходит при минимальной температуре, однако, могут быть ограничения при использовании некоторых типов стеклянной и пластиковой упаковки.

В процессе радиационной стерилизации следует постоянно осуществлять мониторинг поглощенного готовым продуктом излучения при помощи установленных дозиметрических методов независимо от величины дозы. Дозиметры калибруют по отношению к стандартному источнику на эталонной радиационной установке при получении от поставщика и затем с периодичностью, не превышающей одного года. Если предусмотрена биологическая оценка, ее проводят с использованием биологических индикаторов.

Плазменная стерилизация – это на сегодня единственный экономически эффективный метод стерилизации медицинских изделий из материалов, чувствительных к действию высокой температуры и влаги, а также инструментов и изделий, содержащих узкие, с трудом поддающиеся стерилизации каналы.

Стерилизация медицинских изделий производится за счет действия особого стерилизующего агента (плазмы перекиси водорода). Уничтожаются все формы микроорганизмов, включая их условно-патогенные виды, которые активно проявляют себя в госпитальной инфекции. Формирование плазмы и сам процесс стерилизации протекают при нормальном давлении и температуре порядка 50–60 °С. Такая технология отличается максимально щадящим воздействием на конструкционные материалы медицинских изделий, что дает уникальные возможности для многократной стерилизации прецизионных изделий, систем, содержащих высококачественную оптику, электронику, а также изделий со специальными покрытиями или красками.

Метод плазменной стерилизации основан на действии плазмы перекиси водорода (H_2O_2). Она состоит из ионов, электронов, нейтральных атомов и молекул и образуется под действием внешних источников энергии, таких как температура, радиационное излучение, электрическое поле и др. При этом методе после впрыскивания раствора перекиси водорода в стерилизационную камеру включается источник электромагнитного излучения, под воздействием которого одновременно происходит деление одной части молекул H_2O_2 на две группы (ОН-), а другой части – на одну гидропероксильную группу (ООН-) и один атом водорода, сопровождающееся выделением видимого и ультрафиолетового излучения. В результате создается биоцидная среда, состоящая из молекул перекиси водорода, свободных радикалов и ультрафиолетового излучения. При отключении электромагнитного поля свободные радикалы преобразуются в молекулы воды и кислорода, не оставляя никаких токсичных отходов.

Стерилизация *озоном* основана на его высокой окислительной способности. Озон уже много лет используется для обеззараживания питьевой воды и воздуха. Недавно его начали применять для стерилизации в медицине. Специальные генераторы производят озono-воздушную смесь из атмосферного воздуха.

Технология озонной стерилизации характеризуется: низкой температурой газа (комнатной) во время стерилизационного цикла, низким энергопотреблением, не требует расходных материалов (кроме медицинского кислорода), подлежащих утилизации, не требует промывки изделий или аэрации после стерилизационного цикла.

К преимуществам озонной стерилизации относятся: экологически чистая и безопасная технология стерилизации; простота обслуживания; отсутствие пуско-наладочных работ. Озон после окончания стерилизационного цикла конвертируется в кислород. Озоновый стерилизатор успешно эксплуатируется в отделениях и кабинетах стоматологии, лапароскопии, эндоскопии, микрохирургии, урологии, пластической хирургии, рефлексотерапии и т.д. для **стерилизации медицинских инструментов.**

Методы контроля эффективности стерилизации

В комплексе мероприятий по стерилизации важное значение имеет организация и проведение контроля за ее эффективностью.

Контроль эффективности работы стерилизационного оборудования осуществляется физическими, химическими и биологическим (бактериологическим) методами. Надежность этих методов неодинакова. Физические и химические методы предназначены для оперативного контроля и позволяют контролировать соблюдение параметров режимов паровой, газовой, воздушной стерилизации, температуру, давление, экспозицию. Недостаток этих методов заключается в том, что они не могут служить доказательством эффективной

стерилизации. Достоверным для определения эффективности является только бактериологический метод.

Физические методы контроля. Физические методы контроля осуществляются с помощью средств измерения температуры (термометры, термопары), давления (манометры, мановакуумметры) и времени (таймеры). Современные стерилизаторы оснащены также записывающими устройствами, фиксирующими отдельные параметры каждого цикла стерилизации.

Химические методы контроля. Использование химических веществ или их комбинаций, изменяющих под влиянием процесса стерилизации свое состояние или цвет, принято называть химическим контролем. Вещества, используемые для контроля стерилизации, называют химическими индикаторами. Химические индикаторы могут реагировать на воздействие одного, нескольких или всех критических параметров процесса стерилизации.

Классификация индикаторов

Индикаторы процесса стерилизации (класс 1) предназначены для использования с изделиями или отдельными упаковками (например, пакетами, коробками) с целью подтверждения того, что данные изделия или упаковки прошли стерилизационную обработку. Они позволяют отличить стерилизованные изделия (упаковки) от нестерилизованных.

Индикаторы для специальных испытаний (класс 2) предназначены для использования в специальных испытаниях стерилизационного оборудования, определяемых соответствующими стандартами. Наиболее распространенный индикатор этого класса – тест Бови–Дик (Bowie&Dick). Он предназначен для испытания эффективности вакуумной системы парового стерилизатора. Выполняемый ежедневно, этот тест должен первым сигнализировать о неисправности стерилизатора.

Однопараметрические индикаторы (класс 3) оценивают максимальную температуру, но не дают представления о времени ее воздействия. Индикатор представляет собой стеклянную трубку с химическим веществом, изменяющим свое агрегатное состояние или цвет при температуре, близкой к температуре стерилизации или полоска бумаги, на которую нанесена термоиндикаторная краска. Определение параметров, достигнутых в процессе стерилизации, основано на изменении цвета термоиндикаторной краски при достижении «температуры перехода», строго определенной для каждой краски.

Многопараметрические индикаторы (класс 4) должны реагировать на два или более критических параметра и указывать на достижение установленных значений выбранных параметров во время стерилизации. Они содержат красители, изменяющие свой цвет при сочетанном воздействии нескольких параметров стерилизации, чаще всего – температуры и времени. Индикаторная краска меняет свой цвет только в течении определенного времени воздействия контролируемого фактора. Поэтому чаще всего маркируются двумя

цифрами, например, 180–60 (180°, 60 мин). «Наружные» химические индикаторы 4 класса для контроля паровой стерилизации размещают на стерилизационных упаковках или в контрольных точках в камере стерилизатора. Обеспечивают контроль соблюдения критических параметров паровой стерилизации (температура, время, наличие насыщенного пара) в стерилизаторах с гравитационным способом удаления воздуха. «Внутренние» химические индикаторы 4 класса для контроля паровой стерилизации размещают внутри упаковок с изделиями и позволяют получить информацию о соблюдении параметров паровой стерилизации в непосредственной близости от изделий.

Интегрирующие индикаторы (класс 5) должны реагировать на все критические параметры метода стерилизации. Химические индикаторы 5 класса призваны обеспечить высочайший уровень контроля соблюдения параметров паровой стерилизации. Срабатывание химического индикатора 5 класса соответствует полной гибели тестовых микроорганизмов, что позволяет сразу после завершения цикла стерилизации судить о качестве стерилизации.

Имитирующие индикаторы (класс 6) реагируют на все критические параметры паровой стерилизации. Предназначены для точной проверки работы стерилизатора и соблюдения параметров стерилизации. Реагируют только в присутствии пара требуемой температуры при соответствующем времени выдержки. Цвет химического индикатора, приобретенный им после использования, при хранении может возвращаться к исходному. Такие индикаторы не подлежат архивированию.

Биологический метод контроля. Наряду с физическими и химическими применяется бактериологический метод контроля стерилизации. Он предназначен для контроля эффективности стерилизационного оборудования.

В настоящее время для проведения бактериологического контроля используются биотесты, имеющие дозированное количество спор тест-культуры. Контроль эффективности стерилизации с помощью биотестов рекомендуется проводить 1 раз в 2 недели. В зарубежной практике принято применять биологическое тестирование не реже 1 раза в неделю.

Биологический контроль проводится с помощью биологических индикаторов (биотестов). В основе биологического метода контроля процесса стерилизации лежит гибель определенного числа тестовых, устойчивых к воздействию стерилизующего агента микроорганизмов. Единственным недостатком этого метода является тот факт, что биотесты нельзя использовать в качестве средства оперативного контроля. Для получения результата необходимо биологический индикатор термостатировать в течение двух суток. При этом стерильный материал, в присутствии которого осуществлялся биологический контроль также необходимо сохранять и не передавать в работу до получения результата.

По информативности результата биологический контроль превосходит описанные выше методы контроля, так как он является средством прямого

контроля и дает однозначный ответ о гибели микроорганизмов при стерилизации. Ошибочное срабатывание биологического индикатора при эффективной стерилизации стремится к нулю, естественно при соблюдении главного требования при работе с биотестами – исключение из технологического процесса работы с ними возможности их повторной контаминации.

Биологические индикаторы отличаются от химических индикаторов контроля стерилизации. Химические индикаторы показывают, «имела ли место стерилизационная обработка», а биологические «определяют эффективность процесса стерилизации».

Биологический индикатор представляет собой пластиковый контейнер с крышечкой, содержащий хрупкую ампулу с восстанавливающей средой и бумажную полоску, зараженную спорами контрольных микроорганизмов. Индикатор размещается непосредственно в стерилизационной камере, либо закладывается в контейнеры и упаковки, предназначенные к стерилизации, в процессе их подготовки. Никаких предварительных манипуляций с индикатором производить не требуется – он полностью готов к применению. После окончания стерилизационного цикла индикатор должен быть извлечен и подвергнут инкубации для контроля инаktivации содержащихся в нем спор микроорганизмов. После извлечения из камеры стерилизатора надо раздавить находящуюся внутри ампулу и инкубировать при рекомендованной температуре в течение необходимого времени – обычно это 24 ч. Ошибка стерилизации проявляется изменением цвета и/или помутнением среды.

2.5. АНТИМИКРОБНАЯ ТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности клетки или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (бактериям, актиномицетам, грибам, простейшим, вирусам) или к злокачественным опухолям, избирательно задерживая их рост или полностью подавляя развитие.

Существует *три способа получения* антибиотиков:

1. Биологический синтез. Для получения антибиотиков этим способом используют высокопродуктивные штаммы микроорганизмов и специальные питательные среды. Микроорганизмы продуцируют антибиотик, который затем выделяют из питательной среды в чистом виде. Такие антибиотики называют природными.
2. Химический синтез. С помощью этого метода получают все синтетические антибиотики и химиотерапевтические препараты
3. Комбинированный способ. Представляет собой сочетание первого и второго способов: из полученного биологическим синтезом антибиотика выделяют так называемое ядро (например, 6-аминопеницилловую кислоту из пени-

циллина) и химическим путем добавляют к нему различные радикалы. Антибиотики, полученные комбинированным способом, называются полусинтетическими (метициллин, оксациллин).

Классификация антибиотиков

Антибиотики характеризуют и классифицируют по разным признакам и свойствам.

I. Классификация антибиотиков по биологическому происхождению

1. Антибиотики, вырабатываемые микроорганизмами, относящимися к порядку *Eubacteriales*.
 - А. Вырабатываемые представителями рода *Pseudomonas* (например, пиоцианин).
 - Б. Вырабатываемые представителями родов *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Proteus* (например, дипломицин, колифирмин).
 - В. Вырабатываемые бактериями рода *Bacillus* (например, грамицидин, полимиксины).
2. Антибиотики, вырабатываемые микроорганизмами, принадлежащими к порядку *Actinomycetales*.
 - А. Вырабатываемые представителями рода *Streptomyces* (например, стрептомицин, тетрациклины, эритромицин).
 - Б. Вырабатываемые представителями рода *Nocardia* (например, рифимицины, ристомицин).
 - В. Вырабатываемые представителями рода *Actinomadura* (например, карминомицин).
 - Г. Вырабатываемые родом *Micromonospora* (например, гентамицин).
3. Антибиотики, вырабатываемые цианобактериями (например, малинголид).
4. Антибиотики, вырабатываемые несовершенными грибами (например, пенициллин, гризеофульвин).
5. Антибиотики, вырабатываемые грибами, относящимися к классам базидиомицетов и аскомицетов (например, хетомидин).
6. Антибиотики, образуемые лишайниками, водорослями и низшими растениями (например, усниновая кислота, хлореллин).
7. Антибиотики, образуемые высшими растениями (например, аллицин, фазеолин).
8. Антибиотики животного происхождения: (например, лизоцим, интерферон).

II. Классификация антибиотиков по спектру биологического действия

1. Противобактериальные антибиотики узкого спектра действия, активные

преимущественно в отношении грамположительных микроорганизмов.

Группа пенициллина и цефалоспорины.

Биосинтетические пенициллины, полусинтетические пенициллины, полусинтетические цефалоспорины.

Ванкомицин, ристомидин. Линкомицин.

Новобиоцин. Макролиды.

2. Противобактериальные антибиотики широкого спектра действия.

Тетрациклины биосинтетические, полусинтетические тетрациклины (доксидин).

Хлорамфеникол (левомицетин).

Аминогликозиды (стрептомицин, канамицин, гентамицин). Полимиксины.

3. Противотуберкулезные антибиотики.

Стрептомицин, канамицин, виомицин, циклосерин.

4. Противогрибковые антибиотики.

Нистатин, Гризеофульвин, Амфотерицин В. Миконазол, клотримазол, оксиконазол.

5. Противоопухолевые антибиотики.

Адриамицин (доксорубин). Дауномицин, рубомицины.

III. Классификация антибиотиков по химическому составу

Классификация по химическим свойствам основана на базисном сходстве молекул.

1. β -Лактамы (пенициллины, цефалоспорины).
2. Аминогликозиды (стрептомицин, гентамицин).
3. Тетрациклины (тетрацилин, доксицилин).
4. Макролиды (эритромицин, олеандомицин).
5. Линкозамиды (линкомицин).
6. Гликопептиды (ванкомицин).
7. Оксазолидинолы (линезолид).
8. Рифампицины (рифампицин).
9. Полимиксины.
10. Сульфаниламиды.
11. Хинолоны, фторхинолоны.
12. Нитрофураны (фуразолидон).
13. Нитридазолы (метронидазол).
14. Производные хиноксалина (диоксидин).
15. Сульфаниламиды с триметапримом (ко-тримоксазол).
16. Полиены (нистатин, леварин, амфотерицин В).
17. Хлорамфеникол.

Механизмы действия антибиотиков

Антибиотики действуют на бактерии избирательно. Это значит, что те компоненты бактериальной клетки, которые являются мишенями для антибиотиков, имеют строение, отличное от компонентов эукариотической клетки (прежде всего, клетки человеческого организма). Поэтому антибиотики будут действовать на бактерии и не будут – на клетки организма человека. Антибиотики могут приводить к гибели бактерий (*бактерицидный эффект*) или к прекращению их роста и размножения (*бактериостатический эффект*).

Общим для всех антибиотиков является то, что они влияют на бактерии в фазе активного роста и размножения. Это связано с тем, что антибиотики (и другие химиотерапевтические агенты) вмешиваются в метаболизм бактериальных клеток и никогда не повреждают готовые структуры покоящихся бактерий (исключением являются антибиотики, обладающие *мембранотропным* эффектом – тиротрицин и полимиксины). Поэтому антибиотики, прежде всего, действуют на патогенные микроорганизмы и только при длительном применении – на микробиоту. Патогенетически значимая колонизация требует от возбудителей быстрого размножения и усиленной метаболической активности. Это повышает уязвимость бактерий для антибиотиков. Отсюда следует практически важный вывод: *антибиотики менее эффективны при хронических, чем при острых инфекциях и практически не эффективны при бессимптомном и малосимптомном носительстве патогенных бактерий*.

В зависимости от механизма действия различают:

1. Антибиотики, ингибирующие синтез клеточной стенки или антипептидогликановые антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин, D-циклосерин). Исключениями являются *микоплазмы* и *хламидии* (у микоплазм генетически отсутствует клеточная стенка, у хламидий в клеточной стенке отсутствует пептидогликановый слой), которые в принципе нечувствительны к антибиотикам, блокирующим синтез клеточной стенки.
2. Антибиотики, подавляющие синтез белка или антирибосомальные антибиотики (аминогликозиды – стрептомицин, неомицин, канамицин и др.; макролиды – эритромицин, олеандомицин; тетрациклины; линкозамины; хлорамфеникол и др.). По ряду признаков рибосомы прокариот отличаются от рибосом эукариотических клеток. В этом заключается селективность мишеней рибосомального цикла для антибиотиков. Аминогликозиды и тетрациклины связываются с 30S-субъединицей, нарушая образование *инициаторного рибосомального комплекса*. При этом тетрациклины обладают бактериостатическим действием, обратимо блокируя присоединение к рибосомам инициаторной аминоксилотранспортной РНК. Аминогликозиды же убивают бактерии, вызывая образование функционально непригодных 70S рибосом, а также извращают считывание информации с матричной РНК.
3. Антибиотики, нарушающие функции мембран (полимиксины, грамицидины, нистатин, леворин, амфотерицин В, трихомицин, кандицидины, аско-

зин, альбомуцин, тиротрицин, эндомицин и др.).

4. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез (обмен) нуклеиновых кислот:

а) РНК (актиномицин, гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин и др.);

б) ДНК (митомицины, новобиоцин, саркомицин и др.).

5. Антибиотики – ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, саркомицин и др.).

6. Антибиотики – ингибиторы дыхания (олигомицины, пиоцианин, усниновая кислота и др.).

7. Антибиотики – ингибиторы окислительного фосфорилирования (грамидины, колицины, тироцидин и др.).

8. Антибиотики, обладающие антиметаболическими свойствами (фураномицин – антиметаболит лейцина и др.).

Побочное действие антибиотиков

Антибиотики обладают побочным действием, оказывая неблагоприятное влияние как на макроорганизм, так и на микроорганизмы, могут изменять эффект других лекарственных средств.

Осложнения антибиотикотерапии со стороны макроорганизма:

1. Токсические реакции. Выраженность токсического действия антибиотика на организм зависит от свойств препарата, его дозы, способа введения, состояния больного. *Гепатотоксическим* действием обладают, например, тетрациклины, эритромицин, *нефротоксическим* – аминогликозиды. Тетрациклины, кроме того, нарушают формирование *костного скелета и эмали зубов*, поэтому их нельзя назначать беременным женщинам и детям до 12 лет. Хлорамфеникол и сульфаниламиды поражают *органы кроветворения*. При использовании некоторых цефалоспоринов возможны *кровотечения* в результате нарушения синтеза витамина К.

2. Дисбиозы. При использовании антибиотиков широкого спектра действия погибают не только возбудители заболевания, но и чувствительные к данным препаратам представители микробиоты. В то же время размножаются антибиотикорезистентные микроорганизмы, которые могут стать причиной вторичных эндогенных инфекций. Предупредить развитие дисбиоза невозможно, но вполне реально свести до минимума его последствия. Во-первых, по возможности надо использовать антибиотики узкого спектра действия; во-вторых, параллельно с антибактериальными антибиотиками назначать противогрибковые препараты; в-третьих, для коррекции состава микробиоты можно применять пробиотики и пребиотики.

3. Отрицательное воздействие на иммунитет. При введении антибиотиков возможны *аллергические реакции*. Их возникновение зависит от свойств самого препарата, от способа его введения (аллергические реакции развиваются

чаще при повторном введении антибиотика) и индивидуальной чувствительности больного к антибиотику. Многие антибиотики обладают *иммунодепрессивным действием*. Например, левомецетин угнетает антителиобразование, тетрациклины – фагоцитоз.

Изменения микроорганизмов, вызванные антибиотиками. Помимо того, что антибиотики оказывают неблагоприятное побочное действие на макроорганизм, они могут вызывать нежелательные для человека изменения самих микроорганизмов.

1. Появление атипичных форм микроорганизмов. У микробов могут изменяться морфологические, биохимические и другие свойства. Например, следствием антибиотикотерапии может быть образование L-форм бактерий.
2. Формирование антибиотикорезистентности.

Механизмы антибиотикорезистентности бактерий и пути их преодоления

В медицинском смысле *резистентными* следует считать бактерии, если они не обезвреживаются такими концентрациями антибиотика, которые возникают в организме при введении фармакологических (т.е. клинически реальных) дозировок.

Понять природу лекарственной устойчивости бактерий помогает представление об общих принципах реализации антимикробного эффекта. Они сводятся к следующему:

- 1) антибиотик должен связаться с бактериями и пройти через их оболочку;
- 2) антибиотик должен быть доставлен к месту действия;
- 3) антибиотик должен вступить во взаимодействие с внутриклеточными мишенями.

Формирование устойчивости возможно на каждом из этих этапов.

Различают *природную* или видовую устойчивость к антибиотикам, присущую бактериям от «рождения» и *приобретенную устойчивость*, формирующуюся у них в результате антибиотикотерапии. *Природная устойчивость* бактерии к антибиотику закодирована в хромосомных генах и является видовым признаком. Истинная природная устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени действия антибиотика или недоступности мишени вследствие первично низкой проницаемости или ферментативной инактивации. Например, пенициллин не действует на микоплазмы, обладающие к нему врожденной резистентностью, так как у них нет пептидогликана – мишени, на которую этот антибиотик воздействует.

Природная резистентность является постоянным видовым признаком и легко прогнозируется.

Приобретенная резистентность связана с приобретением генов резистентности (*r-генов*), переносимых транспозонами и R-плазмидами. Возник-

новение приобретенной резистентности к антибиотикам связано либо с изменениями, происходящими в результате спонтанных мутаций в бактериальной хромосоме, либо с приобретением бактериальной клеткой R-плазмид. Резистентность передается другим клеткам в результате размножения или генетического обмена, что приводит к распространению антибиотикорезистентности. Антибиотик в данном случае играет роль *селективного фактора*: через 1–3 года после применения нового антибиотика появляются устойчивые к нему штаммы бактерий, а через 10–20 лет формируется полная резистентность к препарату. В результате мутации бактерия приобретает устойчивость к одному антибиотику, а с R-плазмидой – *фактором множественной лекарственной устойчивости* связана резистентность к 5–6 препаратам. Кроме того, бактериальная клетка может иметь несколько R-плазмид, что обуславливает возникновение *полирезистентных штаммов*.

Одним из резервуаров r-генов служит микробиота, изобилующая многочисленными видами бактерий. Здесь складываются благоприятные условия для обмена транспазонами и плазмидами тем более, что эндогенные бактерии часто попадают под косвенную атаку антибактериальных агентов и вынуждены выживать в их присутствии, напрягая генетические резервы адаптации. Выделяют следующие *механизмы резистентности*:

1. Нарушение проницаемости клеточной стенки для антибиотика и подавление его транспорта к внутриклеточным мишеням. Причиной является полная или частичная утрата *пориновых белков*. Хорошо изучена *система MAR (multiple antibiotic resistance* – множественная устойчивость к антибиотикам). Активация MAR системы приводит к одновременному снижению количества одного из пориновых белков (*OmpF*) и повышению активности одной из систем выведения.
2. Модификация мишеней, т.е. изменение структуры, на которую действует антибиотик. Например, мишенями действия β -лактамов являются ферменты транспептидазы (ПСБ – пенициллин связывающие белки), участвующие в синтезе клеточной стенки бактерий. В результате модификации у некоторых ПСБ уменьшается сродство к β -лактамам, что проявляется в повышении МПК этих препаратов и снижении клинической эффективности. Реальное клиническое значение имеет антибиотикорезистентность стафилококков и пневмококков. Устойчивость стафилококков обусловлена появлением у микроорганизмов дополнительного ПСБ. Ведущим механизмом устойчивости к хинолонам/фторхинолонам является модификация мишеней – двух бактериальных ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, опосредующих изменения в молекуле бактериальной ДНК, необходимые для ее нормальной репликации.
3. Инактивация антибиотика, т.е. синтез бактериальной клеткой ферментов, разрушающих антибиотик (β -лактамаз, разрушающих в результате гидролиза одну из связей β -лактамного кольца у пенициллинов и цефалоспоринов: около 95% стафилококков стали вырабатывать одну из β -лактамаз, пенициллиназу и

поэтому приобрели устойчивость к пенициллину). В результате действия пенициллиназы образуется пеницилловая кислота, не обладающая антибиотическим действием. Наибольшее значение имеют β -лактамазы расширенного действия, разрушающие цефалоспорины I–IV поколения, но чувствительны к ингибиторам. Основным механизмом устойчивости к аминогликозидам является их *ферментативная инактивация* путем модификации. Модифицированные молекулы аминогликозидов теряют способность связываться с рибосомами и подавлять биосинтез белка.

4. Активное выведение антибиотика из бактериальной клетки (эффлюкс). Так, синегнойная палочка имеет систему активного выведения карбопиемов из клетки. Активное выведение макролидов и линкозамидов осуществляют несколько транспортных систем.

5. Формирование метаболического шунта, т.е. снижение физиологической значимости мишени за счет дублирования способов образования жизненно важных метаболитов. Резистентность к триметоприму может являться результатом приобретения генов дигидрофолатредуктазы, нечувствительной к ингибции, а устойчивость к сульфаниламидам – генов дигидроптероатсинтетазы.

6. Конкурентное связывание или перехват антимикробного агента.

Принципы рациональной антибиотикотерапии

I. Микробиологический принцип. Антибиотики необходимо применять строго по показаниям. Для того чтобы подобрать необходимые препараты, нужно до назначения лечения взять у больного материал для исследования, выделить чистую культуру возбудителя и определить его чувствительность к антибиотикам – антибиотикограмму.

II. Фармакологический принцип. Основан на правильной дозировке препарата, соблюдении необходимых интервалов между введением лекарства, продолжительности антибиотикотерапии, методах введения, знания фармакокинетики препарата, возможности сочетания различных лекарственных препаратов.

III. Клинический принцип. При назначении антибиотиков учитывают общее состояние больного, возраст, пол, наличие беременности, иммунный статус, сопутствующие заболевания.

IV. Эпидемиологический принцип. При подборе антибиотика необходимо знать, к каким антибиотикам устойчивы микроорганизмы в среде, окружающей больного (в отделении, больнице, географическом регионе), насколько часто встречаются антибиотикорезистентные штаммы. Распространенность устойчивости к данному антибиотику не остается постоянной, а изменяется в зависимости от того, насколько широко используется антибиотик.

V. Фармацевтический принцип. Необходимо учитывать срок годности и правила хранения препарата, так как при длительном и неправильном хранении антибиотик теряет свою активность и в результате его деградации могут образовываться токсические продукты.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Метод серийных разведений

Метод основан на прямом определении величины *минимальной подавляющей концентрации* (МПК), определяемой как минимальная концентрация антибиотика, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма. В зависимости от характера используемой питательной среды различают методы серийных разведений в агаре или бульоне. В зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют методы серийных макро- и микроразведений.

Разновидностью метода серийных разведений является также метод, основанный на использовании только двух концентраций антибиотиков, соответствующих пороговым (то есть концентрациям, отделяющим чувствительные микроорганизмы от промежуточных и промежуточные от резистентных).

Для проведения метода готовят последовательные разведения тестируемого антибиотика в стерильном прозрачном питательном бульоне, в каждую пробирку вносят определенное количество клеток тест-микроба (рис. 71). Пробирки помещают в термостат на 20–24 ч при температуре, оптимальной для тест-микроба. После этого в пробирках определяют наличие или отсутствие роста тест-культуры. Наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. Наименьшую концентрацию антибиотика, с которой визуально не определяется бактериальный рост, считают минимальной подавляющей концентрацией. Измеряется МПК в мг/л или мкг/мл.

Диско-диффузионный метод (метод дисков)

Для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам диско-диффузионным методом на поверхность агара в чашке Петри наносят суспензию исследуемого микроорганизма, затем помещают диски, пропитанные определенным количеством антибиотика. Диффузия антибиотика в агар приводит к формированию зоны подавления роста микроорганизмов вокруг дисков. После инкубации чашек в термостате при температуре 35–37 °С в течение 20–24 ч учитывают результат путем измерения диаметра зоны задержки роста микроорганизма вокруг диска в миллиметрах (рис. 72).

В зависимости от диаметра зоны задержки роста определяется чувствительность микроорганизма к антибиотику:

- до 10 мм – устойчивый
- 11–15 мм – мало чувствительный
- 16–25 мм – чувствительный
- более 25 мм – высокочувствительный



Рис. 71. Схема постановки метода серийных разведений для определения МПК антибиотика.

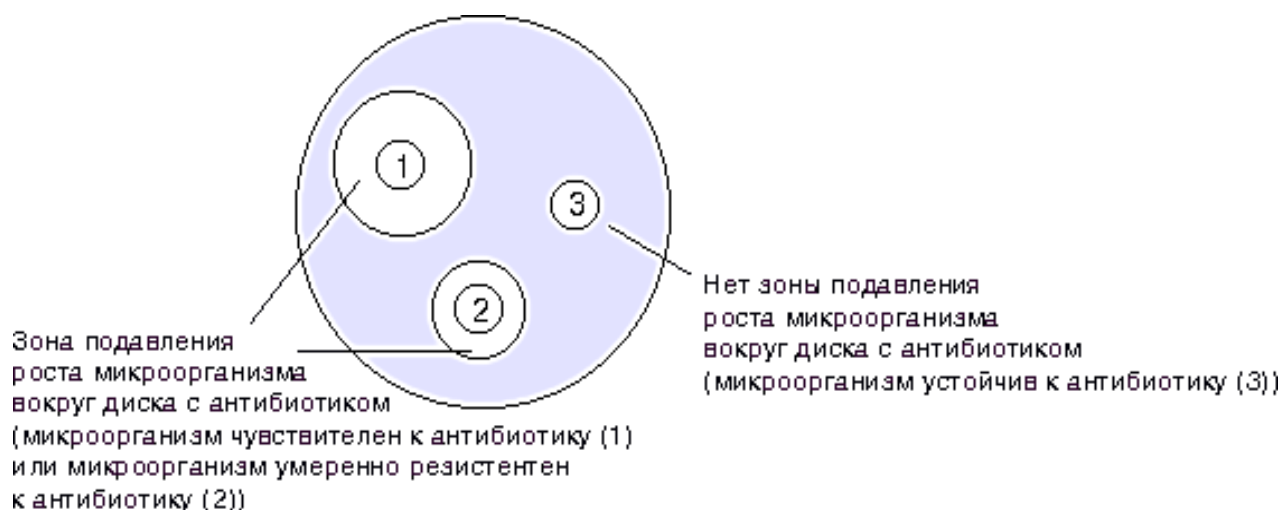


Рис. 72. Схема диско-диффузионного метода определения чувствительности микроорганизма к антибиоту

Е-тест

Определение чувствительности микроорганизма с помощью Е-теста проводится аналогично тестированию диско-диффузионным методом. Отличие состоит в том, что вместо диска с антибиотиком используют полоску Е-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (рис. 73). В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

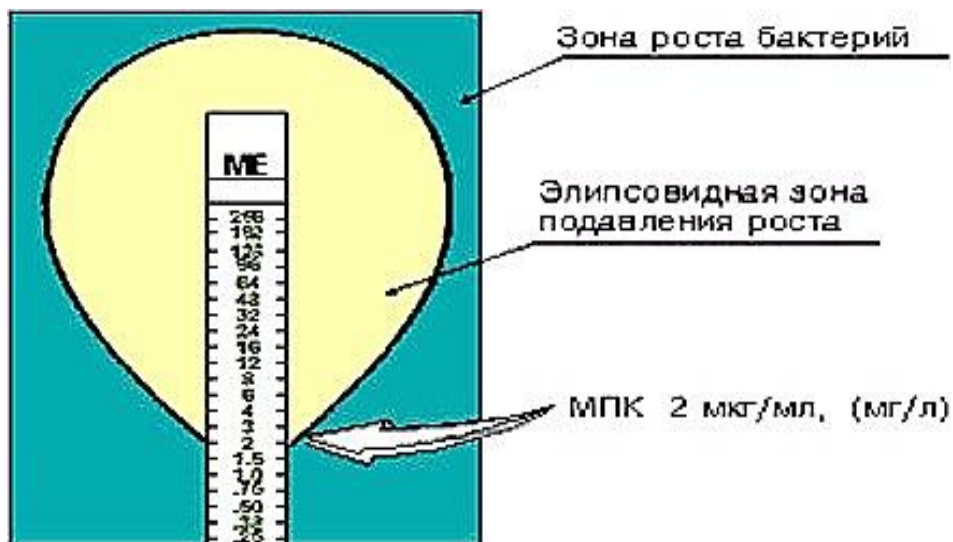


Рис. 73. Схема Е-теста

2.6. САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Санитарная микробиология – раздел общей микробиологии, изучающий микрофлору окружающей среды и её влияние на здоровье человека и состояние среды его обитания. Изучение микрофлоры и микробиологических процессов в среде обитания человека необходимо для гигиенической оценки его взаимоотношений с окружающей средой. Санитарная микробиология разрабатывает методы контроля за состоянием воды, почвы, воздуха, пищевых продуктов и различных предметов обихода. Санитарно-микробиологические методы направлены на определение общей микробной обсеменённости (общее микробное число), определение и титрование санитарно-показательных микроорганизмов, выявление в исследуемых объектах патогенных микроорганизмов и их метаболитов, определение степени недоброкачества изучаемых объектов или продуктов, вызванной деятельностью микробов.

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

Методы прямого обнаружения – наиболее точные и надёжные критерии оценки эпидемиологической опасности внешней среды. Наиболее часто проводят посев исследуемого материала на питательные среды. Недостатками этих методов является низкое содержание патогенов в исследуемом материале, при этом их неравномерное распределение во внешней среде.

Методы косвенной идентификации предусматривают применение двух

критериев, по которым можно косвенно судить о возможном присутствии возбудителя во внешней среде: *общее микробное число (ОМЧ)* и содержание *санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ)*.

ОМЧ определяют путём подсчёта всех микроорганизмов (растущих на питательных средах) в 1 г или 1 мл или 1 м³ субстрата.

Санитарно-показательными называют *микроорганизмы (СПМ)*, по которым можно косвенно судить о возможном присутствии патогенов во внешней среде. То есть при их определении исходят из предположения, что чем больше объект загрязнён выделениями человека и животных, тем больше будет СПМ и тем вероятнее присутствие патогенов. Основные требования, предъявляемые к СПМ, следующие:

- 1) микроорганизмы должны постоянно обитать в естественных полостях организма человека и животных и выделяться в окружающую среду;
- 2) продолжительность выживания их в окружающей среде должна быть такой же или большей, чем патогенных микроорганизмов, выводимых из организма теми же путями;
- 3) они не должны размножаться в окружающей среде;
- 4) они не должны значительно изменять свои биологические свойства при попадании в окружающую среду;
- 5) у них не должно быть во внешней среде «двойников» или аналогов, с которыми их можно перепутать;
- 6) индикация, идентификация и количественный учёт СПМ должны производиться современными, простыми, легко доступными и экономичными микробиологическими методами.

Все *СПМ* являются индикаторами биологического загрязнения. Выделяют несколько групп СПМ, обнаружение которых в объектах окружающей среды говорит о различных видах загрязнения.

1. Группа А включает обитателей кишечника человека и животных. Они являются индикаторами фекального загрязнения. В нее входят бактерии группы кишечной палочки (БГКП) – эшерихии, цитробактер, энтеробактер, клебсиеллы. Кроме того, в эту группу входят энтерококки, протеи, сальмонеллы, клостридии, термофилы, бактериоиды, бактериофаги и др.
2. Группа В включает обитателей верхних дыхательных путей и носоглотки. Они являются индикаторами аспирационного загрязнения. В нее входят, стафилококки (*S. aureus*), а также зеленыящие и гемолитические стрептококки, постоянно обитающие на слизистой оболочке верхних дыхательных путей и выделяющиеся в воздушную среду при разговоре, кашле, чиханье.

Содержание СПМ выражают в титрах и индексах. *Титр СПМ* – наименьший объем исследуемого материала (в мл или м³) или весовое количество (в г), в котором обнаружена хотя бы одна особь СПМ. *Индекс СПМ* – количе-

ство СПМ, обнаруженное в определённом объёме или количестве исследуемого объекта.

Микрофлора почвы

Почва является основной средой обитания многих микробов. Отсюда они поступают в воду и обсеменяют воздух. Микрофлора почвы включает все известные группы микроорганизмов: споровые и неспорообразующие бактерии, актиномицеты, грибы, спирохеты, простейшие, сине-зеленые водоросли, микоплазмы и вирусы. В 1 г почвы насчитывается до 6 млрд микробных тел. В верхних слоях обитают актиномицеты и аэробы. В нижних – грибы и анаэробы. Количественный состав микроорганизмов почвы неравномерен. Самый поверхностный слой толщиной 1–2 мм содержит мало микроорганизмов, так как они быстро погибают под действием солнечных лучей и высыхания. Следующий слой, глубиной 10–20 см, наиболее обсеменен разнообразными микроорганизмами. По мере увеличения глубины количество микробов постепенно уменьшается, но их обнаруживают даже на значительной глубине. Независимо от глубины наиболее густо заселена околокорневая зона растений, качественный состав которой зависит от вида растений. Количество микроорганизмов околокорневой зоны в тысячи раз превышает микробное число не занятой растениями почвы.

На качественный и количественный состав микрофлоры почвы влияет тип почвы, её плодородие, влажность, аэрация и физико-химические свойства. На микробиоценоз почвы существенно влияет деятельность человека: обработка почвы, внесение удобрений, мелиорация, загрязнение отходами производств. Патогенные микроорганизмы могут попасть в почву с выделениями человека и животных. Особо опасным в санитарном отношении является загрязнение почвы необезвреженными отходами животноводства (навоз, моча, трупы животных).

Патогенные для человека микроорганизмы почвы можно разделить на три группы. К первой группе относятся патогенные микробы, для которых почва является постоянным местом обитания. Это актиномицеты, грибы. Вторая группа представлена споровыми микроорганизмами. К ним относятся возбудители сибирской язвы, столбняка, ботулизма и газовой гангрены. Третья группа – патогенные микробы и вирусы, которые, попадая в почву с выделениями человека и животных, сохраняются там от нескольких часов до нескольких месяцев (кишечная палочка, сальмонеллы, шигеллы).

Санитарно-микробиологическое исследование почвы

При исследовании почвы может проводиться полный или краткий анализ.

Полный санитарно-бактериологический анализ почвы проводится:

- а) для подробной и глубокой характеристики санитарного состояния почвы;
- б) для определения пригодности почвы при размещении жилья, мест отдыха,

детских учреждений и водопроводных сооружений;
в) для эпидемиологических исследований.

Краткий анализ рекомендуется при осуществлении текущего санитарного надзора и включает определение общего количества бактерий (ОМЧ), БГКП (коли-титр и коли-индекс), клостридий (перфрингенс-титр), термофильных и нитрифицирующих бактерий.

Подготовка почвы. Почву освобождают от включений – камней, осколков стекла и др. Крупные агрегаты почвы дробят. Масса навесок для исследования зависит от цели исследования. Навеску почвы заливают дистиллированной (очищенной) водой в соотношении 1:10. Полученную суспензию встряхивают 10 мин и отстаивают 2–5 мин. Из первого разведения 1:10 готовят ряд последующих 10-кратных разведений от 1:10 до 1:1000 при исследовании чистых почв и до 1:10 000 при исследовании сильно загрязненных почв.

Определение общего количества бактерий (ОМЧ почвы). Микробное число почвы – общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы. Посев почвенной суспензии производят на МПА в чашки Петри по 1 мл из каждого разведения. Затем в чашки выливают по 7–10 мл расплавленного и остуженного до 45 °С агара. Посевы инкубируют при 28–30 °С в течение 72 ч и подсчитывают количество выросших колоний. Если на чашке Петри вырастает более 150 колоний, то подсчет ведется на $\frac{1}{4}$ площади с последующим перерасчетом на всю площадь. Из суммы колоний, подсчитанных на всех чашках Петри, выводится среднее арифметическое и затем определяют количество микроорганизмов в 1 г почвы с учетом разведений.

Определение бактерий группы кишечной палочки. *Коли-индекс* – количество жизнеспособных *E. coli* в 1 г почвы. Если предполагается невысокая степень фекального загрязнения, БГКП в почве определяют титрационным (бродильным) методом или методом мембранных фильтров; при высокой степени – прямым посевом почвенной суспензии в разведении 1:10 на среду Эндо.

Метод мембранных фильтров. Почвенную суспензию центрифугируют, затем 5–10 мл фильтруют через мембранные фильтры. После фильтр осторожно стерильным пинцетом переносят на среду Эндо в чашку Петри. Фильтр накладывают вверх поверхностью, на которой осели бактерии. Чашки Петри инкубируют при 37 °С 24 ч. При наличии в почве БГКП на фильтрах появляются колонии типичные для кишечных палочек – темно-красные с металлическим блеском или розовые с красным центром. Из таких колоний делают мазки, окрашивают по Граму. Для отличия бактерий семейства *Enterobacteriaceae* от *Pseudomonadaceae* ставят оксидазный тест. Колонии учитывают, как БГКП, если они образованы грамотрицательными палочками, ферментирующими глюкозу до кислоты и газа и не обладающие протеолитической активностью. Колонии подсчитывают на тех фильтрах, на которых из соответствующего разведения почвенной суспензии выросло не более 30–50 колоний. Пересчитывают количество выросших колоний на фильтрах на 1 г

почвы и определяют коли-индекс.

Коли-титр почвы – наименьшее количество почвы, в котором обнаруживается жизнеспособная *E. coli*. *Титрационный метод*. Из приготовленных разведений почвенной суспензии делают посевы в питательную среду Кесслера (пептона, желчи, лактозы, генциановый фиолетовый). Из разведений 1:10 10 мл засевают во флакон с 50 мл среды, что соответствует 1 г почвы. Посев меньших количеств (0,1 и 0,01) делают по 1 мл из соответствующих разведений почвенной суспензии в пробирки с 9 мл среды. Если в посевах обнаруживается рост или рост и газообразование, делают высеv в чашки Петри со средой, инкубируют 24 ч при 37 °С и проводят дальнейшую идентификацию выделенных бактерий. Результат выражают в коли-титре. Отсутствие во всех пробирках роста и газообразования указывает на отсутствие БГКП.

Определение перфрингенс-титра. Перфрингенс-титр почвы – наименьшее весовое количество почвы, выраженное в граммах, в котором обнаруживается жизнеспособная клетка *C. perfringens*. Определение перфрингенс-титра является важным критерием для санитарной оценки почвы и ее самоочищения, так как в почве, загрязненной фекалиями, уже через 4–5 мес. эшерихии исчезают, а *C. perfringens* обнаруживаются в титре 0,01. Перфрингенс-титр дает возможность судить о давности фекального загрязнения. Из приготовленных разведений почвенной суспензии по 1 мл переносят в два параллельных ряда пробирок. Один ряд прогревают при 80 °С 15 мин. Затем во все пробирки наливают по 9–10 мл расплавленной и охлажденной до 45 °С среды Вильсона–Блера. Инкубацию посевов проводят при 43 °С 24 ч, но уже через 2–3 ч при положительном результате можно наблюдать в толще агара образование круглых колоний черного цвета. В мазках, приготовленных из колоний видны характерные грамположительные палочки.

Определение термофильных бактерий. Учет термофильных бактерий производят на МПА, разлитом в чашки Петри более толстым слоем, чем обычно. Посев делают из разведений 1:10, 1:100, 1:1000, причем из каждого разведения рекомендуется засеивать по 2–3 параллельные чашки. Термофильные бактерии выращивают при температуре около 60 °С. Результат учитывают через 24 ч после посева. Подсчет количества бактерий проводят на 1 г почвы.

Санитарно-микробиологическую оценку почвы производят по комплексу показателей. Для санитарной оценки почвы необходимо пользоваться показателями таблицы 4.

Таблица 4

Схема санитарного состояния почвы по микробиологическим показателям

Категория почв	Титры		Число термофильных бактерий в 1 г
	коли-титр	перфрингенс-титр	
Чистая	1 и выше	0,01 и выше	100–1 000
Загрязненная	0,9–0,01	0,009–0,0001	1 000–100 000
Сильно загрязненная	0,09 и ниже	0,00009 и ниже	100 000–4 000 000

Микрофлора воды

Вода – естественная среда обитания микроорганизмов. В воде формируются определенные биоценозы с преобладанием микроорганизмов, адаптировавшихся к условиям местонахождения. Количественный и качественный состав микрофлоры воды зависит от состава и концентрации минеральных и органических веществ, температуры, pH, скорости движения воды, массивности поступления ливневых, фекально-бытовых и промышленных сточных вод. Количество микробов прямо пропорционально степени загрязненности водоемов. Особенно богаты микроорганизмами пруды, ручьи, озера густо населенных районов. В закрытых водоемах (озера, пруды) наблюдается определенная закономерность в распределении бактерий. Состав микроорганизмов различен на поверхности воды и на дне водоемов. Наиболее обильно заселена микроорганизмами вода на глубине 10–100 см. В более глубоких слоях их количество значительно снижается. Ключевые воды и воды артезианских колодцев наиболее чисты. Микрофлора воды активно участвует в процессе самоочищения от органических отходов. Вода – фактор передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний. Вместе с загрязненными ливневыми, талыми и сточными водами в озера и реки попадают представители нормальной микрофлоры человека и животных (кишечная палочка, цит-робактер, энтеробактер, энтерококки, клостридии) и возбудители кишечных инфекций (брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, лептоспироза, энтеровирусных инфекций, криптоспориоза и др.). Эти бактерии не приспособлены к существованию в воде и через некоторое время погибают, но определенное время они сохраняются в воде, а некоторые возбудители могут даже размножаться в воде (холерный вибрион, легионеллы). Таким образом, вода может быть фактором передачи инфекционных заболеваний и в связи с этим необходимо проводить санитарно-микробиологический контроль состояния воды.

Санитарно-микробиологическое исследование воды

Исследованию подлежит вода централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов, бассейнов, сточные воды. Для оценки санитарно-бактериологического состояния воды (табл. 5) используют следующие показатели:

- 1) определение общего микробного числа (ОМЧ);
- 2) определение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и термотолерантных колиформных бактерий;
- 3) определение спор сульфитредуцирующих клостридий;
- 4) определение колифагов;
- 5) определение патогенных бактерий кишечной группы.

Таблица 5

Нормативы качества водопроводной воды

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
1. Общее микробное число	КОЕ* в 1 мл воды	Не более 50
2. Бактерии семейства Enterobacteriaceae	Число кишечных бактерий в 100 мл воды	Отсутствие
3. Термотолерантные колиформные бактерии	Число кишечных бактерий в 100 мл воды	Отсутствие
4. Споры сульфитредуцирующих клостридий	Число спор в 20 мл воды	Отсутствие
5. Колифаги	Число БОЕ** в 100 мл воды	Отсутствие

Примечание. *КОЕ – колониеобразующая единица; **БОЕ – бляшкообразующая единица

Исследование питьевой воды на наличие колифагов, патогенных бактерий кишечной группы проводится по эпидемиологическим показателям. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий проводится при оценке эффективности технологий обработки воды.

Определение общего микробного числа (ОМЧ) производят посев проб воды на питательные среды с последующим подсчетом выросших колоний. Объем воды для посева выбирают с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. Водопроводную воду засевают в объеме 1 мл, воду открытых водоемов – в объемах 1; 0,1 и 0,01 мл (готовят 10-кратные разведения). Посев каждого разведения проводят глубинным способом. Для этого стерильной пипеткой отбирают по 1 мл воды и вносят в 2 стерильные чашки, в которые выливают по 6–8 мл расплавленного и остуженного до 45 °С МПА. Содержимое чашки смешивают, оставляют до застывания агара и помещают в термостат на 24 ч. Подсчитывают количество колоний на чашках, вычисляют среднее арифметическое. Результат выражают числом КОЕ (колониеобразующих единиц) в 1 мл воды.

Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae и термотолерантных колиформных бактерий. Термотолерантные колиформные бактерии обладают всеми признаками бактерий семейства Enterobacteriaceae, но они способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44 °С в течение 24 ч.

Для выявления бактерий семейства Enterobacteriaceae и термотолерантных колиформных бактерий чаще всего используют *метод мембранных фильтров*. Он основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на дифференциально-диагностической среде и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим признакам. Фильтрацию производят с помощью специальных приборов. Объем пробы воды зависит от целей исследования. При анализе водопроводной воды, объем в 300 мл пропускают через 3 мембранных фильтра по

100 мл. Фильтры переносят на среду Эндо в чашке Петри и инкубируют при 37 °С 24 ч. Подсчитывают число красных и красных с металлическим блеском колоний. Идентификацию бактерий проводят по ок- сидазному тесту и тесту образования кислоты и газа при ферментации лактозы для чего исследуют не менее 10 колоний.

Все лактозоположительные колонии засевают в две пробирки с одной из лактозосодержащих сред и 1 пробирку инкубируют при 37 °С (для культивирования микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae), а другую при 44 °С (для культивирования термотолерантных колиформных бактерий).

Учитывают бактерии семейства Enterobacteriaceae – показатели давнего фекального загрязнения воды и термотолерантные колиформные бактерии – показатели свежего фекального загрязнения.

Результаты анализа выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий семейства Enterobacteriaceae и термотолерантных колиформных бактерий в 100 мл воды.

Определение спор сульфитредуцирующих бактерий. Сульфитредуцирующие клостридии, преимущественно *C. perfringens* – спорообразующие анаэробные палочки, редуцирующие сульфит натрия на железосульфитном агаре при 44 °С в течение 24 ч. Для определения сульфитредуцирующих клостридий испытуемую воду вносят в расплавленную и остуженную среду Вильсона–Блера. Среда содержит тиосульфат (гипосульфит) и бесцветную соль железа. В результате прорастания спор, размножения клостридий и восстановления ими сульфита образуется сульфид железа, который придает среде черный цвет.

Определение колифагов. **Колифаги** – вирусы, лизирующие кишечную палочку и образующие зоны лизиса (бляшки) на бактериальном газоне. Присутствие колифагов определяют методом агаровых слоев по Грациа. Исследуемую воду вносят в 5 стерильных чашек по 20 мл. В 6-ю – контрольную воду не берут. Затем во все чашки заливают расплавленный и остуженный до 45 °С агар с добавлением суточной культуры *E. coli*. Перемешивают, оставляют для застывания и инкубируют при 37 °С 24 ч. Учитывают результат подсчетом бляшек в чашках Петри в БОЕ (бляшкообразующих единицах) на 100 мл воды. В контрольной чашке бляшки должны отсутствовать.

Определение бактерий родов сальмонелла и шигелла. Для выявления патогенных энтеробактерий исследуемый объем воды (не менее 2–3 мл) засевают в среды обогащения (Мюллера-Кауфмана, магниевая среда) с последующим высевом на плотные селективные и дифференциально- диагностические среды – Плоскирева, Эндо, Левина, висмут-сульфитный агар. Выделенные культуры идентифицируют по морфологическим, тинкториальным, биохимическим и серологическим свойствам.

Микрофлора воздуха

Воздух – среда, не поддерживающая размножение микроорганизмов; это определяется отсутствием питательных веществ и недостатком влаги. Кроме того, в воздухе более выражено микробицидное действие солнечных лучей УФ-спектра. Загрязнение воздуха микробами происходит из почвы, воды, от животных, людей и растений. Состав микрофлоры воздуха разнообразен и значительно изменяется в зависимости от условий. Воздух верхних слоев атмосферы, а также горный и морской воздух содержит очень мало микроорганизмов. В населенных местах их значительно больше, особенно в летнее время. Особенно сильно микроорганизмами насыщен атмосферный воздух над крупными городами. Это связано с тем, что микроорганизмы в воздухе находятся в состоянии аэрозоля. Выделяют три основные фазы бактериального аэрозоля.

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

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

Фаза «бактериальной пыли». Из первых двух фаз бактерии могут переходить в состав более крупных частиц, оседающих в виде пыли на различных предметах, образуя так называемую «бактериальную пыль». Её важное свойство – способность легко диспергироваться под воздействием даже малых токов воздуха. Размер частиц варьирует от 0,01 до 1 мм. В зависимости от размера частиц и скорости воздушных течений, скорость их перемещения находится в пределах 0,5–30 см/с. Вследствие длительного пребывания во взвешенном состоянии и способности частиц проникать в дистальные отделы лёгких, мелкодисперсная бактериальная пыль также представляет эпидемиологическую опасность. Эта фаза бактериального аэрозоля преобладает в воздухе жилых помещений и с ней рассеиваются патогенные микроорганизмы, устойчивые к высушиванию (микобактерии, клостридии, стафилококки, стрептококки, грибы).

Микрофлора атмосферного воздуха и микрофлора воздуха жилых помещений различается.

Микрофлора атмосферного воздуха. Среди микроорганизмов атмосферного воздуха доминируют виды, обитающие в почве. Стафилококки и стрептококки обнаруживают лишь в 3,7% проб, взятых в местах большого скопления людей. В атмосферном воздухе в основном встречаются следующие группы микроорганизмов:

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

В атмосферном воздухе постоянно происходят процессы самоочищения за счет осадков, инсоляции, температурных воздействий и других факторов. В свою очередь атмосферный воздух сам по себе – фактор очищения воздуха жилых помещений.

Микрофлора воздуха закрытых помещений более однообразна и относительно стабильна. Среди микроорганизмов доминируют обитатели носоглотки человека, в том числе патогенные виды, попадающие в воздух при кашле, чихании или разговоре. К ним можно отнести стафилококки, стрептококки, дифтероиды, пневмококки, менингококки, различные вирусы и др. Основным источником загрязнения воздуха патогенными видами – бактерионосители. Уровень микробного загрязнения зависит главным образом от плотности заселения, активности движения людей, санитарного состояния помещения, в том числе пылевой загрязнённости, вентиляции, частоты проветривания, способа уборки, степени освещённости и других условий. Так, регулярные проветривания и влажная уборка помещений снижает обсеменённость воздуха в 30 раз (по сравнению с контрольными помещениями). Самоочищения воздуха закрытых помещений не происходит.

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

Воздух может служить фактором передачи респираторных вирусных заболеваний (ОРВИ), гриппа, туберкулеза, дифтерии, менингококковой инфекции, туберкулеза, ветряной оспы и др.

Задачами санитарно-микробиологического исследования воздуха являются: гигиеническая и эпидемиологическая оценка воздушной среды, и, как следствие, разработка комплекса мероприятий, направленных на профилактику аэрогенной передачи возбудителей инфекционных болезней. Объектами санитарно-микробиологического исследования воздуха закрытых помещений являются: воздух больниц (операционные, отделение реанимации, родильные

залы роддомов, и т.п.), детских садов, школ, поликлиник, аптек, производственных цехов и вспомогательных помещений на предприятиях различного профиля (пищевых, микробного синтеза и т.п.), а также мест массового скопления людей (кинотеатров, спортивных залов и т.д.).

При санитарно-бактериологическом исследовании воздуха проводят:

- 1) определение общей бактериальной обсемененности воздуха (общее число микроорганизмов в 1 м³);
- 2) выявление санитарно-показательных микроорганизмов;
- 3) по эпидемическим показаниям выделение вирусов и патогенных бактерий из воздуха закрытых помещений;
- 4) при исследовании атмосферного воздуха дополнительное определение качественного состава микрофлоры с учетом наличия спорообразующих аэробов и анаэробов, которые служат показателем загрязненности воздуха микроорганизмами почвы.

При оценке санитарного состояния закрытых помещений (табл. 6) в зависимости от задач исследования определяется *общее микробное число*, присутствие *санитарно-показательных микроорганизмов* (стафилококков, α- и β-гемолитических стрептококков), а также непосредственно *патогенных микроорганизмов* (в зависимости от характера помещений – микобактерий туберкулеза, коринебактерий дифтерии, дрожжей и плесневых грибов и пр.).

Таблица 6

Нормативные показатели воздуха жилых помещений

Степень загрязненности	Зима	Лето
Чистый воздух	ОМЧ не более 4500, гемолитических стрептококков – до 35	ОМЧ не более 1500, гемолитических стрептококков – до 16
Грязный воздух	ОМЧ не более 7000, гемолитических стрептококков – до 124	ОМЧ не более 2500, гемолитических стрептококков – до 36

Например, при исследовании воздуха медицинских учреждений определяется присутствие микроорганизмов, относящихся к условно-патогенной флоре (синегнойная палочка, бактерии рода *Proteus* и ряд других грамотрицательных палочек), вызывающих внутрибольничные инфекции. Как показатель запылённости и отсутствия влажной уборки расценивают присутствие спорообразующих палочек, а показателем повышенной влажности – плесневых грибов.

Методы отбора проб воздуха можно разделить на *седиментационные* и *аспирационные*

Седиментационный метод – наиболее старый метод, широко распространен благодаря простоте и доступности, однако является неточным. Его используют только при исследовании воздуха закрытых помещений. Метод

предложен Р. Кохом и заключается в способности микроорганизмов под действием силы тяжести и под влиянием движения воздуха (вместе с частицами пыли и капельками аэрозоля) оседать на поверхность питательной среды в открытые чашки Петри.

Чашки устанавливаются в точках отбора на горизонтальной поверхности. При определении общей микробной обсемененности чашки с мясопептонным агаром оставляют открытыми на 5–10 мин или дольше в зависимости от степени предполагаемого бактериального загрязнения. Для выявления санитарно-показательных микробов применяют кровяной агар (для обнаружения стрептококков), молочно-солевой или желточно-солевой агар (для определения стафилококков), суслоагар или среду Сабуро (для выявления дрожжей и грибов). При определении санитарно-показательных микроорганизмов чашки оставляют открытыми в течение 40–60 мин. По окончании экспозиции все чашки закрывают, помещают в термостат на сутки для культивирования при температуре, оптимальной для развития выделяемого микроорганизма, затем (если этого требуют исследования) на 48 ч оставляют при комнатной температуре для образования пигмента пигментообразующими микроорганизмами.

Аспирационные методы основаны на принудительном осаждении микроорганизмов из воздуха на поверхность плотной питательной среды или в улавливающую жидкость (мясопептонный бульон, буферный раствор, изотонический раствор хлорида натрия и др.). Аспирационные методы используют при исследовании воздуха, как закрытых помещений, так и атмосферного. В настоящее время широко применяется при исследовании воздуха закрытых помещений специальные аспираторы для воздуха или пробоотборные устройства, например, бактериоуловитель Речменского, прибор для отбора проб воздуха (ПОВ-1), пробоотборник аэрозольный бактериологический (ПАБ-1), бактериально-вирусный электропреципитатор (БВЭП-1), аспиратор ПУ-1Б (рис. 74) и др. Принцип работы этого аппарата основан на том, что воздух, просасываемый через клиновидную щель в крышке аппарата, ударяется о поверхность питательной среды, при этом частицы пыли и аэрозоля прилипают к среде, а вместе с ними и микроорганизмы, находящиеся в воздухе. Чашку Петри с тонким слоем среды укрепляют на вращающемся столике аппарата, что обеспечивает равномерное распределение бактерий на ее поверхности.

После отбора пробы с определенной экспозицией чашку вынимают, закрывают крышкой и помещают на 48 ч в термостат. Обычно отбор проб проводят со скоростью 20–25 л/мин в течение 5 мин. Таким образом, определяется флора в 100–125 л воздуха. При обнаружении санитарно-показательных микроорганизмов объем исследуемого воздуха увеличивают до 250 л.



Рис. 74. Аспиратор ПУ-16
(<https://niki-mlt.ru>)

Определение общего микробного числа

Для определения общего количества бактерий в воздухе закрытых помещений забирают две пробы (объемом по 100 л каждая) на чашки Петри с МПА при помощи любого прибора (чаще всего аппарата Кротова), либо седиментационным методом. Чашки с посевом помещают в термостат на сутки, а затем на 48 ч оставляют при комнатной температуре. Подсчитывают количество колоний на обеих чашках, вычисляют среднее арифметическое и делают перерасчет на количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха.

Определение стафилококков. Отбор проб воздуха проводится с помощью аппарата Кротова в количестве 250 л на 2–3 чашки с желточно-солевым агаром и на чашку с кровяным агаром. Чашки инкубируют при температуре 37 °С в течение 48 ч. Изучают культуральные признаки всех видов колоний, из подозрительных готовят мазки и окрашивают по Граму. Подсчитывают количество выросших колоний стафилококков и определяют число микробов в 1 м³ воздуха. При возникновении внутрибольничных инфекций стафилококковой этиологии проводят исследования, направленные на выявление источников и путей распространения инфекции: путем фаготипирования определяют идентичность стафилококков, выделенных из объектов окружающей среды, а также от больных и обслуживающего персонала.

Определение стрептококков. Отбор проб воздуха при исследовании нарабата Кротова на чашки с кровяным агаром. Забирают 200–250 л воздуха, чашки с посевами выдерживают в термостате 18–24 ч и затем еще 48 ч при комнатной температуре (после предварительного просмотра и учета). Подсчет количества выросших колоний проводят на 1 м³ с последующим контрольным микроскопированием.

2.7. МИКРОБИОТА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Микробиоту человека составляет совокупность микробных биоценозов, встречающихся в организме здоровых людей и сформировавшихся в процессе эволюции. Данные биоценозы характеризуются относительным постоянством, однако, качественный и количественный состав микрофлоры организма человека меняется в течение жизни и зависит от пола, возраста, питания, климата и др. Кроме того, изменения микробных биоценозов могут быть обусловлены возникновением заболеваний, применением химиотерапевтических и иммунологических препаратов.

В условиях физиологической нормы организм человека содержит сотни видов микроорганизмов, среди которых доминируют бактерии, тогда как вирусы и простейшие представлены значительно меньшим числом видов. Также, как и в окружающей среде, в организме человека микроорганизмы существуют в виде микробиоценозов. Каждому индивидууму свойственны определенные микробные сообщества, сформировавшиеся в процессе его жизнедеятельности.

В настоящее время выделяют особую форму организации микрофлоры организма человека, заключающуюся в образовании сообщества микроорганизмов, покрывающих поверхности кишечной стенки, других слизистых, кожи и зубов человека. Такое сбалансированное коллективное сообщество микроорганизмов называется биопленкой. Имеются различные формы микробной биопленки – в виде слоя, прикрепленного к клеткам эпителия, или отдельно расположенных конгломератов клеток.

Органы и ткани, не соприкасающиеся с внешней средой, свободны от микроорганизмов. В норме стерильными являются сердце, кровь, лимфа, мозг, спинномозговая жидкость, мочевой пузырь, матка, а также глубокие ткани.

Основные отделы организма, заселяемые бактериями, включают кожные покровы, верхние дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт и мочеполовую систему, конъюнктивы глаза, наружное ухо.

Микрофлору организма человека можно условно разделить на две группы: облигатную (или резидентную, аутохтонную) и факультативную (или транзиторную). *К облигатной микрофлоре* относятся микроорганизмы, максимально приспособленные к существованию в организме человека и постоянно встречающиеся в его органах и полостях. Представителей облигатной микрофлоры подразделяют на виды доминанты и виды наполнители. *Факультативная микрофлора* является временной, необязательной и определяется микробной обсемененностью окружающей среды и состоянием резистентности организма человека. В состав резидентной и транзиторной микрофлоры входят сапрофитные и условно-патогенные микроорганизмы.

В последнее время все большее значение в патологии человека приобретают внутрибольничные или госпитальные инфекции, возбудителями которых

являются условно-патогенные микроорганизмы, относящиеся к резидентной микрофлоре человека. Их патогенность реализуется при ослаблении резистентности макроорганизма.

Микрофлору отдельных биотопов тела человека различна и требует отдельного рассмотрения.

Микробиота кожи

Поверхность кожи человека, особенно открытые ее части, обсеменены различными микроорганизмами, здесь определяется от 25 млн до 1 млрд микробных клеток.

Собственная микрофлора кожи человека представлена *сарцинами*, *стафилококками*, *дифтероидами*, некоторыми видами *стрептококков*, *бациллами*, *грибами* и др. Кроме характерной для кожи микрофлоры здесь могут присутствовать транзиторные микроорганизмы, быстро исчезающие под влиянием бактерицидных свойств кожи. Большой способностью к самоочищению обладает чисто вымытая кожа. Бактерицидность кожи отражает общую резистентность организма.

Микробиота волосяного покрова имеет идентичный состав кожи. Обычно на площади 1 см² выявляют 10³–10⁴ микроорганизмов, но на участках с повышенной влажностью это число может достигать 10⁶. У некоторых людей на коже обнаруживают стрептококки, грамположительные спорообразующие палочки.

Наибольшее число микроорганизмов обитает в складках кожи, здесь встречаются грибы рода *Candida*. В зонах скопления сальных желез (наружное ухо, гениталии) обнаруживают непатогенные кислотоустойчивые микобактерии, коринебактерии, дрожжи.

Неповрежденные кожные покровы для большинства микроорганизмов, в том числе и патогенных, непроницаемы. При нарушении их целостности и понижении резистентности организма могут возникать заболевания кожи.

Санитарно-бактериологическое исследование кожи проводится двумя методами:

1. Посев отпечатков пальцев рук на МПА в чашках Петри с последующим макроскопическим и микроскопическим изучением выросших колоний.
2. Посев смывов с кожи для определения общего микробного числа и кишечной палочки.

Микробиота полости рта

В полости рта имеются благоприятные условия для развития микроорганизмов: наличие питательных веществ, оптимальная температура, влажность, щелочная реакция слюны. В поддержании качественного и количественного постоянства нормальной микрофлоры этого биотопа главную роль играет слюна, обладающая антибактериальной активностью за счет содержащихся в

ней ферментов (лизоцим, лактоферрин, пероксидаза, нуклеаза) и секреторных иммуноглобулинов.

В ротовой полости новорожденных к концу первой недели обнаруживаются *стрептококки*, *нейссерии*, *лактобактерии*, *дрожжеподобные грибы*, *актиномицеты*. Количественный и видовой состав микробов полости рта находится в зависимости от диеты и возраста ребенка. Вовремя прорезывания зубов появляются облигатные грамотрицательные анаэробы.

В ротовой полости обнаруживаются более 350 видов микроорганизмов, большинство из которых анаэробы. Основная масса микроорганизмов полости рта локализуется в зубных отложениях: в 1 мг сухой массы содержится около 250 млн микробных клеток. Большое количество микроорганизмов обнаруживается у шейки зуба, в промежутке между зубами и в других участках полости рта, малодоступных обмыванию слюной, а также на слизистых глоточных миндалинах. Индивидуальные колебания в качественном и количественном составе микрофлоры полости рта зависят от возраста, диеты, гигиенических навыков, резистентности слизистой оболочки, наличия патологических процессов в зубах и деснах.

Резидентную группу бактерий полости рта составляют Г⁺ кокки (стрептококки, пептококки), вейлонеллы, непатогенные стафилококки, сапрофитные нейссерии, коринобактерии, лактобациллы, бактероиды, фузиформные бактерии, дрожжеподобные грибы, актиномицеты, микоплазмы (*M. orale*), простейшие (*Entamoeba buccalis*).

Среди факультативных микроорганизмов встречаются энтеробактерии (роды *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*), синегнойная палочка, спорообразующие бактерии (роды *Bacillus*, *Clostridium*), микроорганизмы рода *Campylobacter* (*C. consocius*, *C. sputorum*).

Для качественного и количественного изучения микрофлоры полости рта используют бактериоскопический и бактериологический методы исследования.

Микробиота желудочно-кишечного тракта

Микробиота ЖКТ в зависимости от его отдела различается по качественному и количественному составу. При нормальном функционировании желудка микрофлора в нем почти отсутствует, вследствие кислой реакции желудочного сока и высокой активности гидролитических ферментов. Поэтому в желудке могут быть обнаружены в небольшом количестве кислотоустойчивые виды – *лактобактерии*, *дрожжи*, *Sarcina ventriculi* и др. (10^6 – 10^7 клеток на 1 мл содержимого).

В 12-перстной и верхних отделах тонкой кишки микроорганизмов встречается мало, несмотря на то, что кислая среда желудка сменяется щелочной. Это объясняется неблагоприятным воздействием на микроорганизмы присут-

ствующих здесь ферментов. Тут обнаруживаются энтерококки, молочнокислые бактерии, грибы, дифтероиды (10^6 клеток на 1 мл содержимого). В нижних отделах тонкой кишки, постепенно обогащаясь, микрофлора сближается с микрофлорой толстой кишки.

Микрофлора толстой кишки наиболее разнообразна по числу видов (более 200 видов) и количеству обнаруживаемых микробов (10^9 – 10^{11} клеток в 1 мл содержимого). Микробы составляют 1/3 сухой массы фекалий.

Облигатная микрофлора представлена облигатными анаэробными бактериями – 96–99 % (бактероиды, бифидумбактерии, вейлонеллы) и факультативными анаэробами (1–4 %) – лактобактерии, фекальные энтерококки и бактерии группы кишечной палочки, овключающих бактерии 4 родов семейства Enterobacteriaceae: Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella. Объединение этих микроорганизмов в группу произведено на основании общих признаков: это грамотрицательные, неспорообразующие, оксидазоотрицательные палочки, ферментирующие глюкозу и лактозу до кислоты и газа при 37 °C за 24 ч.

Транзиторная микрофлора представлена следующими родами и видами: протей, клостридии, синегнойная палочка, кампилобактер, дрожжеподобные грибы рода Candida и др. Микроорганизмы рода Campylobacter (C. fennelliae, C. cinaedi, C. hyointestinalis) встречаются в толстом кишечнике человека при иммунодефицитных состояниях различной природы.

Состав микрофлоры кишечника меняется в течение жизни человека. У новорожденных в первые часы после рождения меконий стерилен – асептическая фаза. Вторая фаза – фаза возрастающей обсемененности (первые три дня жизни ребенка). В этот период в кишечнике преобладают эшерихии, стафилококки, энтерококки, дрожжеподобные грибы. Третья фаза – фаза трансформации флоры кишечника (начиная с 4 дня жизни). Устанавливается молочнокислая микрофлора, лактобактерии, ацидофильные бактерии. После окончания грудного вскармливания начинает постепенно формироваться постоянный биоценоз в пищеварительном тракте.

В микрофлоре желудочно-кишечного тракта различают *мукозную (М)* и *просветную (П)* микрофлору, состав которой различен. *М-флора* тесно ассоциирована со слизистой оболочкой, более стабильна и представлена бифидумбактериями и лактобактериями. Она препятствует проникновению в слизистую оболочку патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. *П-флора* наряду с бифидум- и лактобактериями включает и других постоянных обитателей кишечника.

Для изучения микрофлоры толстого кишечника исследованию подвергают испражнения, видовой состав которых определяют микроскопическими и бактериологическими методами.

Микробиота дыхательных путей

Верхние отделы дыхательных путей несут особенно высокую микробную

нагрузку, так как они анатомически приспособлены для осаждения бактерий из вдыхаемого воздуха. В дыхательные пути вместе с воздухом попадают пылевые частички и микроорганизмы, большая часть которых задерживаются в полости носа, где и погибают через некоторое время вследствие бактерицидного действия лизоцима и муцина, защитной функции эпителия, деятельности фагоцитов. В состав *облигатной микрофлоры* носовых ходов входят стафилококки, коринебактерии. *Факультативная микрофлора* представлена золотистым стафилококком, стрептококками, непатогенными нейссериями. Микрофлора носоглотки представлена стрептококками, бактероидами, нейссериями, вейллонеллами, микобактериями. У некоторых людей постоянно встречается золотистый стафилококк, т.е. наблюдается резидентное носительство.

Слизистая оболочка трахеи и бронхов стерильна. Мелкие бронхи, альвеолы, паренхима легких человека также свободны от микроорганизмов.

Для микробиологического исследования материал из носа берут стерильным тампоном, а из носоглотки – стерильным заднеглоточным тампоном. Делают посев на кровяной агар и желточно-солевой агар. Выделенные культуры идентифицируют.

Микробиота конъюнктивы

В значительном проценте случаев микрофлора конъюнктивы отсутствует, что обусловлено бактерицидными свойствами слезной жидкости. В отдельных случаях на конъюнктиве глаза могут обнаруживаться стафилококки, коринебактерии (*Corinebacterium xerosis*), микоплазмы. При снижении естественной защиты организма, нарушении зрения, гиповитаминозах нормальная микрофлора слизистых оболочек глаз может вызывать различные заболевания: конъюнктивиты, блефариты и другие нагноительные процессы.

Микробиота уха

В наружном слуховом проходе обнаруживаются непатогенные стафилококки, коринебактерии, дрожжеподобные и плесневые грибы (*Aspergillus*), которые в определенных условиях являются возбудителями патологических процессов. Во внутреннем и среднем ухе микробы в норме не содержатся.

Микробиота мочеполовой системы

Микробный состав биотопов мочеполовой системы различается в зависимости от пола, возраста и органа.

Почки, мочеточники и моча в мочевом пузыре стерильны. В мочеиспускательном канале мужчин обитают стафилококки, дифтероиды, бактероиды, микобактерии, грамотрицательные непатогенные бактерии. Уретра женщин стерильна.

На наружных половых органах мужчин и женщин обнаруживаются микобактерии смегмы (*M. smegmatis*), стафилококки, коринебактерии, микоплазмы (*M. hominis*), сапрофитные трепонемы.

Состав влагалищной микрофлоры разнообразен, непостоянен и зависит от уровня гликогена в клетках эпителия и pH влагалищного секрета, что связано с функцией яичников. Заселение влагалища лактобактериями происходит сразу после рождения. Затем, в микробиоценоз включаются энтерококки, стрептококки, стафилококки, коринебактерии. Кокковая флора становится ведущей и характерной для периода детства вплоть до наступления полового созревания. С наступлением половой зрелости в составе микрофлоры преобладают аэробные и анаэробные молочнокислые бактерии, доминирует группа бактерий Додерлейна (лактобактерии).

Различают несколько категорий чистоты влагалища здоровых женщин: 1-я категория – в мазках-препаратах обнаруживаются палочки Додерлейна, других видов микроорганизмов почти нет; 2-я категория – кроме молочно-кислых бактерий встречается небольшое количество грамположительных диплококков; 3-я категория – уменьшается количество молочнокислых бактерий, увеличивается количество лейкоцитов и другой микрофлоры; 4-я категория – обильное количество лейкоцитов и различной микрофлоры, палочки Додерлейна почти отсутствуют. 1 и 2 категории наблюдаются у здоровых женщин, 3 и 4 – у женщин с воспалительными процессами во влагалище. Полость матки у здоровых женщин стерильна.

Значение нормальной микробиоты организма человека

Нормальная микробиота здорового человека играет важную роль в поддержании здоровья и в нормальном функционировании всего организма.

Облигатная микрофлора (кишечная палочка, лактобактерии, бифидумбактерии, некоторые виды грибов) обладает выраженными антагонистическими свойствами в отношении некоторых возбудителей инфекционных заболеваний. Антагонистические свойства нормальной микробиоты связаны с образованием антибиотических веществ, бактериоцинов, спиртов, молочной кислоты и других продуктов, ингибирующих размножение патогенных видов микроорганизмов.

Некоторые энтеробактерии (*E. coli*) синтезируют витамины группы В, витамин К, пантотеновую и фолиевую кислоты, в которых нуждается макроорганизм. Активными продуцентами витаминов также являются молочнокислые бактерии.

Велика роль микрофлоры в формировании резистентности организма. При нарушении состава нормальной микрофлоры у гнотобионтов (безмикробных животных) наблюдается гипоплазия лимфоидной ткани, снижение клеточных и гуморальных факторов иммунитета.

Микрофлора желудочно-кишечного тракта оказывает влияние на морфологическую структуру слизистой оболочки кишечника и ее адсорбционную способность; расщепляя сложные органические вещества эти микроорга-

низмы способствуют пищеварению. Установлено, что такой постоянный обитатель кишечника как *C. perfringens*, обладает свойством вырабатывать пищеварительные ферменты.

При нормальной колонизации слизистых оболочек бактерии, являясь антигенами, индуцируют образование антител (IgA), составляют основу местного иммунитета и не позволяют возбудителям проникнуть в ткани, а также способствуют поддержанию гомеостаза самих слизистых оболочек.

Для нормального функционирования организма человека важным является взаимоотношение макроорганизма и населяющей его микрофлоры. При нарушении сложившихся взаимоотношений, причиной которых могут быть переохлаждение, перегревание, ионизирующая радиация, психические воздействия и др., микробы из мест своего обычного обитания распространяются, проникая во внутреннюю среду и вызывая патологические процессы.

Нормальная микробиота способна вызывать развитие инфекционных заболеваний, большая часть которых носит оппортунистический (сопровождающий) характер. Например, кишечные анаэробы (бактероиды) при проникновении в стенку кишечника в результате травмы вызывают формирование абсцессов, а основными возбудителями постгриппозных пневмоний считают микроорганизмы, обитающие в носоглотке любого человека. Ведущую роль в развитии подобных поражений играет не вирулентность самого возбудителя, а ослабление защитных систем макроорганизма (иммунодефицит).

Дисбиоз

Дисбиоз – качественное и количественное нарушение экологического баланса между микробными популяциями в составе микробиоты организма человека. Дисбиоз возникает при воздействии дестабилизирующих факторов, таких как, нерациональное использование антибиотиков широкого спектра действия, антисептиков, резкое снижение резистентности организма, вследствие хронических инфекций, радиации и др. При дисбиозах происходит подавление микробов-антагонистов, регулирующих состав микробного биоценоза и размножение условно-патогенных микроорганизмов. Таким путем происходит нарастание и распространение микроорганизмов из родов *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, являющихся причиной внутрибольничных инфекций, дрожжеподобных грибов *Candida albicans*, вызывающих кандидозы, *E. coli*, являющейся возбудителем колиэнтеритов и др.

Наиболее часто встречается дисбиоз кишечника, который проявляется в нарушении его работы, сопровождается общим недомоганием, болями в области живота и повышенным газообразованием. Длительное нарушение соотношения микроорганизмов в кишечнике может провоцировать развитие аллергических заболеваний, таких как бронхиальная астма, хронический бронхит, ревматоидный артрит и др.

Для коррекции дисбиозов применяются пробиотики, пребиотики и син-

биотики. **Пробиотики** – препараты, получаемые из живых микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры организма человека. К ним относятся колибактерин (живые бактерии кишечной палочки, штамм М-17), бифидумбактерин (взвесь живых *B. bifidum*, штамм n 1), лактобактерин (взвесь живых штаммов *Lactobacterium*), бификол (комплексный препарат, состоящий из взвеси живых бифидумбактерий, штамм n 1 и кишечных палочек, штамм М-17). К **пребиотикам** относятся препараты немикробного происхождения, неперевариваемые в кишечнике, способные оказывать стимулирующее влияние на рост и/или метаболическую активность нормальной микрофлоры. К пребиотикам предъявляются достаточно строгие требования: они не должны подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами человека, не должны абсорбироваться в верхних отделах ЖКТ, должны селективно стимулировать определенную группу микроорганизмов. Примером пребиотика является хилак форте. **Синбиотики** – препараты, являющиеся комбинацией пре- и пробиотиков (например, максилак).

Дисбиоз кишечника выявляют бактериологическим методом. По результатам посевов испражнений определяют:

- 1) содержание общего количества кишечных палочек, типичных по ферментативной активности;
- 2) наличие гемолитических штаммов *E. coli*;
- 3) наличие прочих условно-патогенных микроорганизмов;
- 4) наличие бактерий рода *Proteus*;
- 5) наличие грибов рода *Candida*;
- 6) количественное содержание бифидобактерий, лактобактерий, бактериоидов.

В таблице 7 приведен состав микробиоты кишечника.

Таблица 7

Содержание бактерий в испражнениях здоровых человека

Бактерии	Количество (в 1 г испражнений)
Бифидобактерии	10^8-10^9
Бактероиды	10^9-10^{10}
Лактобактерии	10^6-10^8
Спорообразующие анаэробные клостридии	10^5
Эшерихии: лактозоположительные	10^7-10^8
• лактозодефектные	10^5-10^7
• не ферментирующие лактозу	10^5-10^7
• гемолизирующие	10^6
Протеи	10^4
Клебсиеллы	10^3
Прочие грамотрицательные бактерии	10^3
Стафилококки (эпидермальные, гемо- и негемолизирующие сапротрофные)	10^4

Энтерококки	10^5 – 10^6
Дрожжеподобные грибы	10^4
Плесени	10^4

2.8. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Генетическая система бактерий

Генетическая система бактерий состоит из ядерных и внеядерных структур. Аналог ядра прокариотов значительно отличается от ядра эукариотических клеток. Он представлен *нуклеоидом*, лишенным оболочки и включающем в себя почти всю ДНК бактерии. Бактериальная хромосома состоит из одной *двунитевой молекулы ДНК кольцевой формы*. Молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепочек. Каждый *нуклеотид* состоит из азотистого основания, сахара дезоксирибозы и фосфатной группы. Азотистые основания представлены пуринами (аденин, гуанин) и пиримидинами (тимин, цитозин). Каждый нуклеотид обладает полярностью и у него имеются дезоксирибозный 3'-конец и фосфатный 5'-конец. Нуклеотиды соединяются в полинуклеотидную цепочку фосфодиэфирными связями между 5'-концом одного нуклеотида и 3'-концом другого. Соединение между двумя цепочками обеспечивается водородными связями комплементарных азотистых оснований: аденина с тимином, гуанина с цитозином. Нуклеотидные цепи антипараллельны: на каждом конце линейной молекулы ДНК расположены 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой цепи. Наследственная информация у бактерий хранится в форме последовательности нуклеотидов ДНК, которая определяет последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка. Каждому белку соответствует свой *ген*, то есть дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов. Бактериальная хромосома содержит до 4000 отдельных генов. Совокупность всех генов называется *геномом*. Внешнее проявление генома называется *фенотипом*. Размеры бактериальной хромосомы у различных представителей прокариот варьируют от 3×10^8 до $2,5 \times 10^9$ Д. Бактериальная клетка гаплоидна, а удвоение хромосомы всегда сопровождается ее делением.

Генетическая информация в бактериях может содержаться во *внеядерных* (внехромосомных) молекулах ДНК, представленных плазмидами, транспозонами и инсерционными (вставочными) последовательностями. Они не являются жизненно необходимыми, так как не кодируют информацию о синтезе ферментов, участвующих в метаболизме бактериальной клетки.

Плазмиды бактерий представляют собой двунитевые молекулы ДНК размером от 10^6 до 10^8 Д, несущие от 40 до 50 генов. Количество плазмид в бактериальной клетке может быть от 1 до 200. Выделяют плазмиды, находящиеся

в виде отдельной замкнутой молекулы ДНК (*эписомы*) и встроенные в хромосому бактерии (*интегрированные плазмиды*). Плазмиды выполняют регуляторные и кодирующие функции. Первые направлены на компенсацию метаболических дефектов, вторые вносят в бактерию информацию о новых признаках. Как составляющая часть генетического материала бактерии плазмиды играют важную роль в ее жизнедеятельности, детерминируя такие характеристики, как способность продуцировать экзотоксины, ферменты и бактериоцины, устойчивость к лекарственным препаратам и т.д.

Удвоение ДНК некоторых плазмид индуцирует деление бактерий, то есть увеличивает их «плодовитость». Такие плазмиды обозначают как *F-плазмиды* или F-факторы (от англ. *fertility* – плодовитость). Интегрированные F-плазмиды называют *Hfr-плазмиды* или Hfr-факторы (от англ. *high frequency of recombinations* – высокая частота рекомбинаций). Hfr-факторы осуществляют перенос части генетической информации данной хромосомы в другую клетку.

Плазмиды, детерминирующие устойчивость к лекарственным антимикробным препаратам, называются *R-плазмидами* или R-факторами (от англ. *resistance* – устойчивость). R-плазмиды содержат гены, детерминирующие синтез ферментов, которые разрушают антибактериальные препараты или отвечают за другие механизмы резистентности. В результате бактериальная клетка становится устойчивой к действию целой группы лекарственных веществ. Многие R-плазмиды являются трансмиссивными и, распространяясь в популяции бактерий, переносят резистентность к воздействию антибактериальных препаратов.

Плазмиды патогенности контролируют вирулентные свойства микроорганизмов, детерминируя синтез факторов патогенности. Так, например, Ent-плазида определяет синтез энтеротоксина. Развитие инфекционного процесса, вызванного возбудителями чумы, сибирской язвы, кишечного иерсиниоза, клещевого иксодового боррелиоза связано с функционированием плазмид патогенности.

Конъюгативные плазмиды переносятся от бактерии к бактерии внутри вида или между представителями близкородственных видов в процессе конъюгации. Чаще всего конъюгативными плазмидами являются F- или R-плазмиды. Подобные плазмиды относительно крупные (25–150 млн Д) и часто встречаются у грамотрицательных палочек. Большие плазмиды обычно присутствуют в количестве 1–2 копий на клетку, и их репликация тесно связана с репликацией бактериальной хромосомы.

Неконъюгативные плазмиды обычно имеют небольшие размеры и характерны для грамположительных кокков, но встречаются также у некоторых грамотрицательных микроорганизмов (например, у *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*). Мелкие плазмиды могут присутствовать в больших количествах (более 30 на клетку), так, как только наличие такого количества обеспечивает их распределение в потомстве во время клеточного деления. При

наличии в бактерии одновременно конъюгативных и неконъюгативных плазмид донор может передавать и неконъюгативные плазмиды за счет связывания генетического материала последних с факторами, обеспечивающими их перенос в процессе конъюгации.

Подвижные генетические элементы входят в состав бактериального генома, бактериальной хромосомы и плазмид. К ним относятся *вставочные последовательности* в ДНК и *транспозоны*. Вставочные или инсерционные последовательности (Is-элементы) представляют собой участки ДНК, способные перемещаться из одного места локализации в другое, и содержат только гены, необходимые для перемещения. Is-последовательности осуществляют координацию взаимодействий плазмид, умеренных фагов, транспозонов и нуклеоида для обеспечения репродукции; регулируют активность генов бактериальной клетки. Они могут инактивировать гены, в которые включились («выключение» гена) или, встраиваясь в хромосому, проявлять эффект промотора, включающего или выключающего транскрипцию соответствующих генов.

Транспозоны (Tn) – это сегменты ДНК, состоящие из вставочных последовательностей и структурных генов, обеспечивающих синтез молекул со специфическими биологическими свойствами (токсичность, устойчивость к антибиотикам и др.). Транспозоны не способны к самостоятельной репликации и размножаются только в составе бактериальной хромосомы.

Репликация бактериальной ДНК

Воспроизведение генетического материала бактерий осуществляется в процессе *репликации*, которая у бактерий протекает по полуконсервативному механизму. Это означает, что каждая из двух цепочек ДНК хромосомы или плазмиды служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепочки ДНК. В процессе репликации участвует комплекс ферментов. Репликация начинается с момента расплетения двунитевой структуры ДНК, которое осуществляется ферментом *ДНК-гидролазой*. При этом формируются две репликативные вилки, которые двигаются в противоположных направлениях, пока не встретятся. Формирование новой дочерней цепи осуществляется ферментом *ДНК-полимеразой*. Особенностью функционирования ДНК-полимеразы является ее способность присоединять комплементарные матрице нуклеотиды к свободному 3'-концу растущей цепочки. Поэтому для осуществления реакции полимеризации нуклеотидов на матрице родительской цепочки ДНК-полимеразе требуется затравка, которая называется *праймером* (от англ. *Primer* – запал). Праймер представляет собой короткую нуклеотидную цепочку, комплементарную матричной цепочке со свободным 3'-концом. На этом свойстве ДНК-полимеразы основана полимеразная цепная реакция (ПЦР), широко используемая в диагностике инфекционных заболеваний. Две цепи двойной спи-

рали ДНК комплементарны друг другу. На каждой цепи из структурных элементов ДНК – дезоксирибонуклеозидтрифосфатов – синтезируется новая цепь; при этом с каждым из оснований спаривается комплементарное ему основание, так что каждая из двух новых цепей будет комплементарна родительской цепи. Обе новые двойные цепи состоят из одной родительской и одной вновь синтезированной цепи. Такая точная репликация ДНК гарантирует сохранение генетической информации.

ДНК бактерий, будучи носителем наследственной информации, сама не служит матрицей для синтеза полипептидов. Биосинтез белков происходит на *рибосомах*, которые непосредственно с ДНК не соприкасаются. Передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка осуществляет *матричная* или *информационная* РНК (мРНК). Она состоит из одной цепи и отличается от одиночной цепи ДНК тем, что тимин (Т) в РНК заменен урацилом (U). мРНК синтезируется на одной из цепей ДНК, причем механизм этого процесса сходен с механизмом репликации ДНК. Образование мРНК начинается на 5'-конце, и по последовательности оснований ее цепь комплементарна цепи ДНК. Этот процесс называется *транскрипцией*, а перевод нуклеотидной последовательности в последовательность аминокислот – *трансляцией*.

Каждый ген представлен определенным участком молекулы ДНК. Специфическая информация, содержащаяся в гене, определяется последовательностью оснований в цепи ДНК. Специфичность ферментных белков, синтез которых контролируют гены, определяется последовательностью аминокислот в полипептидных цепях. Эта же последовательность определяет и пространственную структуру белка – *конформацию*.

Так растет полипептидная цепь по мере продвижения рибосомы вдоль мРНК. Одновременно происходит закручивание этой цепи и свертывание ее в клубок, определяемое последовательностью аминокислот и природой их боковых цепей (гидрофобные и гидрофильные группы), и в результате возникает структура, обуславливающая специфические свойства и функцию данного белка. К мРНК обычно прикрепляется несколько рибосом, так что на одной и той же матрице одновременно синтезируются несколько полипептидных цепей. На конце мРНК находится кодон, от которого зависит отделение сформированной полипептидной цепи от рибосомы.

Таким образом, нуклеотидная последовательность ДНК представляет собой закодированную «инструкцию», определяющую структуру специфического белка. Этот универсальный процесс передачи информации при репликации ДНК, транскрипции и трансляции применим как к эукариотам, так и к прокариотам.

Регуляция выражения генетической информации у бактерий

Бактериальная клетка способна запустить или прекратить синтез того или иного фермента в зависимости от присутствия соответствующего субстрата.

Для этого бактериальные гены объединены в группы (*кластеры*) таким образом, что все ферменты, необходимые для осуществления определенного пути биосинтеза, детерминируются генами, сцепленными друг с другом. Вся группа генов может транскрибироваться в одну полицистронную мРНК, которая последовательно транслируется рибосомами с образованием каждого из белков. Такая форма организации позволяет координировано регулировать выражение всех генов одной единицы транскрипции.

Экспрессия генов у прокариота регулируется главным образом на уровне транскрипции. Роль сигнальных веществ для запуска транскрипции играют *молекулы-эффекторы*, представляющие собой низкомолекулярные соединения, которые являются либо субстратом для фермента, либо продуктом ферментативной деятельности, соответственно. Индукция и репрессия представляют собой разные стороны одного и того же явления. Малые молекулы, индуцирующие образование ферментов, способных метаболизировать их, называются *индукторами*. Те же молекулы, которые предотвращают образование ферментов, способных синтезировать их, – *корепрессорами*.

Молекулы-эффекторы не могут вступать в прямое взаимодействие с ДНК, посредником для них служит специальный *регуляторный белок*. Регуляторный белок, который связывается с ДНК в отсутствие индуктора, называется *репрессором*.

За синтез регуляторных белков ответственны *регуляторные гены*. В присутствии белка-репрессора транскрипция блокирована; его удаление обуславливает доступ РНК-полимеразы к генам и запуск транскрипции. Прекращение синтеза фермента при помощи белка-репрессора получило название *репрессии*. Репрессия позволяет бактериальной клетке избежать перевода своих ресурсов на ненужную в данный момент синтетическую активность. Если индуктор присутствует в клетке в высокой концентрации, то в результате специфического присоединения к регуляторному белку он изменяет его конформацию и тем самым – его способность связываться с ДНК. Такой вид регуляции показан на рисунке 75.

Контроль транскрипции достигается взаимодействием регуляторного белка с регуляторным сайтом, называемым *оператором*, который расположен между структурными генами и *промотором* (участком, распознаваемым ДНК-зависимой РНК-полимеразой). Промотор служит местом связывания РНК-полимеразы, и от него начинается транскрипция. Совокупность промотора, оператора и структурных генов образует *оперон*. Оперон является функциональной генетической единицей, регулирующей экспрессию одного или группы генов.

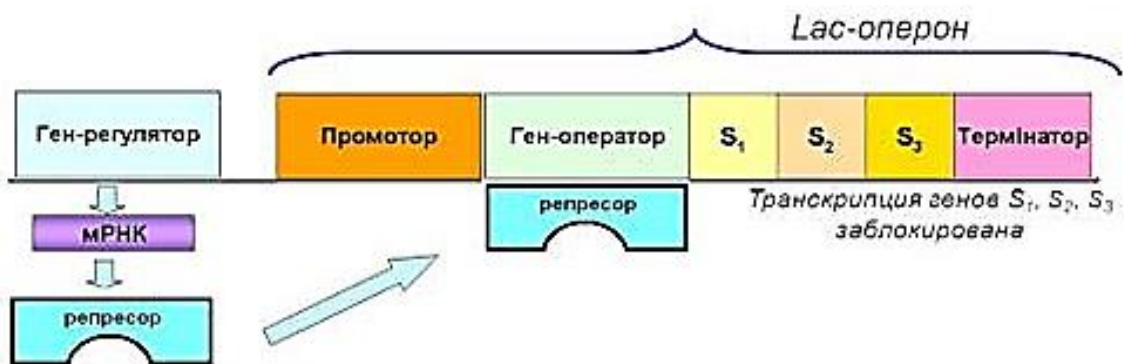


Рис. 75. Строение *Lac*-оперона *E. coli*. *Lac*-оперон контролирует синтез ферментов катаболизма лактозы (β -галактозидазы). При отсутствии в среде лактозы *Lac*-оперон находится в состоянии репрессии (активный белок-репрессор связывается с геном-оператором и блокирует транскрипцию структурных генов S_1 - S_3 , β -галактозидаза не синтезируется). В присутствии в среде лактозы, она инактивирует белок-репрессор, который теряет сродство к оперону, и освобождает путь для РНК-полимеразы. Транскрипция становится возможной.

Перенос генетического материала бактерий

Обмен генетическим материалом у бактерий осуществляется путем генетических рекомбинаций. Под *генетической рекомбинацией* подразумевают взаимодействие между двумя геномами, которое приводит к образованию рекомбинаций ДНК и формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих родителей. Особенности рекомбинаций у бактерий определяются отсутствием истинного полового процесса и мейоза у прокариота, и гаплоидным набором генов. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые этот материал воспринимают. В клетку-реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора, то есть один или несколько генов. Образуется только один рекомбинант, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента с включением фрагментов хромосомы донора.

Рекомбинация может быть *гомологичной*, при которой в процессе разрыва и воссоединения ДНК происходит обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью гомологии. Встречается также *сайт-специфическая* рекомбинация, которая происходит только в определенных участках (сайтах) генома и не требует высокой степени гомологии ДНК, например, включение плазмиды в хромосому бактерии. Передача генетического материала между бактериями осуществляется тремя механизмами: конъюгацией, трансдукцией и трансформацией.

Конъюгация – это перенос генетического материала путем прямого контакта между двумя клетками. Необходимым условием конъюгации является наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды. Трансмиссивные плаз-

миды кодируют половые пили, образующие конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которой плазмидная ДНК передается из клетки-донора в клетку-реципиент. В результате такого переноса клетка-реципиент получает донорские свойства. Интегративной трансмиссивной плазмидой является F-фактор. Клетки-доноры, обладающие F-фактором, обозначаются как F^+ -клетки, а клетки-реципиенты, не имеющие F-фактора – F^- -клетки. Если F-фактор встраивается в хромосому клетки-донора и начинает функционировать в виде единого с хромосомой трансмиссивного репликона, то хромосома донора приобретает способность передаваться в клетку-реципиент. Донорские клетки, имеющие встроенный в хромосому F-фактор, называются *Hfr-клетками*. Хромосомная ДНК реплицируется, одна цепь копии хромосомы переносится в реципиентную F^- -клетку, тогда как другая остается в Hfr^+ -клетке, то есть донор сохраняет свое генетическое постоянство.

Передача генетического материала при конъюгации начинается с расщепления ДНК в районе локализации F-фактора. Одна нить донорской ДНК передается через конъюгационный мостик в клетку-реципиент. Процесс сопровождается достраиванием комплементарной нити до образования двунитевой структуры. Переданная в реципиентную клетку и достроенная до двунитевой структуры нить ДНК рекомбинирует с гомологичным участком реципиентной ДНК с образованием стабильной генетической структуры. Биологическая значимость конъюгации хорошо видна на примере распространения резистентности бактерий к антибиотикам. Устойчивость к антибиотикам бактерия может получить в результате мутации, что происходит 1 раз на каждые 10^6 клеточных делений. Однако, однажды изменившись, генетическая информация может быстро распространяться среди сходных бактерий посредством конъюгации, поскольку каждая третья из близкородственных бактерий способна именно к этому типу генетического переноса (рис. 76).

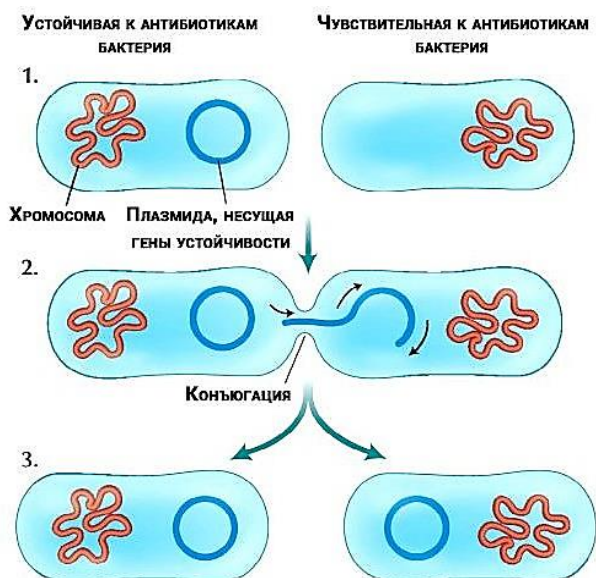


Рис. 76. Схема конъюгации на примере передачи плазмиды резистентности к антибиотикам

Трансформация – передача генетической информации через выделенную из клетки-донора ДНК. Процесс трансформации может произвольно происходить в природе у некоторых видов бактерий, чаще грамположительных, когда ДНК, выделенная из погибших клеток, захватывается реципиентными клетками. Как правило, любая чужеродная ДНК, попадающая в бактериальную клетку, расщепляется рестрикционными эндонуклеазами; но при некоторых условиях такая ДНК может быть интегрирована в геном бактерии. По происхождению ДНК может быть плазмидной либо хромосомной и нести гены, трансформирующие реципиента. Подобным путем, процессы трансформации могут распространять гены, кодирующие факторы вирулентности, среди бактериальных популяций; однако в обмене генетической информацией трансформация играет незначительную роль. Процесс трансформации представлен на рисунке 77.

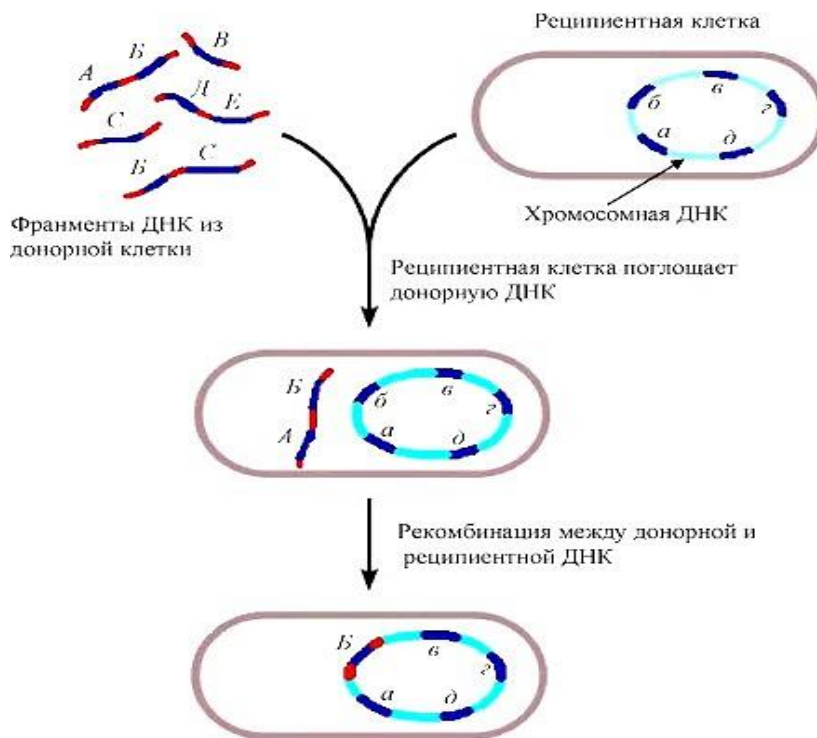


Рис. 77. Схема трансформации бактерий

Трансформация служит хорошим инструментом для картирования хромосом, поскольку трансформированные клетки включают различные фрагменты ДНК. Определение частоты одновременного приобретения двух заданных характеристик (чем ближе расположены гены, тем более вероятно, что они оба включатся в один и тот же участок ДНК) дает информацию о взаиморасположении соответствующих генов в хромосоме. Перенос экстрагированной ДНК является основным методом генной инженерии, используемым при конструировании рекомбинантных штаммов с заданным геномом.

Трансдукция – передача бактериальной ДНК посредством бактериофага. В процессе репликации фага внутри бактерий фрагмент бактериальной ДНК

проникает в фаговую частицу и переносится вместе с ней в бактерию-реципиент. При этом фаговые частицы, как правило, дефектны, они теряют способность к репродукции. Так как трансдуцируются лишь небольшие фрагменты ДНК, вероятность рекомбинации, затрагивающей какой-то определенный признак, очень мала: она составляет от 10^{-6} до 10^{-8} . Существуют три типа трансдукции: неспецифическая (общая), специфическая и abortивная.

Общая (неспецифическая) трансдукция – перенос бактериофагом фрагмента любой части бактериальной хромосомы. В клетке, инфицированной бактериофагом, в ходе сборки дочерней популяции в головки некоторых фагов может проникнуть фрагмент бактериальной ДНК или плазмиды либо вместе с вирусной ДНК, либо вместо нее. Этот процесс происходит вследствие того, что бактериальная ДНК фрагментируется после фаговой инфекции, и кусочек бактериальной ДНК того же размера, что и фаговая ДНК, проникает в вирусную частицу с частотой приблизительно 1 на 1000 фаговых частиц. При такой форме трансдукции в клетки-реципиенты могут быть внесены практически любые гены. Феномен неспецифической трансдукции может быть использован для картирования бактериальной хромосомы. Механизмы неспецифической и специфической трансдукции представлены на рисунке 78.

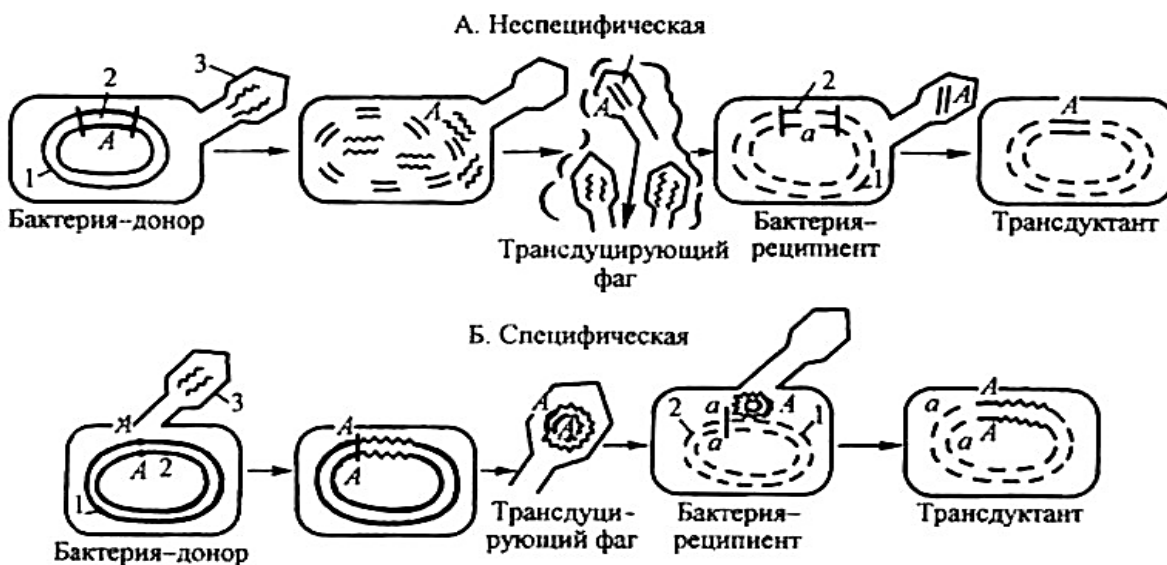


Рис. 78. Схема неспецифической (А) и специфической (Б) трансдукции

Специфическая трансдукция наблюдается в том случае, когда фаговая ДНК интегрирует в бактерию с образованием профага. При исключении ДНК фага из бактериальной хромосомы в результате случайного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК фрагмент бактериальной хромосомы. Так как большинство умеренных фагов интегрируют в бактериальную ДНК в специфических участках, для таких бактериофагов характерен перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК

донора. Специфическая трансдукция может служить механизмом переноса вирулентных генов среди бактерий при условии, что эти гены локализованы в непосредственной близости от мест интеграции профага.

Наиболее характерным примером служит трансдукция, осуществляемая фагом λ . Обычно он трансдуцирует определенные гены: *gal* (кодирует синтез галактозы) и *bio* (кодирует синтез биотина). При переходе в состояние профага фаг λ включается в определенный участок хромосомы бактерии-хозяина – между генами *gal* и *bio*. Отделение фаговой ДНК от бактериальной хромосомы может происходить неточно, и какой-то фрагмент ее останется в хромосоме, а близко расположенные гены будут захвачены фаговой ДНК. В случае заражения трансдуцирующим фагом клеток, дефектных по определенному гену, например, *gal*⁻, может произойти рекомбинация с заменой собственного дефектного гена бактерии интактным трансдуцированным геном с образованием рекомбинанта (трансдуктанта) *gal*⁺.

Абортивная трансдукция. При абортивной трансдукции внесенный фрагмент ДНК донора не встраивается в хромосому реципиента, а остается в цитоплазме и там самостоятельно функционирует. Впоследствии он передается одной из дочерних клеток (то есть наследуется однолинейно) и затем теряется в потомстве.

Генетическая изменчивость бактерий

Изменения бактериального генома могут происходить в результате мутаций. **Мутации** – это изменения в последовательности нуклеотидов ДНК, проявляющиеся наследственно закрепленной утратой или изменением какого-либо признака или группы признаков. В их основе лежат ошибки копирования наследственной информации, возникающие при репликации. Фенотипическим проявлением мутации могут быть: изменение морфологии бактериальной клетки, возникновение потребности в факторах роста (например, в аминокислотах, витаминах), то есть ауксотрофность; появление устойчивости к антибиотикам; изменение чувствительности к температуре; снижение вирулентности (*аттенуация*). Мутации у бактерий носят ненаправленный характер.

Мутации могут быть спонтанными, то есть возникающими самопроизвольно, без воздействия извне, и индуцированными. *Спонтанные* мутации появляются в результате ошибок репликации ДНК, неправильного формирования комплементарных пар оснований, структурных искажений ДНК и вследствие перемещения подвижных генетических элементов в процессе роста и размножения популяции бактерий. Спонтанные мутации могут обуславливать благоприятные и неблагоприятные генетические изменения. Вероятность возникновения определенных мутаций в расчете на одну клетку и на одну генерацию называют частотой мутирования. При высоких скоростях роста она постоянна, и ее обычно определяют для клеток в экспоненциальной фазе роста

при оптимальных условиях среды. В фенотипе проявляются не все мутации. Непроявленные мутации называются *молчащими*. У мутанта может произойти *обратная* мутация или *реверсия*, в результате которой восстановятся свойства дикого штамма. Об истинной обратной мутации говорят лишь в тех случаях, когда вторая мутация точно восстанавливает исходный генотип, если же восстанавливается только фенотип, то говорят о *вторичной реверсии* или *супрессорной* мутации. Супрессорные мутации могут происходить как в исходном гене, так и в каких-либо других участках хромосомы (*интргенные* и *экстрагенные* супрессорные мутации).

Индукцированные мутации возникают под влиянием внешних факторов, которые называют *мутагенами*. Мутагены бывают физическими (УФ-лучи, γ -радиация), химическими (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, например, 2-аминопурин, азотистая кислота и ее аналоги, алкилирующие агенты и др.) и биологическими (транспозоны).

По протяженности повреждений мутации бывают *точечными*, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, и *протяженными* (*абберациями*). Мутации разделяют на *хромосомные*, обуславливающие появление нового признака при изменении двух и более участков хромосомы, и *генные*, обусловленные появлением нового признака при изменении гена. В этом случае может наблюдаться *модификации* оснований (изменения отдельных нуклеотидов), выпадение нескольких пар нуклеотидов (*делеции*), перемещение группы нуклеотидов в пределах хромосомы (*транспозиция*), разрыв путем вставки посторонней ДНК (*инсерция*) или добавление нуклеотидных пар (*дупликация*) и деформации спирали ДНК. Для точечных мутаций частота реверсий довольно высока, в то время как для аббераций реверсии не характерны. Первичный эффект мутагенного фактора не обязательно ведет к истинной мутации. Новый фенотип проявляется только тогда, когда измененный ген начнет функционировать. С помощью различных методов удастся накапливать и выделять мутантов с разного рода дефектами: с нарушением процессов транспорта или использования субстрата, с дефектами промежуточного обмена, с повышенной чувствительностью к температуре и т.д.

Теоретически мутации, вызванные радиацией, химическими веществами или другими факторами, могли бы привести к вымиранию бактериальной популяции, однако в любой живой клетке существуют биохимические механизмы, способные полностью или частично восстанавливать исходную структуру ДНК. Совокупность ферментов, катализирующих реакции коррекции повреждений ДНК, составляют *системы репарации*, которые принципиально различаются по биохимическим механизмам восстановления генома. Известны три основных механизма коррекции дефектов ДНК:

- 1) непосредственная реверсия от поврежденной ДНК к исходной структуре;
- 2) эксцизия («выпадение») повреждений с последующим восстановлением исходной структуры;

3) активация механизмов, обеспечивающих устойчивость к повреждениям.

Реверсия повреждений ДНК. К механизмам прямой реверсии повреждений ДНК относится *световая репарация* или *фотореактивация* (исправление деформации ДНК под действием УФ-лучей). Световая репарация осуществляется несколькими ферментами: фотолиазой (расщепляет тиминный димер и восстанавливает целостность соседних тиминовых оснований), O⁶-метилтрансферазой (удаляет O⁶-метильную группу из остатков гуанина после действия метилирующих агентов), ДНК-пурин инсертазой (осуществляет встраивание утерянного при мутации основания в апуриновый сайт), ДНК-гликозилазой (удаление дефектных оснований). Все эти процессы происходят в один этап под действием конкретного фермента и безошибочно восстанавливают исходную структуру ДНК.

Системы *эксцизионной репарации* удаляют неправильно спаренные или поврежденные основания из ДНК и синтезируют новую последовательность ДНК, замещающую их (рис. 79).

Место повреждения распознает эндонуклеаза, расщепляющая цепь ДНК вблизи дефекта, фрагмент удаляется, а дефект восполняется при помощи ДНК-полимеразы, которая проникает в брешь и встраивает в нее отсутствующие нуклеотиды, используя неповрежденную цепь ДНК в качестве матрицы. ДНК-лигаза ковалентно связывает 3'-конец вновь синтезированного участка ДНК с цепочкой. Поскольку эта система репарации основана на ресинтезе нуклеотидной цепи на базе неповрежденной матрицы, она также является практически безошибочной.

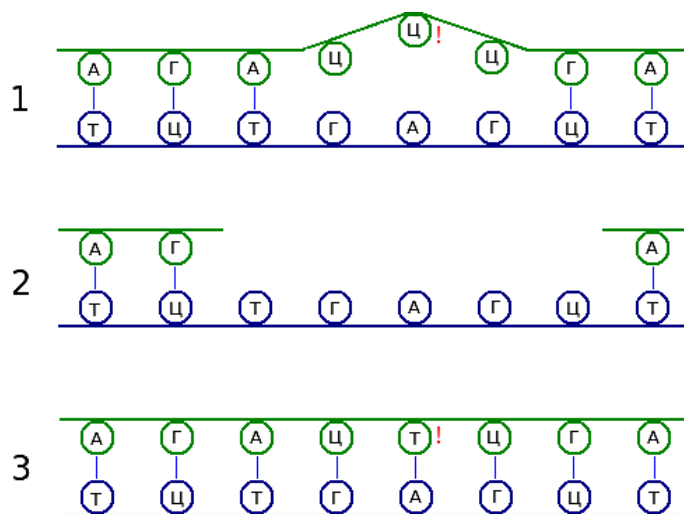


Рис. 79. Схема эксцизионной репарации.

1 – расхождение цепей из-за некомплементарной пары нуклеотидов,
2 – вырезается участок поврежденной ДНК, 3 – брешь застраивается полимеразой

Репарационные механизмы устойчивости к повреждениям ДНК. Кроме механизмов исправления повреждений клетки имеют возможность «обойти»

вызванную повреждениями блокаду репликации ДНК, например, путем репарации в процессе рекомбинации.

Фенотипическая изменчивость бактерий

Временные, наследственно не закрепленные изменения, называются **модификациями**. Модификации также контролируются геномом бактерий, но (в отличие от мутаций) не сопровождаются изменениями кодирующей структуры и быстро утрачиваются. Чаще всего у бактерий отмечаются *морфологические* (приводящие к обратимым изменениям формы) и *биохимические* (проявляются индуцибельным синтезом некоторых продуктов, чаще ферментов) модификации. Модификации возникают как адаптивные реакции бактериальных клеток на изменения окружающей среды, что позволяет им быстро приспособляться и сохранять численность популяции на жизнеспособном уровне. После устранения соответствующего воздействия, вызвавшего их образование, бактерии возвращаются к исходному фенотипу.

Стандартное проявление модификации – разделение однородной популяции на несколько типов. Этот феномен получил название *диссоциация микробов*. Обычно диссоциации возникают в условиях, неблагоприятных для исходной популяции. Примером диссоциации может служить изменение вида и структуры бактериальных колоний на твердых питательных средах. Для обозначения диссоциирующих колоний используют первые буквы английских названий: *S-колонии* (от *англ. smooth* – гладкий); *R-колонии* (от *англ. rough* – шероховатый); *M-колонии* (от *англ. mucoid* – слизистый) и *D-колонии* (от *англ. dwarf* – карликовый). Диссоциации сопровождаются изменениями биохимических, морфологических, антигенных и патогенных свойств возбудителей.

Изменение фенотипа следует считать модификацией, если выполняются три основных условия: 1) определенность (связь изменения фенотипа с определенным фактором); 2) общность изменений в популяции; 3) обратимость (восстановление признака после прекращения действия фактора).

Генетика вирусов

Вирусам, как и всем живым организмам, свойственны наследственность и изменчивость. Основной особенностью вирусного генома является то, что наследственная информация у вирусов может быть записана как на ДНК, так и на РНК. Геном ДНК-содержащих вирусов двухнитевой (исключение составляют парвовирусы, имеющие однонитевую ДНК), несегментированный и проявляет инфекционные свойства. У вирусов, принадлежащих к родам *Rox-virus* и *Herpadnavirus* геном представлен двумя цепочками ДНК разной длины. Геном большинства РНК-содержащих вирусов однонитевой (исключение составляют реовирусы, обладающие двунитевым геномом, а у ретровирусов имеются две одинаковые нити РНК) и может быть сегментированным (пред-

ставители родов Retrovirus, Orthomyxovirus, Arenavirus и Reovirus) или несегментированным.

Вирусные РНК в зависимости от выполняемых функций подразделяются на две группы. К первой группе относятся РНК, способные непосредственно транслировать генетическую информацию на рибосомы чувствительной клетки, т.е. выполнять функции иРНК и мРНК. Их называют *плюс-нити РНК* и обозначают как +РНК (позитивный геном). Они имеют характерные окончания («шапочки») для специфического распознавания рибосом.

У другой группы вирусов РНК не способна транслировать генетическую информацию непосредственно на рибосомы и функционировать как иРНК (*минус РНК*). Такие РНК служат матрицей для образования иРНК, т.е. при репликации первоначально синтезируется матрица (+РНК) для синтеза – РНК. Такой тип РНК определяют, как минус-нить и обозначают –РНК (негативный геном). У вирусов этой группы репликация РНК отличается от транскрипции по длине образующихся молекул: при репликации длина РНК соответствует материнской нити, а при транскрипции образуются укороченные молекулы иРНК. Молекулы +РНК проявляют инфекционность, а –РНК не проявляют инфекционные свойства и для воспроизведения должны транскрибироваться в +РНК. Исключение составляют ретровирусы, которые содержат одонитевую +РНК, служащую матрицей для вирусной РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). При помощи этого фермента информация переписывается с РНК на ДНК, в результате чего образуется ДНК-провирус, интегрирующий в клеточный геном.

Нуклеиновые кислоты вирусов подвержены *мутациям*. Фенотипически мутации вирусного генома проявляются изменениями в антигенной структуре, неспособностью вызывать продуктивную инфекцию в чувствительной клетке, термостабильностью, изменением размера и формы бляшек, образуемых под агаровым покрытием. Большинству мутаций присущи реверсии к дикому типу, причем каждая мутация имеет характерную частоту реверсий, которую можно точно измерить. У вирусов выделяют спонтанные и индуцированные мутации.

Скорость *спонтанного мутагенеза* в ДНК-геномах значительно ниже (10^{-8} – 10^{-11} на каждый включенный нуклеотид), чем у РНК-геномных (10^{-3} – 10^{-4} на каждый включенный нуклеотид). Более высокая частота спонтанных мутаций связана с низкой точностью репликации РНК-геномов, которая вероятно связана с отсутствием у РНК-репликаз корректирующей активности, свойственной ферментам, реплицирующим ДНК. Наиболее часто спонтанные мутации наблюдаются у ретровирусов, что связано с более высокой частотой сбоев в обратной транскрипции, не способных к самокоррекции.

Индукцированные мутации у вирусов возникают при действии различных химических и физических мутагенов, которые подразделяют на действующие *in vivo* и *in vitro*.

Вирусные мутации классифицируют по изменениям *фенотипа* и *генотипа*. По *фенотипическим проявлениям* мутации вирусов разделяют на четыре группы:

1. Мутации, не имеющие фенотипического проявления.
2. Летальные мутации, т.е. полностью нарушающие синтез или функцию жизненно важных белков и приводящие к утрате способности к репродукции.
3. Условно летальные мутации, т.е. мутации связанные с потерей способности синтезировать определенный белок или с нарушением его функции только в определенных условиях.
4. Мутации, имеющие фенотипическое проявление, например, изменение размеров бляшек под агаровым покрытием или термостабильности.

По изменению генотипа мутации подразделяют на *точечные* (локализуемые в индивидуальных генах) и *генные* (затрагивающие более обширные участки генома).

Заражение вирусами чувствительных клеток носит множественный характер, т.е. в клетку проникает сразу несколько вирионов. При этом вирусные геномы в процессе репликации могут кооперироваться или интерферировать. *Кооперативные взаимодействия* между вирусами представлены генетическими рекомбинациями, генетической реактивацией, комплементацией и фенотипическим смешиванием.

Генетическая рекомбинация чаще встречается у ДНК-содержащих вирусов или РНК-содержащих вирусов с фрагментированным геномом (вирус гриппа). При генетической рекомбинации происходит обмен между гомологичными участками вирусных геномов.

Генетическая реактивация наблюдается между геномами родственных вирусов с мутациями в разных генах. При перераспределении генетического материала формируется полноценный геном.

Комплементация происходит, когда один из вирусов, инфицирующих клетку, в результате мутации синтезирует нефункциональный белок. Немутантный вирус, синтезируя полноценный белок, восполняет отсутствие его у мутантного вируса.

Фенотипическое смешивание происходит при смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами, когда часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам, при неизменном генотипе.

При множественном инфицировании чувствительной клетки между вирусами могут возникать и интерферирующие взаимодействия. ***Интерференцией*** вирусов называют состояние невосприимчивости к вторичному заражению клетки, уже инфицированной вирусом. При *гетерологической интерференции* инфицирование одним вирусом полностью блокирует возможность репликации второго вируса в пределах одной клетки. Механизмы гетерологической интерференции связаны с угнетением адсорбции другого вируса путем

блокирования или разрушения специфических рецепторов, а также с ингибированием трансляции мРНК любой гетерологичной мРНК в инфицированной клетке. Кроме того, первичное заражение может индуцировать образование интерферона, ингибирующего репликацию второго вируса.

Гомологическая интерференция, т.е. интерференция между гомологичными вирусами, характерна для многих вирусов, особенно при повторных пассажах *in vitro* и при высокой множественности инфицирования. В таких условиях образуется много *дефектных вирусных частиц*, обычно не способных к репродукции. Однако размножение дефектных вирусов возможно при совместном заражении с полноценным вирусом (вирус-помощник). При этом дефектный вирус может вмешиваться в репликативный цикл вируса-помощника и образовывать дочерние *дефектные интерферирующие (ДИ) вирусные частицы*. ДИ-частицам присущи три основных свойства: дефектность (повреждение в важных генах), способность к интерференции (ДИ-частицы препятствуют репликации полноценного вируса или других гомологичных вирусов) и способность к самообогащению за счет стандартного вируса. Циркуляция ДИ-частиц и коинфекция с полноценным вирусом вызывают вялотекущие, длительные формы инфекции.

Кроме взаимодействий, происходящих между вирусами, при смешанной инфекции происходят также взаимодействие между вирусом и клеткой-хозяином. При взаимодействии клеток с ДНК-содержащими вирусами может происходить *вирусная трансформация клетки*. В результате трансформации у клеток изменяются морфологические, биохимические и ростовые характеристики, может появляться способность к опухолевому росту. Представляет интерес трансформация клеток под действием РНК-геномных ретровирусов. У ретровирусов трансформация и репликация не являются взаимоисключающими, поскольку трансформированные клетки способны реплицировать вирус. Геномы трансформирующих вирусов обычно интегрируют с геномом трансформируемой клетки.

Применение генетических методов в диагностике инфекционных заболеваний

Для диагностики инфекционных заболеваний генетическими методами маркером возбудителя является его геном. Методы индикации нуклеиновых кислот применяют для диагностики вирусных инфекций, для идентификации бактерий (особенно таких, которые трудно выделить) и для определения точного таксономического положения микроорганизмов. Методы позволяют обнаружить микроорганизм в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию ДНК без его выделения в чистую культуру.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) основана на многократном увеличении числа копий (*амплификации*) определенного участка ДНК, катализируемом ферментом ДНК-полимеразой. ПЦР – это очень чувствительный метод,

теоретически для получения результата достаточно наличие в материале одной молекулы ДНК.

ПЦР состоит из трех основных этапов: подготовки исследуемой пробы (изоляция ДНК или РНК), собственно, ПЦР и детекции продукта ПЦР (амплифицированной ДНК). При использовании РНК в качестве матриц для ПЦР предварительно на этой РНК-матрице посредством фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы или ревертазы) синтезируют комплементарную ДНК, которая затем используется в качестве матрицы в ПЦР. После того, как из бактерий *Thermos thermophilis* удалось получить ДНК-полимеразу, которая наряду с полимеразной обладает еще и обратнотранскриптазной активностью, удалось совместить эти две реакции. Этот вариант ПЦР широко применяется для детекции РНК-содержащих вирусов, определения экспрессии вирусных, бактериальных и клеточных генов по их РНК.

Для проведения ПЦР необходимы пять основных компонентов: 1) фермент ДНК-полимераза; 2) пара олигонуклеотидных праймеров; 3) набор нуклеотидов; 4) копируемая ДНК; 5) ионы Mg^{+2} , необходимые для функционирования ДНК-полимеразы. Схема ПЦР приведена на рисунке 80.

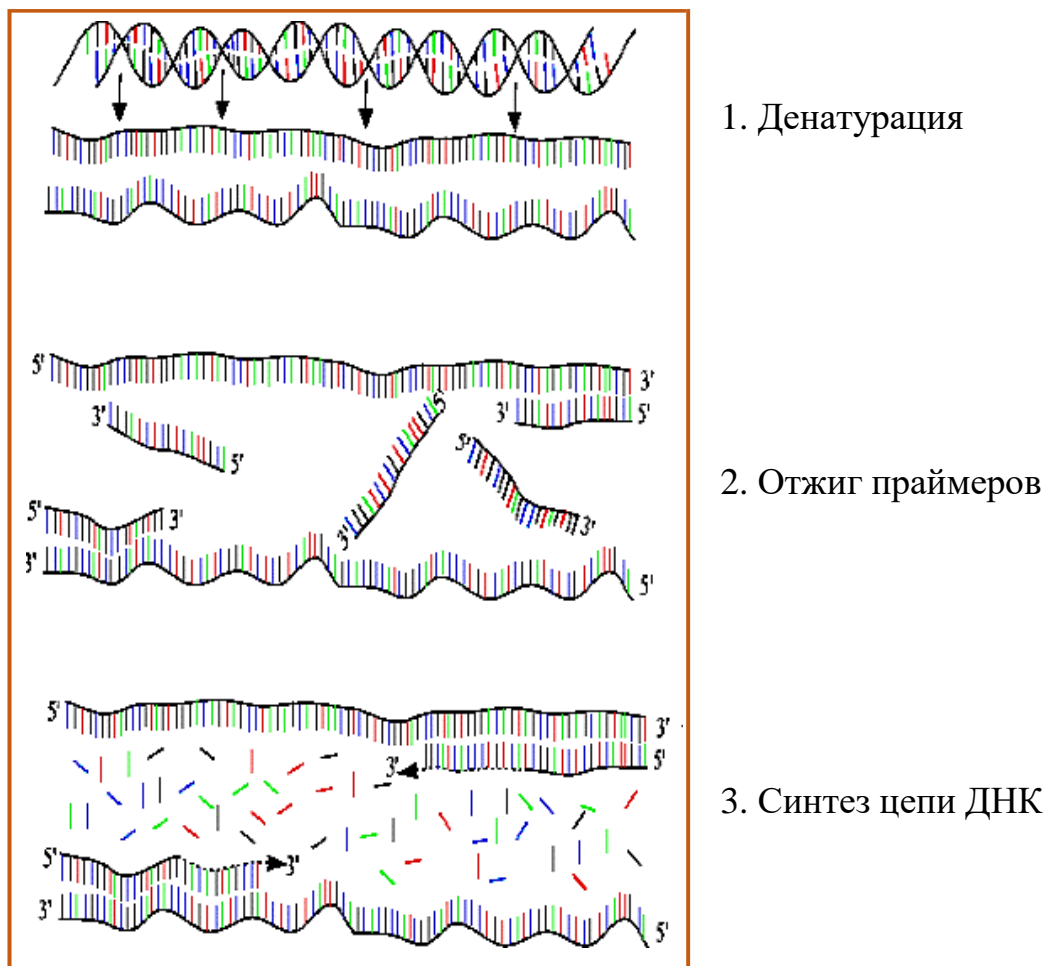


Рис. 80. Схема полимеразной цепной реакции

Для амплификации (то есть синтеза ДНК-матрицы) отбирают наиболее консервативную часть, уникальный ген. Для запуска синтеза на ДНК-матрице используют 2 *праймера* (короткие, длиной 20–30 оснований одноцепочечные фрагменты ДНК), комплементарные 3'-концам ДНК искомого гена. Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают. При этом ДНК распадается на две нити. Добавляют праймеры, затем смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры при наличии в смеси ДНК искомого гена связываются с его комплементарными участками (*отжиг*). Добавляют ДНК-полимеразу и нуклеотиды. При температуре, оптимальной для функционирования ДНК-полимеразы, нуклеотиды присоединяются к 3'-концам праймеров, формируется специфический фрагмент (ампликон). После этого цикл повторяют снова, при этом количество ДНК гена будет увеличиваться каждый раз в 2 раза. Рассчитано, что за 30–40 циклов из одной матрицы можно получить 10^8 ампликонов. Реакцию проводят в специальных приборах – амплификаторах. После 30–80 циклов накопления копий ДНК проводят их идентификацию методом гель-электрофореза и визуализацию в УФ свете после окрашивания этидием бромидом. Для подтверждения принадлежности ДНК возбудителю можно провести ДНК-гибридизацию.

Раздел 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

3.1. Требования к микробиологическому контролю

Лекарственные средства – это продукция, к которой предъявляются высокие требования по безопасности и эффективности в процессе их разработки, испытаний, производства и реализации.

Основные критерии к производству и контролю качества определяются международными «Правилами производства лекарственных средств» – «Good Manufacturing Practice for Medicinal Products (GMP)».

В РФ основополагающим документом, регламентирующим производство лекарственных средств, является национальный стандарт и Государственная фармакопея Российской Федерации, определяющая показатели качества выпускаемых лекарственных субстанций и изготовленных из них препаратов.

Неотъемлемой составляющей системы обеспечения качества являются: контроль санитарно-гигиенического состояния производства, основного и вспомогательного сырья, производственного процесса и готовой продукции, которые проводятся в соответствии с программой производственного контроля.

Значительную часть требований к качеству фармацевтической продукции и к условиям производства контролирует микробиолог: стерильность, микробное обсеменение сырья и нестерильных лекарственных средств, соблюдение правил производственной гигиены, предусмотренных GMP. Микробиологическая лаборатория обеспечивает контроль качества, осуществляя микробиологический мониторинг всех этапах производственного процесса:

- входной контроль сырья;
- контроль хранения и упаковки;
- контроль процесса производства;
- контроль готового продукта (приемо-сдаточный контроль);
- контроль утилизации.

Обязательным пунктом в микробиологическом мониторинге является контроль и оценка микробиологического состояния производственной среды.

Основной микробиологический мониторинг включает отслеживание контаминации:

- воздуха – активным методом (при помощи прибора) и пассивным (седиментационный метод);
- оборудования чистых помещений – метод отпечатков на агаровую среду, метод взятия мазков с поверхности;

- работников – метод отпечатков;
- упаковочного материала;
- химических субстанций, применяемых для производства лекарственных препаратов;
- лекарственного растительного сырья;
- воды очищенной и воды инъекционной;
- готовых лекарственных препаратов.

На асептических производствах также контролируется:

- стерильность первичной упаковки;
- микробиологическая нагрузка инъекционного препарата перед фильтрацией;
- стерильность дезсредств;
- эффективность методов стерилизации;
- описание мер, которые должны быть приняты при превышении лимитов.

При определении стратегии контроля по каждому объекту необходимо выбрать критические точки и параметры контроля, объем испытаний, которые позволили бы обеспечить качество выпускаемой продукции.

Согласно требованиям, все этапы технологического процесса изготовления лекарственных средств (препаратов) проводятся в **чистых помещениях** и подлежат обязательному освидетельствованию на соответствие определенным требованиям.

Чистое помещение – помещение, в котором контролируется концентрация взвешенных в воздухе частиц, построенное и используемое так, чтобы свести к минимуму поступление, выделение и удержание частиц внутри помещения, и позволяющее, по мере необходимости, контролировать другие параметры, например, температуру, влажность и давление.

По степени чистоты помещения делят на **4 класса** (А, В, С, D).

Классом чистоты помещения считают степень чистоты воздуха, которая определяется содержанием в нем взвешенных частиц (пыли, микроорганизмов, аэрозольных частиц) определенного размера в 1 м³ воздуха.

А – локальная зона, в которой проводят асептическое приготовление растворов, розлив стерильных растворов, укупорку флаконов, выгрузку стерильных флаконов, пробок и другие операции, представляющие большой риск для качества продукции и требующие особой чистоты воздуха;

В – зона, которая непосредственно окружает зону А и предназначена для асептического наполнения и приготовления. В помещениях класса В проводятся операции стерильной фильтрации растворов, сушка, фасовка стерильных порошков, выгрузка стерильных флаконов и пробок, выгрузка и хранение стерильной технологической одежды.

С и D – зоны, в которых выполняются менее ответственные стадии изготовления стерильных препаратов. Эти зоны также обеспечиваются стерильной приточной вентиляцией, специальной санитарной подготовкой помещения, и персонала, оборудованием (бактерицидными лампами, рециркуляторами).

В помещениях класса С чистоты проводятся мойка флаконов, пробок, кассет, загрузка их на стерилизацию, предварительная фильтрация растворов, подготовка стерилизующих фильтров.

В помещениях класса D устанавливают аппараты распылительной сушки, проводят приготовление дезинфицирующих растворов, просмотр, этикетирование ампул, упаковку и хранение готовой продукции, к этому класса относят бытовые помещения.

Для создания асептических условий в чистых помещениях используют специальные устройства и оборудование:

- воздушный шлюз – пространство между помещениями различной чистоты предотвращающее проникновение механических частиц и микроорганизмов в соседние помещения;
- коврики для обеспыливания обуви;
- ламинарный бокс;
- бактерицидные облучатели.

Воздушный шлюз – это пространство, в котором создается повышенное давление для предотвращения поступления воздуха извне.

Ламинарный бокс (зона А) – специальное оборудование для создания горизонтальных или вертикальных ламинарных потоков чистого воздуха в отдельных локальных зонах для защиты определенных участков или операций внутри чистых помещений. Поток воздуха поступает от вентилятора через стерилизующий фильтр (рис. 81).

СХЕМА ВОЗДУШНЫХ ПОТОКОВ

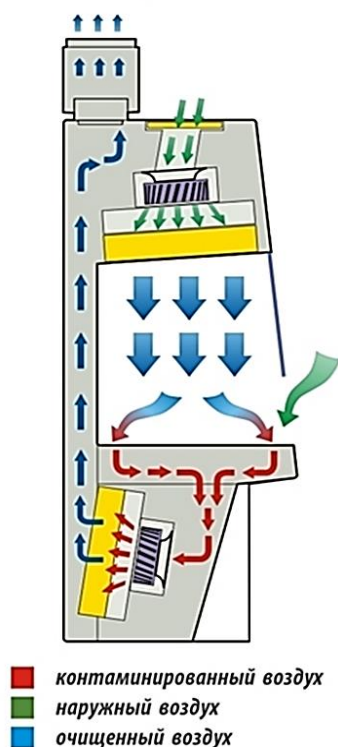


Рис. 81. Схема потока воздуха в ламинарном боксе

Чтобы предотвратить поступление воздуха в асептический блок из других помещений необходима приточно-вытяжная вентиляция, которая обеспечивает движение очищенных воздушных потоков из асептического блока в прилегающие к нему помещения, с преобладанием притока воздуха над вытяжкой. В настоящее время для подготовки воздуха используют системы кондиционирования, которые позволяют подавать воздух и одновременно фильтровать его от пыли и микроорганизмов, поддерживать определенную температуру и влажность. Как правило, через потолок постоянно нагнетают стерильный воздух, прошедший через бактериальный фильтр. В пол вмонтировано устройство, забирающее воздух. Так создаётся постоянное ламинарное (прямолинейное) движение воздуха, препятствующее вихревым потокам, поднимающим пыль и микроорганизмы с нестерильных поверхностей (рис. 82).

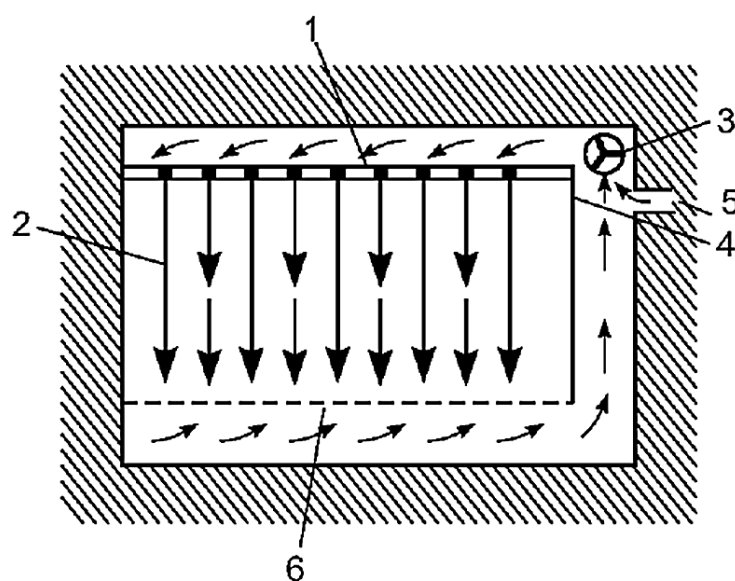


Рис. 82. Ламинарный поток воздуха (схема):

1 – фильтр; 2 – направление тока воздуха; 3 – вентилятор; 4 – разграничитель потоков воздуха; 5 – отверстие для наружного воздуха; 6 – отверстия в полу

3.2. МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЙ И МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ

Согласно требованиям мониторинг состояния окружающей среды, в том числе на фармацевтических предприятиях, должен выявлять не только микробную загрязненность воздуха, но и вероятные пути его загрязнения, обеспечивая при этом возможность принятия превентивных мер.

Цель программы микробиологического мониторинга окружающей среды заключается в выявлении изменений показателя количества колониеобразующих единиц (КОЕ) или выявлении видов микроорганизмов, не укладывающихся в нормативные показатели.

К микроорганизмам, которые наиболее часто могут быть выделены из

воздуха асептического производства, относятся такие бактерии, как стафилококк и разновидности микрококка (грамположительные кокки). Кроме этого, обнаруживаются переносимые по воздуху бактериальные (например, виды *Bacillus*) и грибковые (например, виды *Aspergillus* или *Penicillium*) споры, реже – грамотрицательные кокки (например, виды *Enterobacter*).

Существует два основных метода забора проб воздуха для определения микробного загрязнения: активный и пассивный.

Активный отбор проб воздуха рассматривается как количественный метод, поскольку позволяет определить количество жизнеспособных микроорганизмов в определенном объеме воздуха (например, выраженное в КОЕ/м³). Возможны различные способы активного отбора проб воздуха, включая использование фильтрующих и центрифужных импакторов, щелевого пробоотборника с агаром, вакуумных проб с различных поверхностей, метода фильтрации или жидкостных импинджеров, а также ручных пробоотборников.

В щелевом пробоотборнике чашка с агаром устанавливается на вращающийся стенд под воздухозаборником с четырьмя перпендикулярными щелями в нем. Воздух втягивается через эти щели насосом. При этом воздух со всеми содержащимися в нем частицами контактирует с поверхностью агара во вращающейся чашке.

Пассивный отбор проб воздуха осуществляется посредством расположения чашек Петри с питательным агаром в исследуемых зонах для экспонирования поверхности агара в течение установленного времени (табл. 8).

Таблица 8

Преимущества и ограничения в применении седиментационного метода

Преимущества	Ограничения
Простота использования	Отбор только быстро оседающих больших частиц
Не требует процесса посева	Влияние температуры на эффективность сбора
Различные типы питательной среды могут быть использованы для проращивания плесени, грибов, всего спектра микроорганизмов или отдельного вида	Сильное влияние скорости и направления воздушного потока по отношению к поверхности среды на результаты теста
Очень экономичен	Неопределенность объема отобранной пробы

В 1981 г. Ассоциация производителей препаратов для парентерального введения (PDA) рекомендовала только 30-минутную экспозицию, однако позднее другие руководства советовали увеличить ее продолжительность до 4 ч. Смысл последнего предложения заключается в том, что большая продолжительность экспозиции повышает чувствительность метода.

Ключевыми точками для отбора проб при текущем мониторинге являются:

- зоны наиболее высокой вероятности контаминации продукта;
- зоны наибольшего риска скопления микроорганизмов при нормальном рабочем процессе (накопление пыли на поверхностях с электростатическими свойствами, более холодных поверхностях; дверные ручки и т.д.);
- труднодоступные зоны для уборки и дезинфекции;
- точки смежных зон А, В (100);
- потенциальные источники контаминации;
- зоны возмущения воздушного потока.

Частота отбора проб зависит от установленного класса чистоты для данного помещения и от вида обработки, которой подвергается продукт далее в процессе его производства.

Зоны класса А должны проверяться каждую рабочую смену, зоны класса В также могут проверяться каждую смену или ежедневно, в то время как вспомогательные зоны могут проверяться с меньшей периодичностью, например, зоны класса С – два раза в неделю, зоны класса D – еженедельно.

Для сравнительного анализа состояний производственной среды, отбор проб должен проводиться в одно и то же, фиксированное в плане время, т.е. приходится на равнозначную по интенсивности технологического процесса временную точку.

Таблица 9

Рекомендуемые предельные значения допустимого микробного загрязнения чистых зон в эксплуатируемом состоянии

Зона	Рекомендуемые предельные значения микробного загрязнения*			
	В воздухе, КОЕ/м	Седиментация на чашку диаметром 90 мм, КОЕ за 4 ч**	Контактные пластины диаметром 55 мм, КОЕ/пластина	Отпечаток перчатки (5 пальцев), КОЕ/перчатка
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Примечание: * Указаны средние значения. ** Допускается экспонирование отдельных седиментационных пластин менее 4 ч.

3.3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЯХ

Основной целью программы оценки микробиологического состояния производственной среды является постоянная гарантия стабильности асептических условий производства лекарственных препаратов, выявление начальных отклонений и выработка корректирующих действий до возникновения ситуаций, приводящих к появлению нестерильной продукции.

Поэтому необходим качественный и количественный контроль асептических условий (класса чистоты рабочих зон).

Программа микробиологического мониторинга окружающей среды наряду с исследованием бактериальной контаминации воздуха должна охватывать и оценку бактериальной загрязненности критических поверхностей, рук и одежды персонала, работающего на фармацевтическом производстве. Критическими поверхностями являются поверхности, непосредственно контактирующие со стерильным материалом.

Объекты микробиологического мониторинга:

- технологическое оборудование;
- рабочие поверхности столов;
- поверхности шкафов;
- передаточные шлюзы;
- руки персонала в перчатках;
- одежда персонала;
- контейнеры, в которых хранится продукт.

Частота отбора проб зависит от класса чистоты помещения: – зоны класса А – каждую рабочую смену – зоны класса В – каждую смену или ежедневно – зоны класса С – 2 раза в неделю – зоны класса D – еженедельно.

Перечисленные ниже (табл. 10) точки отбора проб выбираются каждым предприятием индивидуально, с учетом конкретных производственных условий.

Таблица 10

Примеры точек отбора проб, которые могут считаться наиболее существенными

Система	Точка отбора пробы
Вода	Кран водопользования или наполнительной емкости
Поверхность (помещение)	Рабочий стол
Поверхность (оборудование)	Поверхности, контактирующие с продуктом
Оператор линии розлива	Руки в перчатках
Технологический персонал	Халаты, бахилы, шлемы

Для сравнительного анализа состояний производственной среды, отбор проб должен проводиться в одно и то же, фиксированное в плане время, т.е. приходится на равнозначную по интенсивности технологического процесса временную точку.

Следующие временные точки (табл. 11) для отбора проб являются обязательными.

Временные точки для отбора проб

Контроль элементов среды	Время
Технологическая одежда	До начала или после окончания работы
Поверхности	Перед работой
Руки оператора	Перед выполнением асептических манипуляций

Дополнительно, могут проводиться исследования по окончании работы для оценки бактериальной нагрузки за рабочую смену.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ОБОРУДОВАНИЯ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

Контроль микробной контаминации поверхностей: может проводится методом смыва и контактных пластинок.

Контактные чашки применяют для взятия проб с плоских поверхностей оборудования, ограждающих конструкций, рабочих столешниц и т.п. Эти специально разработанные чашки с агаром имеют куполообразную поверхность, которую осторожно прижимают к поверхности для переноса с нее искомых микроорганизмов на поверхность агара. Этот метод считается количественным, поскольку он позволяет подсчитать число жизнеспособных микроорганизмов на определенной площади поверхности.

Для взятия проб с нелинейных или труднодоступных поверхностей прибегают к помощи тампонов. Забор пробы с площади исследуемой поверхности осуществляют увлажненным тампоном. Затем этот тампон может быть использован для непосредственной инокуляции чашки Петри со средой или для погружения в растворитель или транспортную среду, которые затем используются для посева на чашку Петри.

1. Метод смыва с поверхностей: смывы с поверхностей проводят стерильным ватным тампоном, укрепленном на стеклянном или металлическом держателе, вмонтированном в ватно-марлевую пробку пробирки. В пробирке должно содержаться приблизительно 2 мл стерильной воды для инъекций. Увлажненным тампоном протирают исследуемую поверхность. Исследуемая поверхность крупного оборудования соответствует 100 см², с мелкого оборудования берут смыв со всей площади. Репрезентативной считается проба, снятая с поверхности площадью от 24 до 30 см². После взятия пробы тампоном проводят несколько раз по поверхности питательной среды в двух параллельных чашках Петри со средой для бактерий (питательный агар) и со средой для грибов среда Сабуро). Чашки инкубируют, после чего проводят подсчет колоний на двух параллельных чашках и определяют среднее арифметическое.

2. Метод контактных пластин: контактные пластины – агаризованная питательная среда, разлитая на специальные пластины или в чашки Петри таким

образом, чтобы поверхность агара выступала над краем чашки Петри. Стерильная поверхность питательной среды накладывается на исследуемую поверхность. После инкубации в соответствии со сроками и температурой для используемых сред проводят подсчет колоний и микроскопируют окрашенные по Граму мазки. Метод контактных пластин подходит для тестирования гладких и ровных поверхностей (рабочий стол, стены, пол или одежда персонала).

В чистых помещениях исследуемые объекты не должны содержать микроорганизмов.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ОДЕЖДЫ И РУК ПЕРСОНАЛА

Поверхность рук является потенциальным источником загрязнения, поэтому следует периодически осуществлять исследование рабочих перчаток, которое проводится путем прижатия всех пальцев рук, включая большие, к поверхности агара в чашке Петри; после этого перчатки заменяются чистым комплектом. В конце смены может быть протестирована и рабочая одежда с использованием контактных чашек или тампонов.

Для определения микробной контаминации перчаток персонала отпечатки пяти пальцев каждой руки (в перчатках) делают на поверхность плотной питательной среды для бактерий и для грибов (параллельно). Чтобы касание было полным, рекомендуется сделать скользящее движение пальцами по всей поверхности агара. Чашки инкубируют и проводят подсчет выросших колоний микроорганизмов.

Определение микробной контаминация одежды персонала обычно проводят на предплечьях комбинезона с помощью контактных пластин. Также проверяются бахилы. Можно применять метод смыва тампоном. Для этого делают смывы увлажненным тампоном с 4 участков площадью по 25 см² каждый на нижней части двух рукавов, верхней передней поверхности комбинезона (халата) и шлеме. Чашки инкубируют и проводят подсчет выросших колоний микроорганизмов. В посевах перчаток и технологической одежды персонала, работающего в чистых помещениях микроорганизмов не должно быть.

Все выявленные в процессе проведения мониторинга микроорганизмы подлежат обязательной макроскопической и микроскопической идентификации. Идентификация дает возможность предположить источник контаминации, основываясь на преимущественном распространении микроорганизмов во внешней среде. При обнаружении споровых бактерий или грибов необходимо проводить дополнительную дезинфекцию помещений. При наличии на месте всех элементов программы надлежащего контроля за состоянием окружающей среды производитель может быть уверен в соблюдении требований, предъявляемых к асептическому технологическому процессу.

К питательным средам, наиболее часто используемым в процессе мони-

торинга окружающей среды, относятся триптоново-соевый агар (TSA) – универсальная среда, пригодная для культивирования широкого спектра микроорганизмов, а также декстрозный агар Сабуро (SDA) – идеальная среда для роста дрожжей и плесневых грибов. Другие используемые ключевые питательные среды включают: агар R2A; агар Мак-Конки (для бактерий группы кишечной палочки); агар XLD (для сальмонелл); цетримидный агар (для *Pseudomonas aeruginosa*); солевой агар с маннитом (для стафилококков); агар DCA (для кишечной флоры); агар Байрд-Паркера (для *Staphylococcus aureus*).

3.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОДЫ ОЧИЩЕННОЙ И ВОДЫ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ

Вода является одним из основных продуктов, используемых фармацевтической промышленностью. Она может использоваться в качестве вспомогательного вещества при производстве лекарственных препаратов, для промывки оборудования, материалов первичной упаковки.

Основными потенциальными источниками микробного загрязнения воды для фармацевтических целей является источник воды и используемое оборудование. Другим источником бактериального загрязнения является система хранения и распределения. При неправильно спроектированной системе и отсутствии периодической санитарной обработки трубопроводов и накопительных емкостей может происходить увеличение количества микроорганизмов, что является причиной контаминации следующего далее оборудования водоподготовки.

В зависимости от целей применения в фармации требуется вода различных уровней качества: вода очищенная, вода для инъекций.

Вода очищенная используется для:

- изготовления неинъекционных лекарственных средств;
- получения пара;
- санитарной обработки;
- мытья посуды (за исключением финишного ополаскивания);
- в лабораторной практике.

Для получения воды очищенной регламентированы следующие методы получения: дистилляция, ионный обмен, обратный осмос, ультрафильтрация.

Обработку аппаратов для получения воды очищенной проводят горячим паром в течение 20–30 мин, а первые порции воды, полученной в течение 15–20 мин, сливают. Для обеззараживания трубопроводов используют острый пар из автоклава. Получение и хранение воды очищенной должно производиться в специально оборудованном для этой цели помещении. Воду используют свежеприготовленной или хранят в закрытых емкостях из материалов, не изменяющих ее свойства и защищающих от микробиологических загрязнений не более 3 сут.

Вода для инъекций используется для:

- приготовления стерильных лекарственных средств;
- финишного ополаскивания материалов первичной упаковки.

В производстве воды для инъекций вода очищенная является исходной. Для получения воды для инъекций используют следующие методы: дистилляция, обратный осмос.

Соответственно этому, вода для инъекций должна удовлетворять всем требованиям к качеству воды очищенной, а также быть апирогенной.

Основными санитарно-показательными микроорганизмами для воды являются сапрофитные бактерии, указывающие на поступление в воду органических веществ, бактерии – обитатели кишечника человека и теплокровных животных, такие как *E. coli* и *P. aeruginosa*, *S. aureus*. Размножение сапрофитной микрофлоры в системе предварительной подготовки воды для фармацевтических целей может явиться причиной ее вторичного загрязнения. При этом увеличение количества сапрофитов создает дополнительные условия для накопления индикаторных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в воде. Особое значение это имеет при ежедневном контроле воды в одной и той же точке. Возрастание количества общего микробного числа является сигналом для поиска причины загрязнения.

Для исследования воды на микробиологическую чистоту исследуют общее микробное число бактерий (общее количество микроорганизмов в 1 мл воды), что является косвенным показателем, так как характеризует общее содержание микроорганизмов в воде без их качественной характеристики, а также микроорганизмы *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

Для достоверности результатов пробу воды целесообразно отбирать непосредственно из пробоотборного крана (пробоотборника) без полимерных (силиконовых и пр.) шлангов и насадок. Первоначально место отбора (кран или место подсоединения шланга) с помощью распылителя обрабатывают 70% этиловым спиртом, в некоторых случаях (пробоотборник из нержавеющей стали) используют фламбирование с помощью спиртовки. Сливают воду до 10 л воды при полностью открытом кране. Затем отбирают пробу для микробиологического испытания в стерильную емкость в количестве не менее 1 л.

Для определения общего числа аэробных бактерий образец тестируемой воды тщательно перемешивают и вносят по 1 мл в две стерильные чашки Петри. В каждую добавляют по 8–10 мл расплавленной и охлажденной до 45 °С питательного агара. Содержимое чашек быстро перемешивают и оставляют до застывания. После застывания чашки переворачивают и инкубируют в течение 24 ч при температуре $32,5 \pm 2,5$ °С. Подсчитывают все выросшие колонии. Результат выражают средним числом КОЕ в 1 мл исследуемой пробы воды.

Для определения колиформных бактерий проводят мембранную фильтра-

цию, используя стерильные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Для получения достоверных результатов проводят 3-кратную мембранную фильтрацию по 100 мл воды. После чего фильтры переносят на заранее разлитый по чашкам Петри агар Эндо. Если анализируемая вода стабильно соответствует нормативам, допустима фильтрация 300 мл воды через один фильтр.

Результат считается отрицательным, если на фильтрах не выросли колонии или колонии имеют нетипичный вид (неровные края, шероховатая поверхность) для *E. coli*. Если отмечается рост колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском, с красным центром, выпуклых, блестящих, подсчитывают число колоний каждого типа и проводят идентификацию. Для этого каждую колонию микроскопируют и при выявлении граммотрицательных палочек отсевают на скошенный агар для получения чистой культуры. В качестве подтверждающих тестов используют оксидазный тест, образование кислоты и газа при ферментации глюкозы.

Таким образом, полученные граммотрицательные палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, ферментирующие глюкозу и редуцирующие нитраты, относятся к общим колиформным бактериям и их наличие в питьевой воде недопустимо.

Для выделения синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) проводят 3-х кратную мембранную фильтрацию по 100 мл очищенной воды, после чего фильтры переносят на заранее разлитую в чашки Петри на цетримидный агар. Если анализируемая вода стабильно соответствует нормативам, то допустима фильтрация 300 мл воды через один фильтр. Для положительного контроля среды используют посев тест-микроорганизмов *P. aeruginosa* ATCC 9027 на цетримидный агар. Чашки Петри с фильтрами инкубируют в течение 72 ч при температуре $32,5 \pm 2,5$ °C.

Результат считается отрицательным, если на фильтрах вообще не выросли колонии или колонии имеют нетипичный вид. Если отмечается рост зеленоватых, голубо-зеленых, флюоресцирующих колоний, их идентифицируют. В качестве подтверждающих тестов используют окраску по Граму, цитохромоксидазную реакцию и рост при 42 °C в течение 48–72 ч.

Выделенные микроорганизмы относятся к *P. aeruginosa* при наличии сине-зеленого пигмента-пиоцинина, граммотрицательной окраске, положительной цитохромоксидазной реакции и росте на питательной среде при 42 °C в течение 48–72 ч.

Для определения в воде *S. aureus* проводят мембранную фильтрацию, используя стерильные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Для получения достоверных результатов проводят 3-кратную мембранную фильтрацию по 100 мл воды. Фильтры помещают на желточно-солевой агар и инкубируют при температуре $32,5 \pm 2,5$ °C в течение 24 ч. Подсчитывают блестящие выпуклые колонии белого, палевого, золотистого цвета, окруженные радужной с перламутровым блеском зоной.

При необходимости подтвердить принадлежность таких бактерий к *Staphylococcus aureus* подозрительные колонии пересевают на желточно-солевой агар, микроскопируют, определяют плазмокоагулазную активность. При наличии мелких грамположительных кокков, располагающихся в виде гроздей, и коагулировании плазмы дают положительный ответ.

Определение эндотоксинов и пирогенов. Источниками бактериальных эндотоксинов и пирогенов на производстве лекарственных средств являются многие факторы, в том числе, и вода. Поэтому особое внимание уделяется проверке отсутствия эндотоксинов и пирогенов в воде на разных этапах ее получения. На фармацевтических производствах устанавливают содержание эндотоксинов и пирогенов в воде для инъекций, используемой для производства парентеральных препаратов, и в воде очищенной, используемой в производстве субстанций для последующего приготовления парентеральных препаратов.

Существует два основных метода определения эндотоксинов:

1. Определение пирогенности на кроликах – установление всех пирогенов (см. главу 8).
2. ЛАЛ тест (*Limulus Amebocyte Lysate Test*) – устанавливает эндотоксины (см. главу 8).

В воде очищенной допускается не более 100 КОЕ микроорганизмов в 1 мл при отсутствии *E. coli* и *P. aeruginosa*, *S. aureus*, эндотоксинов менее 0,25 ЕЭ/мл.

В воде для инъекций допускается не более 10 КОЕ в 100 мл, *E. coli* и *P. aeruginosa*, *S. aureus* не должно быть, эндотоксинов менее 0,25 ЕЭ/мл. Вода для инъекций должна быть апиrogenной.

3.5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ОСОБЕННОСТИ КОНТРОЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Во избежание неправильной оценки полученных результатов микробиологического контроля лекарственных препаратов необходимо определить возможность проявления лекарственным средством антимикробного действия в отношении определенных видов микроорганизмов.

В основе метода определения антимикробного действия лежит сравнение интенсивности роста тест-штаммов микроорганизмов в присутствии и без испытуемого препарата.

Приготовление инокулята. 24-часовые бульонные культуры бактерий, выращенные на соево-казеиновом бульоне, и 24–48-часовую культуру *C. albicans*, выращенную на жидкой среде Сабуро (соево-казеиновом бульоне), раз-

водят стерильным 0,9% раствором натрия хлорида 1:1000 (*B. cereus*, *C. albicans*) и 1:100000 (*E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) до концентрации около 10^4 КОЕ/мл.

Взвесь спор *B. subtilis* также разводят до концентрации 10^4 КОЕ в 1 мл. Культуру *A. brasiliensis* со скошенного агара Сабуро с глюкозой смывают 0,9% раствором натрия хлорида с 0,05% раствором твина-80. Определяют количество конидий в 1 мл смыва, используя камеру Горяева или чашечный агаровый метод, и разводят до концентрации 10^4 конидий в 1 мл.

Подготовка образца для определения антимикробного действия. К образцу ЛС добавляют подходящий разбавитель для получения разведения 1:10. В качестве разбавителя используют, как правило, фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном (рН 7,0), нейтрализующую жидкость или буферный раствор, содержащий не более 5% твина-80.

Для разведения препаратов с известным антимикробным действием используют нейтрализующую жидкость. Из разведения 1:10 готовят последовательные разведения 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 и т.д.

Методы определения антимикробного действия. Испытание на наличие антимикробного действия проводят одним из описанных ниже методов.

1. Каждое разведение испытуемого препарата в количестве 1 мл вносят в 6 чашек Петри диаметром 90 мм, в 2 из которых прибавляют по 0,2 мл взвеси *B. cereus* (или спор *B. subtilis*), в 2 другие – по 0,2 мл рабочей взвеси культуры *C. albicans*, в 2 последние – 0,2 мл взвеси конидий *A. brasiliensis*. Чашки с бактериями заливают 10–15 мл расплавленного и охлажденного до $42,5 \pm 2,5$ °C соево-казеинового агара, чашки с культурами грибов – тем же количеством агара Сабуро.

2. По 1 мл каждого разведения препарата вносят в пробирки с 10 мл жидких сред – бульона Мосселя и соево-казеинового бульона. Затем по 1 мл взвеси тест-штаммов *E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* (каждый штамм отдельно) вносят в пробирку со средой, соответствующей потребностям микроорганизма. В контрольные чашки и пробирки вместо разведений препарата вносят такое же количество растворителя. Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение 48 ч для бактерий и 5 сут – для грибов.

Учет и интерпретация результатов. После окончания времени инкубации просматривают посевы и отмечают появление типичного роста тест-микроорганизмов в контрольных чашках и пробирках (без препарата) и испытуемых (с различными разведениями препарата). В случаях, затрудняющих учет результатов (помутнение или изменение окраски жидкой среды в результате взаимодействия ЛС с питательной средой), делают пересевы на агаризованные среды.

При наличии роста *E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* на питательных средах делают вывод об отсутствии антимикробного действия исследуемого препарата.

Если на средах с препаратом наблюдают уменьшение количества колоний на чашках или отсутствие роста тест-микроорганизмов, делают заключение о наличии у него антимикробного действия. Первое из последовательных разведений препарата, в котором отсутствует антимикробное действие, используют для посева на соответствующую питательную среду.

Для устранения антимикробного действия ЛС рекомендованы следующие методы:

- увеличение разведения препарата за счет большего объема разбавителя или питательной среды в пределах норм допустимой микробной загрязненности (в качестве разбавителя вместо стандартного фосфатного буферного раствора используют нейтрализующую жидкость лабораторного или промышленного изготовления);

- применение специфических инактиваторов (например, использование β -лактамазы для некоторых β -лактамных антибиотиков и *пара*-аминобензойной кислоты (ПАБК) – для сульфаниламидных препаратов), нейтрализующих антимикробное действие препарата, но не угнетающих рост микроорганизмов, контаминирующих ЛС;

- использование неспецифических инактиваторов для препаратов с консервантами.

- для препаратов, растворимых в воде или в изопропилмиристате (ИПМ), применяется метод мембранной фильтрации с последующим промыванием фильтров.

Инактивация некоторых антибиотиков. Для инактивации пенициллинов и цефалоспоринов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды перед их использованием асептически вносят стерильный раствор β -лактамазы в количестве, указанном в нормативных документах.

Инактивация сульфаниламидных препаратов. Для инактивации сульфаниламидных препаратов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды, если необходимо, до стерилизации вносят ПАБК из расчета 0,05 г/л среды в случае, если антимикробное действие не удастся устранить путем разведения.

Инактивация консервантов, входящих в состав ЛС. Для инактивации консервантов, входящих в состав ряда лекарственных препаратов, в буферный раствор, в котором эмульгируют образец, а также в питательные среды до стерилизации вносят следующие неспецифические инактиваторы: 3% твина-80 или 0,3% лецитина (яичного или соевого) от объема среды.

После устранения антимикробного действия проводят микробиологический контроль лекарственного препарата.

КОНТРОЛЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Согласно ГФ испытание на стерильность проводят в асептических условиях в ламинарных боксах или чистых помещениях класса А. Меры, предотвращающие контаминацию, не должны оказывать губительного влияния на микроорганизмы, которые могут содержаться в испытуемых образцах иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП). Существует два основных метода испытания на стерильность: метод прямого посева и метод мембранной фильтрации. Метод мембранной фильтрации используют во всех случаях, когда природа препарата, его физико-химические свойства позволяют фильтровать его через мембранные фильтры. Метод прямого посева используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием или антимикробное действие которых можно устранить разведением или инактивированием, а также для препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

Отбор образцов для испытания. **При проведении испытания на стерильность число контролируемых первичных упаковок определяется с учетом общего количества единиц в серии, что регламентируется ГФ.**

Метод мембранной фильтрации. Испытание выполняют с использованием фильтрационных установок открытого или закрытого типа, позволяющих в асептических условиях переносить и фильтровать испытуемый препарат через мембранные фильтры (внешний диаметр 47 мм; диаметр пор 0,45 мкм), способные улавливать микроорганизмы. Фильтрационная установка открытого типа должна быть смонтирована таким образом, чтобы испытуемый образец можно было внести и профильтровать в условиях асептики. После окончания фильтрации мембрану асептически переносят в питательную среду. При использовании закрытой стерильной системы с мембраной, смонтированной в канистру, после фильтрации питательную среду вносят непосредственно в канистру на мембрану. Фильтры из нитратцеллюлозы используют для водных, масляных и слабых спиртовых растворов, фильтры из ацетатцеллюлозы – для концентрированных спиртовых растворов и кислот. Гидрофобный край фильтра и низкая сорбционная способность обеспечивают эффективную отмывку мембраны и сводят к минимуму адсорбцию препарата, обладающего антимикробным действием.

Если испытуемый препарат не обладает антимикробным действием, в ходе испытания возможно исключить процедуру промывания фильтров.

Промывку мембранных фильтров можно проводить любым стерильным раствором, не подавляющим рост микроорганизмов, использованным при определении антимикробного действия препарата, например, 0,9% раствор натрия хлорида (рН 7,0±0,2).

Метод прямого посева. Метод прямого посева используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием, или тех

препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

В том случае, если препарат обладает антимикробным действием в условиях испытания, его нейтрализуют путем добавления подходящих инактиваторов или увеличивая объем питательной среды. Добавляемый инактиватор в заданной концентрации не должен подавлять рост тест-штаммов. При необходимости инактиватор можно добавлять и в питательную среду.

Испытуемые образцы засевают непосредственно в питательные среды в соотношении 1:10 или 1:20. Соотношение количества испытуемого материала и используемой питательной среды должно быть определено при проверке антимикробного действия препарата.

Для ИЛП, вызывающих помутнение питательной среды (препараты, содержащие сорбент, микробные клетки и др.), когда визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов или возникают сомнения при учете результатов, посев производят по указанной выше схеме, а на 5–7 сут производят пересев на свежую питательную среду. Все посевы выдерживают при адекватной температуре до окончания инкубации (14 сут со дня первичного посева).

Условия инкубации посевов. Посевы инкубируют не менее 14 сут при температуре $32,5 \pm 2,5$ °C в жидкой тиогликолевой среде и при температуре $22,5 \pm 2,5$ °C в жидких соево-казеиновой среде или среде Сабуро (независимо от метода посева).

Учет и интерпретация результатов испытания. Во время инкубации периодически просматривают посевы. Наличие роста микроорганизмов определяют визуально в проходящем свете. Если испытуемое ЛС вызывает помутнение питательной среды и визуально нельзя определить наличие или отсутствие микробного роста, через 14 сут после начала испытания переносят не менее 1 мл помутневшей среды в пробирки с аналогичной стерильной средой. Инкубируют исходные и повторные посевы. Общее время инкубации должно составлять не менее, чем 14 сут. от начала испытания.

Результаты испытания на стерильность могут быть признаны недостоверными в случае, если выполняется одно или несколько условий, приведенных ниже:

- получены неудовлетворительные результаты микробиологического контроля окружающей среды (воздушной среды, поверхностей и рук персонала и др.) при проведении испытания на стерильность;
- выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания;
- обнаружен рост микроорганизмов в отрицательном контроле (контроль стерильного растворителя/разбавителя или питательной среды);
- питательная среда нестерильна и/или её ростовые свойства неудовлетворительны;
- выявлены ошибки в ходе процесса стерилизации материалов.

Если результаты испытания признаны недостоверными (в случае обнаружения ошибок в ходе анализа), тест повторяют на том же количестве образцов, что и первоначально. Если в результате повторного испытания не обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат соответствует требованиям испытания на стерильность. Если в результате повторного испытания обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность. Если в ходе расследования доказана правильность выполнения теста на стерильность, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОГЕННОСТИ В СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ВОДЕ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ

Пирогенные вещества (ПВ) – это продукты жизнедеятельности и распада микроорганизмов, токсины, погибшие микробные клетки, которые вызывают лихорадочное состояние организма при внутрисосудистом введении.

Впервые в 1865 г. Бильрот обнаружил повышение температуры у собак при парентеральном введении дистиллированной воды. В 1876 г. появился термин «пироген» применительно к веществам, выделенным из гниющего мяса. В 1923 г. Ф.Б. Сайберт выделил ПВ из растворов, установил их термостабильность и первым обосновал использование кроликов для изучения пирогенной реакции.

По происхождению пирогены подразделяют на экзогенные (инфекционной и неинфекционной природы) и эндогенные (клеточно-тканевые).

По химическому составу ПВ представляют собой липополисахаридные или липополисахаридно-протеиновые комплексы наружных мембран грамотрицательных бактерий, так называемые *бактериальные эндотоксины*.

Пирогены – термостабильные вещества, они разрушаются только при нагревании в суховоздушных стерилизаторах при температуре 250 °С в течение 30 мин. При воздействии пара под давлением (t 120 °С автоклавированием) в растворах ПВ разрушаются только через 5 ч. Следовательно, освободиться от пирогенов в воде и инъекционных растворах при помощи термической стерилизации практически невозможно. Предупреждение образования пирогенов сводится к соблюдению асептических условий при изготовлении лекарственных препаратов, а также к использованию апиrogenных лекарственных веществ.

Согласно ГФ, испытание пирогенности проводят на здоровых кроликах одного пола массой 2–3,5 кг и имеющих исходную ректальную температуру 38,5–39,5 °С. Каждый кролик должен содержаться в отдельной клетке на полноценном пищевом рационе. В помещениях, где находятся животные, поддерживают постоянную температуру воздуха. В течение недели до опыта кролики не должны терять в массе. За 18 ч до испытания животных лишают корма без

ограничения в воде. Во время опыта кролики не получают ни корма, ни воды.

Ректальную температуру у кроликов измеряют с точностью до $0,1^{\circ}\text{C}$ медицинским ртутным или электронным термометром с термочувствительным датчиком. Термометр или датчик вводят в прямую кишку на глубину 5–7,5 см за внутренний сфинктер. Перед введением опытных растворов, у каждого кролика дважды (с интервалом не менее 30 мин) измеряют температуру тела. В случаях изменения температуры у кроликов более чем на $+0,2^{\circ}\text{C}$ животных исключают из опыта. За исходную температуру принимают величину последнего результата измерения.

В случае отсутствия указаний в частной Фармакопейной статье для определения пирогенности отбирают от серии до 1000 единиц – 1 флакон или ампулу, от 1000 до 10000 штук и свыше – 2 и 3 единицы препарата соответственно.

Для разведения испытуемых лекарственных средств, если растворитель не указан в фармакопейной статье, используют 0,9% раствор натрия хлорида для инъекций. Подогретые до 37°C испытуемые растворы вводят в ушную вену (если в фармакопейной статье не указан другой путь введения) 3 кроликам в объемах, предусмотренных соответствующими частными статьями. Лекарственное средство считают апиrogenным, если у 1 из 3 кроликов наблюдалось повышение температуры не более чем на $0,5^{\circ}\text{C}$, а сумма повышения температуры у 3 кроликов меньше или равна $1,2^{\circ}\text{C}$. В противном случае, введение испытуемых растворов проводят повторно. Препарат считается апиrogenным, если сумма повышений температуры у всех 6 кроликов меньше или равна $2,8^{\circ}\text{C}$. Если сумма повышения температуры больше $2,8$, но меньше $4,3^{\circ}\text{C}$ или более, чем у 1 животного зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше $0,5^{\circ}\text{C}$, то введение испытуемых растворов проводят повторно. Лекарственное средство считается апиrogenным, если полученный результат меньше или равен $4,5^{\circ}\text{C}$, а индивидуальное повышение температуры свыше $0,5^{\circ}\text{C}$ отмечено не более, чем у 2 из 9 кроликов. Если сумма повышения температуры больше $4,5$, но меньше $6,0^{\circ}\text{C}$ или зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше $0,5^{\circ}\text{C}$ более, чем у 2 животных, введение испытуемых растворов продолжают. Лекарственное средство признают апиrogenным, если полученный результат меньше или равен $6,6^{\circ}\text{C}$, а индивидуальное повышение температуры свыше $0,5^{\circ}\text{C}$ отмечено не более, чем у 3 из 12 кроликов.

Данный метод имеет ряд существенных недостатков: необходимость содержать большое количество экспериментальных животных в строго регламентированных условиях, значительные колебания чувствительности кроликов к пирогенам, отсутствие количественной характеристики пирогенной реакции, высокая стоимость анализа.

Стерильные лекарственные средства, а также вода для инъекций должны быть апиrogenны.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНДОТОКСИНОВ В СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ВОДЕ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ

Эндотоксины представляют собой обязательные компоненты наружной части клеточной мембраны всех грамотрицательных микроорганизмов, которые освобождаются в окружающую среду лишь при их разрушении.

Реакция лизата амебоцитов с эндотоксином была открыта в США в 1964 г. Поскольку первые исследования были проведены на мечехвостах вида *Limulus polyphemus*, препарат, полученный из их крови, был назван Лизат амебоцитов *Limulus* (*Limulus amoebocyte lysate*), сокращенно ЛАЛ-реактив и, соответственно, ЛАЛ-тест.

ЛАЛ-тест для определения пирогенности лекарственных препаратов является активно развивающимся в настоящее время способом контроля качества лекарственных средств. В основе этого теста лежит способность лизата амебоцитов (клеток крови) мечехвоста специфически реагировать с эндотоксинами грамотрицательных бактерий. В результате реакции эндотоксина и лизата происходит помутнение прозрачной реакционной смеси или образование твердого геля, что и служит индикатором присутствия эндотоксина.

Кровь, точнее гемолимфа, мечехвостов имеет голубую окраску, которую ей придает пигмент гемоцианин, выполняющий кислородтранспортную функцию. В крови содержится только один тип клеток – амебоциты или гранулярные гемоциты. Свертывание крови происходит в два этапа: первый – слипание или агглютинация клеток; второй – гелирование гемолимфы. На первом этапе происходит разрушение клеток и высвобождение в плазму различных компонентов коагуляционной системы – способного свертываться белка (коагулогена) и ферментов. После этого происходит свертывание крови, в результате чего образуется гель. В отсутствии эндотоксинов коагуляции не происходит.

Получение ЛАЛ-реактива:

- сбор крови в раствор антикоагулянта. Забор крови проводят в асептических условиях из сердца мечехвоста введением в него иглы большого диаметра;
- отделение амебоцитов от плазмы центрифугированием;
- отмывание амебоцитов;
- лизирование амебоцитов;
- очистка лизата;
- повышение чувствительности лизата;
- сублимационная сушка.

Правила определения эндотоксинов ЛАЛ-тестом регламентируются ГФ.

Существуют 3 основных способа для определения наличия эндотоксина:

- гель-тромб метод, в котором результаты оцениваются визуально по образованию геля;
- турбидиметрический метод, основанный на помутнении реакционной смеси после расщепления субстрата, содержащегося в ЛАЛ-реактиве;

- хромогенный метод, основанный на появлении окрашивания, возникающего в результате введения в реакционную смесь хромогенного субстрата взамен коагулогена.

Гель-тромб метод наиболее широко используемый.

ЛАЛ-тест проводят в асептических условиях, смешивая в пробирке 0,1 мл испытуемого раствора с 0,1 мл лизата. Смесь инкубируют при 37 °С в течение от 15 до 90 мин при рН от 6,0 до 8,0, не подвергая ее встряхиванию. При наличии пирогенных эндотоксинов грамотрицательных бактерий образуется гель, который обнаруживается, по увеличению вязкости смеси, потере ею текучести. При повороте пробирки на 180° гель остается в первоначальном положении.

К достоинствам ЛАЛ-теста можно отнести:

- простоту выполнения, экономичность;
- воспроизводимость, надежность;
- возможность получения количественной характеристики эндотоксинов;
- высокую чувствительность, позволяющую в определенных условиях обнаруживать до 1 мг эндотоксина. Метод в 5–10 раз чувствительнее, чем тест на кроликах;
- возможность определения пирогенности лекарственных препаратов, которые нельзя испытывать на кроликах (препараты седативного действия, короткоживущие изотопы).

В стерильных лекарственных препаратах и воде для инъекций допускается эндотоксинов менее 0,25 ЕЭ/мл.

КОНТРОЛЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ЧИСТОТУ

Проведение контроля лекарственных препаратов на микробиологическую чистоту регламентировано ГФ и распространяется на методы определения микробиологической чистоты в **нестерильных лекарственных средствах** (НЛС), в том числе в лекарственных средствах (ЛС), содержащих живые микроорганизмы, а также вспомогательные вещества и полупродукты. В НЛС допускается лимитированное количество микроорганизмов при отсутствии определенных видов, представляющих опасность для здоровья человека (табл. 12).

Испытание лекарственных средств на микробиологическую чистоту проводят в асептических условиях. Испытание включает способы подготовки различных лекарственных форм, отбор образцов для анализа, методы количественного определения жизнеспособных микроорганизмов, выявление и идентификацию отдельных видов бактерий, наличие которых недопустимо или ограничено в лекарственных средствах, а также питательные среды, растворы и реактивы, необходимые для проведения испытаний.

Микробиологическая чистота лекарственных препаратов

Препараты	Рекомендуемые требования
Препараты, к которым предъявляется требование «Стерильность»	Препараты должны быть стерильными
Для применения местно, наружно, интравагинально Для введения в полости уха, носа	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата) • Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл) препарата • Отсутствие <i>Candida albicans</i> в 1 г (мл) интравагинальных препаратов
А. Для приема внутрь или введения ректально	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г (мл)
Лекарственные растительные препараты и лекарственное растительное сырье	<ul style="list-style-type: none"> • Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^7 КОЕ в 1 г • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г • <i>Escherichia coli</i> – не более 10^2 КОЕ в 1 г

От каждой исследуемой серии ЛС для проведения испытания отбирают необходимое количество образцов в соответствии с категорией препарата из достаточного числа разных упаковок (не менее 3–10).

Лекарственные растительные препараты. К лекарственным растительным препаратам (ЛРП) относятся препараты, произведенные или изготовленные из одного вида лекарственного растительного сырья или нескольких видов такого сырья и реализуемые в расфасованном виде во вторичной (потребительской) упаковке (пачки, пакеты, брикеты и пр.).

От каждой контролируемой серии лекарственного растительного препарата отбирают объединенную пробу, из которой выделяют образец для определения микробиологической чистоты – минимум 5 невскрытых потребительских упаковок общей массой не менее 50 г.

Перед испытанием потребительские упаковки вскрывают с помощью стерильных инструментов, отбирают из них пробу в равных количествах, перемешивают и переносят в стерильную емкость.

Для количественного определения аэробных микроорганизмов и грибов образец массой 10 г (плоды, кора, корни и корневища, почки и др.) или 2 г

(трава, листья, цветки и другие с большим коэффициентом водопоглощения) переносят в стерильную колбу. При массе образца 10 г в колбу помещают 100 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида. Колбу с исследуемым образцом встряхивают на качалке или аппарате для встряхивания в течение не менее 15 мин. Полученный смыв считают разведением 1:10. При массе образца 2 г в колбу добавляют 200 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида. Полученный смыв считают разведением 1:100.

Из полученных смывов ЛРП, соответствующих разведениям 1:10 или 1:100, готовят последовательные десятикратные разведения в том же разбавителе.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

В зависимости от природы ЛС и его физико-химических свойств используют один из вариантов чашечного агарового метода (глубинный, двухслойный, поверхностный, модифицированный глубинный), метод мембранной фильтрации или пробирочный метод наиболее вероятных чисел.

Чашечные агаровые методы. Для культивирования микроорганизмов используют агаризованные питательные среды: соево-казеиновый агар или агар Сабуро с глюкозой. Для каждого разведения образца используют не менее 2 чашек Петри с определенной средой.

Глубинный метод. В стерильную чашку Петри диаметром 90 мм вносят 1 мл испытуемого образца, приготовленного для анализа. Добавляют 15–20 мл расплавленной и охлажденной до температуры $(42,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ стерильной агаризованной питательной среды и быстро перемешивают вращательными движениями. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают до 20–25 мл. После застывания агара чашки переворачивают и инкубируют посевы.

Двухслойный метод. Расплавленную агаризованную стерильную питательную среду вносят в количестве 15–20 мл в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляют до застывания. При большем диаметре чашки Петри количество среды соответственно увеличивают. Поверхность агара в чашке подсушивают.

В пробирку с 4 мл соответствующей расплавленной и охлажденной до температуры $42,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ питательной среды вносят 1 мл образца, приготовленного для анализа, быстро перемешивают содержимое пробирки. Затем содержимое пробирки выливают на поверхность застывшего и подсушенного агара в чашке Петри, равномерно распределяя верхний слой среды вращательными движениями. После застывания чашку переворачивают и помещают в термостат для инкубации.

Поверхностный метод. Расплавленные и охлажденные до температуры $42,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ стерильные питательные среды вносят в количестве 15–20 мл в

каждую стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляют до застывания. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают. Поверхность агара в чашках подсушивают в термостате или ламинарном шкафу.

Образец, приготовленный для анализа, наносят стерильной пипеткой на агар в количестве 0,1 мл и равномерно распределяют шпателем по поверхности среды. Чашки переворачивают и помещают в термостат для инкубации.

Модифицированный глубинный метод. Образец, приготовленный для анализа, в количестве 1,0 мл вносят в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм. Добавляют 7–10 мл расплавленной и охлажденной до температуры $42,5 \pm 2,5$ °С питательной среды и быстро перемешивают вращательными движениями. После застывания агара чашки переворачивают и инкубируют.

Учет и интерпретация результатов, полученных чашечными агаровыми методами. Посевы просматривают ежедневно. Подсчет колоний производят через 48–72 ч (предварительный результат) и через 5 сут (окончательный результат).

Для получения достоверных результатов отбирают чашки, в которых число колоний бактерий не превышает 250, а колоний грибов – 50. Если при учете результатов 2 последующих разведений число колоний на чашках находится в указанных выше пределах, рассчитывают результаты из меньшего разведения.

Если в среднем на чашках выросло более 250 колоний бактерий или более 50 колоний грибов, делают ряд дальнейших последовательных разведений образца, выбирая приемлемое для посева значение.

Если на соево-казеиновом агаре дополнительно обнаружены колонии грибов, то их суммируют с числом бактерий и определяют общее число аэробных микроорганизмов, которое установлено для каждой категории ЛС.

Если на питательной среде отсутствует рост микроорганизмов, результаты отмечают в протоколе испытания следующим образом: при посеве ЛС в разведении 1:10 – «В 1 г (или в 1 мл) лекарственного средства содержится менее 10 бактерий (или грибов)»; при посеве ЛС в разведении 1:100 – «В 1 г (или в 1 мл) лекарственного средства содержится менее 100 бактерий (или грибов)» и т.д.

Количество микроорганизмов (N) в 1 г или в 1 мл рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{\sum c}{n} \cdot d \cdot 10,$$

где: c – количество колоний на всех чашках Петри; n – число чашек Петри; d – коэффициент разведения образца; 10 – коэффициент пересчета при проведении посева на чашку в объеме 0,1 мл.

Метод мембранной фильтрации. Метод мембранной фильтрации используют для количественного и качественного определения микроорганизмов в ЛС, обладающих или не обладающих антимикробным действием, в частности для растворов и водорастворимых ЛС, а также для жиросодержащих препаратов, растворимых в изопропилмиристате (ИПМ).

Установка для мембранной фильтрации должна иметь конструкцию, из которой легко извлекается фильтр, с последующим его переносом на питательные среды. Используют мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм, способные эффективно задерживать микроорганизмы, что необходимо подтвердить валидацией. Материал мембраны следует выбирать таким образом, чтобы компоненты исследуемого препарата не влияли на эффективность его работы. Фильтры из нитрата целлюлозы используют для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов (менее 30%), из ацетата целлюлозы – для спиртовых растворов (более 30%), кислот, щелочей. Мембранную фильтрацию проводят в асептических условиях с помощью вакуума.

Образец, как правило, растворяют в буферном растворе в соотношении 1:10. В воронку фильтровальной установки вносят сначала промывную жидкость (примерно 5 мл) для смачивания фильтра. Добавляют количество раствора препарата, соответствующее 1 г испытуемого образца, и немедленно фильтруют. В случае наличия антимикробного действия ЛС для отмывания мембраны используют 0,9% раствор натрия хлорида или описанные ниже жидкости (№ 1, № 2, № 3), для чего через фильтр пропускают не менее 3 порций по 100 мл подходящей стерильной промывной жидкости. При необходимости к промывной жидкости могут быть добавлены поверхностно-активные вещества (например, твин-80) или инактиваторы антимикробного действия. Через 1 мембрану можно пропускать не более 500 мл промывной жидкости.

Для того чтобы определить, полностью ли отмыты мембраны от фильтруемого препарата, обладающего антимикробным действием, после фильтрации раствора в последнюю порцию промывной жидкости вносят по 1 мл взвеси тест-штаммов микроорганизмов культур, соответствующих категории испытуемого образца. Количество вносимого каждого в отдельности микроорганизма не должно превышать 100 КОЕ в 1 мл.

Рост тест-штаммов на фильтрах подтверждает отсутствие антимикробного действия лекарственного средства. В случае, если антимикробное действие сохраняется, используют специфические или неспецифические инактиваторы или увеличивают объем промывной жидкости.

Подсчет колоний производят через 48–72 ч (предварительные результаты) и через 5 сут (окончательные результаты). Отбирают чашки, в которых число колоний бактерий на фильтрах не превышает 100, а грибов – 50, и рассчитывают число микроорганизмов на 1 г (1 мл) образца или на 1 пластырь. Если на фильтре большее количество микроорганизмов, то делают ряд последовательных разведений образца и выбирают подходящее.

Испытание на отсутствие бактерий *E. coli* (качественный метод). 10 г исследуемого образца, растворенного или разбавленного стерильным фосфатно-буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (соответствует 1 г или 1 мл испытуемого ЛС) в 100 мл соево-казеинового бульона. Перемешивают и инкубируют в течение 18–24 ч. При наличии роста 1 мл содержимого флакона переносят в 100 мл бульона Мак-Конки и инкубируют 24–48 ч при температуре 43 ± 1 °С.

При обнаружении роста в бульоне бактериологической петлей, делают пересев на агар Мак-Конки. Посевы инкубируют в течение 18–48 ч (агар Мак-Конки). Если после инкубации на плотных питательных средах выявлены колонии, типичные для *E. coli*, их микроскопируют. При обнаружении в мазках мелких грамотрицательных палочек отдельные типичные колонии пересевают в пробирки на скошенный соево-казеиновый агар и инкубируют в течение 18–24 ч для накопления чистой культуры микроорганизма.

Для идентификации выделенных бактерий используют биохимические тесты на цитохромоксидазу, индол и способность утилизировать натрия цитрат.

Если в ходе исследования обнаруживают типичные грамотрицательные палочки, не содержащие фермент цитохромоксидазу, не утилизирующие натрия цитрат и образующие индол, считают, что ЛС загрязнено бактериями *E. coli*.

Испытание на отсутствие бактерий рода *Salmonella*

Переносят пробу исследуемого образца в соево-казеиновый бульон, перемешивают и инкубируют в течение 18–24 ч. После перемешивания 0,1 мл переносят в 10 мл накопительного бульона для бактерий рода *Salmonella* – среду Раппопорта–Вассилиадиса и инкубируют в стандартных условиях в течение 18–24 ч. По окончании инкубации делают пересев бактериологической петлей на одну из 2 плотных диагностических сред: ксилоза-лизин-дезоксихолат агар или висмут-сульфитный агар, которые затем инкубируют в течение 48 ч.

При выявлении на указанных средах колоний, типичных для бактерий рода *Salmonella*, проводят микроскопическое исследование. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек характерные колонии пересевают на скошенный трехсахарный агар с солями железа, нанося большое количество культуры бактериологической петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик, не касаясь дна пробирки. Через 24 ч инкубации в стандартных условиях отмечают изменение цвета среды из красного в желтый в основании столбика питательной среды (ферментация глюкозы). В скошенной части агара цвет среды не изменяется (отсутствие ферментации сахарозы и лактозы). Почернение среды свидетельствует об образовании сероводорода – типичном признаке большинства бактерий рода *Salmonella*. Параллельно проводят определение наличия фермента цитохромоксидазы, а также другие биохимические и серологические тесты в случае необходимости дополнительного

подтверждения.

Если в образце обнаружены бактерии, типичные по своим культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам, не содержащие фермент цитохромоксидазу, не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считают, что лекарственное средство контаминировано бактериями рода *Salmonella*.

Испытание на отсутствие бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (соответствует 1 г или 1 мл) в 100 мл соево-казеинового бульона. Перемешивают и инкубируют в стандартных условиях в течение 24–48 ч. После окончания инкубации при наличии роста проводят пересев бактериологической петлей на селективную питательную среду для выделения синегнойной палочки (цетримидный агар или цетилпиридиний хлорид (ЦПХ) агар). Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение 24–48 ч. Выделенные колонии микроорганизмов, которые по своим тинкториальным и морфологическим свойствам являются грамотрицательными палочками, пересевают на агар для выявления сине-зеленого пигмента пиоцианина. Посевы инкубируют в течение 24–48 ч.

Для подтверждения видовой принадлежности выделенных бактерий к *P. aeruginosa* определяют наличие фермента цитохромоксидазы и способность выделенных микроорганизмов расти на соево-казеиновом бульоне при температуре 42 ± 1 °C в течение 18–24 ч.

Испытание на отсутствие бактерий *Staphylococcus aureus*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (что соответствует 1 г или 1 мл образца) в 100 мл соево-казеинового бульона. Перемешивают и инкубируют в течение 24–48 ч. При наличии роста пересевают петлей на маннитно-солевой агар и инкубируют в стандартных условиях в течение 24–48 ч.

Появление после окончания инкубации типичных золотисто-желтых колоний, окруженных желтыми зонами на среде с маннитом, свидетельствует о росте *S. aureus*, ферментирующем маннит. Проводят микроскопическое исследование типичных колоний. При обнаружении в мазках грамположительных кокков, расположенных в виде виноградных гроздей, производят пересев на соево-казеиновый агар. Инкубируют в стандартных условиях в течение 18–24 ч. Для идентификации проводят тест на наличие коагулазы.

Испытание на отсутствие грибов *Candida albicans*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (что соответствует 1 г или 1 мл образца) в 100 мл бульона Сабуро, перемешивают и инкубируют в течение 3–5 сут при температуре $32,5 \pm 2,5$ °C. При наличии роста пересевают бактериологической петлей на агар Сабуро с глюкозой и инкубируют в течение 24–48 ч при той же температуре.

Рост белых круглых, выпуклых, гладких и блестящих колоний может указывать на наличие *Candida albicans*, что подтверждают в ходе дальнейшей идентификации, одним из этапов которой является микроскопическое исследование (окраска по Граму), выявляющее грамположительные дрожжеподобные почкующиеся овальные или округлые клетки размером 4–8 мкм. Для идентификации возможно использовать хромогенную среду, предназначенную для дифференциации *C. albicans* и других видов грибов рода *Candida*.

Если в образце обнаружены типичные по морфологическим и тинкториальным свойствам дрожжеподобные грибы, идентифицированные как *C. albicans*, считают, что ЛС контаминировано указанным видом грибов.

3.6. МИКРОФЛОРА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОФЛОРЫ РАСТЕНИЙ

Микроорганизмы являются постоянными спутниками не только человека и животных, но и, в равной степени, растений, в том числе используемых в качестве лекарственного сырья. В России используется более 200 видов лекарственных растений. Микроорганизмы поселяются и ведут активный образ жизни, как на поверхности, так и внутри зеленых частей растений, их корней, семян, плодов. Растения, имеют субстратную (корни) и надземную часть. Микробная обсеменённость растений – это результат влияний, вызванных источниками живой и неживой природы, легко передаваемыми через воздух и с почвой. Субстратная (почвенная) часть находится в почве и непрерывно контактирует с почвенными микроорганизмами (грибы, актиномицеты, бактерии), вирусами и фагами, которые могут проникать в корни или колонизировать поверхность корней. Надземная часть растений постоянно контактирует с микроорганизмами, и они могут оседать с пылью и водными каплями. Состав воздушной микрофлоры может периодически изменяться при изменении ветра и зависит от наличия промышленных предприятий, автомобильных трасс и др. Многие растения служат для изготовления отваров, настоев и др. лекарственных форм. Для этого используют самые разнообразные растения, а также извлечённые из них активные действующие соединения. При производстве лекарственных средств из растительного сырья важную роль играет не только контроль исходных материалов, условий хранения и переработки, но и его происхождение (предыстория). Важными факторами, влияющими на качество растительного сырья, и соответственно, определяющими дальнейшее качество и эффективность при применении, являются агрофитопоказатели (агрофон), выбор культуры, условия выращивания, сбора и сушки. Эти факторы могут оказать влияние на микробную обсеменённость растений.

Растительное лекарственное сырье может быть обсеменено микроорганизмами – представителями нормальной микрофлоры растений, а также фитопатогенными микроорганизмами – возбудителями заболеваний растений и работники аптечных учреждений, фармацевтических фабрик и заводов должны обеспечивать сохранность лекарственного сырья от микробной порчи.

Все микроорганизмы, населяющие лекарственные растения, можно разделить на две группы:

- 1) представители нормальной микрофлоры растений;
- 2) фитопатогенные микроорганизмы – возбудители инфекционных заболеваний растений.

НОРМАЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА РАСТЕНИЙ

Нормальная микрофлора растений на поверхности листьев, семенах и на прикорневой системе представлена ризосферными и эпифитными микробами.

Зона почвы, находящаяся в контакте с корневой системой растений, носит название **ризосферы**, а микроорганизмы, развивающиеся в данной зоне, называются ризосферными.

Считается, что первое определение понятия ризосферы было дано Хилтнером в 1904 г. Этот исследователь подразумевал под ризосферой «те места в почве, которые находятся под непосредственным влиянием корней растений». Он утверждал, что микрофлора частиц почвы, находящихся в непосредственной близости к корневой системе растения, более обильна, чем микрофлора частиц, находящихся за пределами влияния корней. С того времени проведено огромное количество исследований взаимного влияния микроорганизмов, заселяющих поверхность корней и корневых систем растений. В количественных исследованиях микробиологических биоценозов в почве, непосредственно соприкасающейся с корневой системой растения, многие авторы пользуются термином «эффект ризосферы». Это отношение численности микроорганизмов в частицах почвы, прилегающих к корням, к численности микроорганизмов в почве, находящейся вне влияния корней.

В настоящее время под ризосферой понимают пространство вокруг корня, в котором имеет место более обильное развитие микроорганизмов из-за стимулирования их роста корневыми экссудатами (выделениями), а в более широком смысле – корневыми депозитами.

Корневые экссудаты представляют собой низкомолекулярные органические вещества, продукты фотосинтеза и метаболизма растения. К ним относятся сахара, органические кислоты и аминокислоты, спирты, гормоны, витамины и др. Эти вещества «утекают» из зоны вблизи кончика корня, точнее зоны «растяжения» корня в процессе его роста и развития. Корневые ризодепозиты – более широкое понятие. Они включают не только экссудаты, но и все другие вещества – высокополимерные слизи полисахаридной и белковой природы, ферменты, отмирающие и слущивающиеся поверхностные клетки с их

содержимым, кусочки тканей, в частности кортекс верхних стареющих участков корня, корневой чехлик, корневые волоски, летучие органические вещества и др. Считают, что в виде ризодепозитов растение теряет более 30–40% продуктов фотосинтеза. Помимо химического воздействия на почву и находящихся в ней микроорганизмов, в том числе через изменение pH имеет место и чисто механическое воздействие растущего корня на окружающую его эконишу. Феномен более высокой плотности микроорганизмов вокруг корня за счет потребления экссудатов и ризодепозитов называется ризосферным эффектом. В свою очередь, почвенные микробы могут оказывать благоприятное воздействие на жизнь растений, что обусловлено:

- минерализацией органических веществ и растительных остатков;
- образованием тиамин и др. витаминов, аминокислот, ферментов и других факторов роста, усиливающих ферментативные процессы в растениях и способствующих усилению корневого питания и более энергичному обмену веществ растений;
- антагонистической ролью в отношении фитопатогенных микроорганизмов.

Условно различают два типа ризосферы: ближнюю и отдаленную.

Ближняя располагается непосредственно на поверхности корней и извлекается вместе с ними, отдаленная начинается на расстоянии нескольких миллиметров от корней и распространяется в радиусе 50 см от них. Количество микроорганизмов в ближней и отдаленной ризосфере различно: на поверхности корней их от 50 млн до 10 млрд, на расстоянии 15 см от корней до 5 млн в 1 г почвы. Число микроорганизмов в ризосфере в 100 раз больше, чем в почве, где растения не произрастают, что связано с выделением корнями растений различных питательных веществ.

Качественный и количественный состав микрофлоры ризосферы специфичен для каждого вида растений. Основная масса прикорневой микрофлоры представлена неспороносными грамотрицательными бактериями рода *Pseudomonas*, микобактериями и грибами, главным образом, базидиомицетами, реже фикомицетами, аскомицетами. Указанные грибы образуют симбиоз с корнями растений, в том числе и лекарственных, называемый микоризой. *Микориза – это морфологически единое образование, состоящее из гриба и частей корневой системы растения. При этом гриб может быть симбионтом по отношению к растению-хозяину, или реже, хозяином для растения симбионта.*

Микориза особенно благоприятна для развития растений:

- увеличивает поглощающую поверхность корней за счет разветвлений гиф гриба;
- грибы своими ферментами разлагают богатые азотом органические соединения, обеспечивая растения аминокислотами, минеральными веществами и водой;

- микоризные грибы снабжают растения ростовыми веществами, витаминами.

Растения в свою очередь выделяют ряд ростовых веществ, стимулирующих развитие гриба. Кроме этого, растения снабжают гриб глюкозой и специальными метаболитами корневой системы. Энергия, заложенная в глюкозе, дает возможность грибу усваивать труднорастворимые соединения фосфора и разлагать органические вещества, например, торф.

Еще в очень давние времена люди заметили, что плодовые тела некоторых грибов растут в соседстве с определенными породами деревьев, как бы привязаны к ним. Это наблюдение отразилось и в народных названиях ряда грибов – подосиновик, подберезовик, поддубовик. Более тесную связь грибов с корнями растений удалось установить, когда ученые стали широко пользоваться микроскопом. Первые наблюдения о наличии грибного мицелия на корневой системе различных растений были сделаны более 100 лет назад. Подобных замечаний, имевших натуралистический характер, но по существу не уточнявших взаимоотношений между грибами и высшими растениями, можно перечислить достаточное количество. Фундаментальное значение в учении о микоризе имели работы профессора Одесского Новороссийского университета Ф.М. Каменского в 1881 г. В своих работах он подробно описал анатомическую картину корней подъельника, отмечая, что на корнях отсутствуют корневые волоски, а вместо них имеется толстая оболочка из грибного мицелия. Сильно сплетенные гифы гриба так плотно прилегают к эпидермису корней, что последние не могут непосредственно соприкасаться с землей. Каменский делает заключение, что все растворимые вещества из почвы должны поступать к корням подъельника, проходя через грибную зону, и поднимает вопрос о значении этого явления для растений. Искажая историческую правду, зарубежные исследователи приоритет открытия микоризы приписывают обычно Б. Франку, который опубликовал свои наблюдения лишь в 1885 г. Франк имел поручение выяснить закономерности в нахождении трюфелей в лесных массивах. Данный ценный гриб составлял существенную статью экспорта Германии, и значение работы Франка легко можно понять. Не решив своей основной задачи, Франк установил, однако, наличие грибного мицелия на активной корневой системе многих деревьев. Работы Каменского и Франка послужили началом чрезвычайно большого количества исследований, посвященных изучению микоризы. Особенно большие успехи были достигнуты с применением современных методов исследований.

Главными представителями микоризных грибов являются базидиомицеты (*Boletus*, *Amanita*, *Lactarius*, *Cortinarius*, *Russula*, *Tricholoma*, *Entorrhiza*, *Licoperdon*, *Sclerocierma* и др.). Вместе с тем, микоризу может образовывать ряд грибов из фикомицетов (*Pythium*, *Chitridium*, *Endogone*), аскомицетов (*Elaphomyces*, *Tuber*) и несовершенных грибов (*Fusarium* и др.).

Указанные микроорганизмы сожительствуют с различными представителями растительного царства, в том числе с лекарственными растениями. Так, известен симбиоз грибов с папоротниковидными (Pteridophyta), хвощами (Arthrophyta), плаунообразными (Lycopsida), голосеменными (Gymnospermae), саговниковыми (Cycadaceae), тиссовыми (Taxaceae). Исключительно богаты микоризами сосны, орхидеи и вересковые.

Микоризы можно обнаружить в самых различных почвах (кроме известковых), так как их образование зависит от характера почвы только в количественном, но не качественном отношении.

Существует три вида микоризы: эндотрофная, эктотрофная, эктоэндотрофная. *Эктотрофная* микориза характерна для древесных растений (ель, дуб, береза), кустарников (ива) и очень редко встречается у травянистых (живородящая гречиха). При ее образовании мицелий гриба окутывает окончания молодых корешков, формируя подобие чехла, который видим невооруженным глазом, называемый раньше грибокорнем. При микроскопическом исследовании корней с эктотрофной микоризой видно, что грибной чехол в виде параплектенхиматической оболочки покрывает корешки до конуса нарастания. От этого чехла отходят различные гифы, из которых наружные распространяются в окружающей почве, а внутренние проникают между клетками первичной коры, не захватывая даже эпидермиальные клетки. При этом корневые волоски отсутствуют, а корневой чехлик преобразуется в один-два слоя клеток. Мицелий эктотрофной микоризы, как правило, в ткани корня не проникает, но отдельные гифы внедряются между клетками коры корешка и разветвляются там, образуя тонкую изящную перепонку. Это тонкое однослойное грибное сплетение (перепонка), расположенное между клетками коровой перенхимы микоризного корня, получило название сети Гартига, грибные гифы которой увеличивают поглощающую поверхность корневой системы. Поверхность микориз может быть совершенно гладкая, волосистая, щетинистая; часто она представляется волнистой от расщепления наружных свободных гиф. По цвету, микориза бывает белой, черной, желто-бурой, желтовато-зеленой, серо-желтой, коричневой. Грибной чехол может быть плетеном и рыхло-сплетенным. Микоризы различаются также и по форме: одиночные, булаво-видные, вильчаторазветвленные и гроздевидноразветвленные и др.

Эктотрофную микоризу образуют в большинстве случаев грибы гименомицеты (*Russula*-сыроежка, *Agaricus*-шампиньон, *Amanita*-мухомор и т.д.), иногда гастеромицеты (*Phallus*-веселка, *Lycoperdon*-дождевик настоящий и т.д.). На корневой системе одного растения формировать микоризу могут один либо несколько видов грибов. Но чаще какому-то виду высшего растения в растительных сообществах соответствует определенный гриб-симбионт.

Эндотрофная микориза характеризуется тем, что форма корней остается постоянной, корневые волоски сохраняются, нет сети Гартига и грибного

чехла. Гифы гриба пронизывают непосредственно клетки корневой паренхимы. Микориза практически не заметна на поверхности корня растения в связи с тем, что значительная часть гриба проникает внутрь клеток корневой системы, сосредоточена в элементах коры, никогда не проникает в сосудистые пучки и в конус нарастания корня. Гифы внутриклеточного мицелия, проникшие в клетки, ветвятся в виде гаустории, но более древовидно, и заполняют внутреннюю полость клетки. Эти древовидно разветвленные гифы грибов, обитающие в клетках растений с эндотрофной микоризой, названы арбускулами. В некоторых случаях на концах этих разветвлений образуются пузырьвидные вздутия, названные везикулами, или спорангиолями.

Эндотрофная микориза формируется у брусничных, орхидных, шикшевых, вересковых, грушанковых и др. растений. Наиболее распространены у многих травянистых растений, кустарников и деревьев разных видов грибы-микоризообразователи фикомицеты (роды *Endogone*, *Rhizoglyphus*), в некоторых случаях – базидиальные и несовершенные грибы.

При *эктоэндотрофном* или смешанном типе микоризы сочетаются свойства экто- и эндомикоризы. Возможно преобладание эктотрофного или эндотрофного типа. Такая микориза наблюдается у большинства древесных пород, у травянистых растений, кустарников, к примеру, арктоуса арктического, грушанки крупноцветковой. Гифы гриба в этом случае густо оплетают корень высшего растения снаружи и в то же время дают обильные ответвления, проникающие внутрь корня, пронизывая и клетки, и межклеточные пространства.

Некоторые авторы описывают еще *перитрофную* микоризу, которая в отличие от предыдущих типов микориз характеризуется тем, что грибы находятся на поверхности или вблизи корней растений, в их ризосфере, но не проникают в ткани и анатомически не связаны с корнями. Перитрофная микориза, являющаяся простейшей формой симбиоза, представляет интерес как возможный первый этап эволюции микоризообразования. О перитрофной микоризе и участвующих в ней грибах известно очень мало.

От микориз необходимо отличать *псевдомикоризу*, или ложную микоризу. Она внешне сходна с настоящей микоризой и отличается от нее только тем, что мицелий гриба не образует сеть Гартига, а его отдельные гифы проникают глубоко в ткани, в центральный цилиндр, хотя клетки сохраняют первоначальный вид. При этом корни теряют корневые волоски, но никогда не покрываются чехлом из мицелия гриба. Псевдомикоризы образуются грибами-паразитами. Они поражают все ткани корня и кроме вреда, они ничего растению не приносят. Такой тип псевдомикоризы можно отличить от настоящего только при микроскопическом исследовании.

Эпифитная микрофлора. Эпифитной (греч. *Ері* – над, *phyton* – растение) называется микрофлора, находящаяся на поверхности надземных частей растений.

Количество эпифитных микроорганизмов, обнаруживаемых на поверхности листьев, иногда может достигать 10^8 клеток на грамм свежих листьев, или 10^2 на 1 см^2 , что вполне сопоставимо с численностью микроорганизмов в грамме почвы. Эпифитные бактерии характеризуются способностью к выживанию и размножению на поверхности листьев, а также способностью противостоять временному водному стрессу, ультрафиолетовому облучению, экстремальным температурам и недостатку питательных веществ. Это осуществляется за счет образования биопленок. Биопленки являются результатом агрегирования, микроколонизации прикрепленных к листовой поверхности, а также жгутам межклеточного пространства растительных тканей бактерии в биопленках, как известно, связаны с экзополимерной матрицей.

По качественному составу эпифитная микрофлора довольно однообразна и типичными ее представителями являются родов *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*. Реже встречаются споровые бактерии *Bacillus mesentericus*, *Bacillus vulgatus*, бесспоровые молочнокислые бактерии, *E. coli*, грибы плесневые и дрожжевые.

Многие эпифитные микроорганизмы являются антагонистами фитопатогенных бактерий, препятствует проникновению фитопатогенных микроорганизмов в растительные ткани, тем самым, предохраняют растения от заболеваний, усиливая тем самым иммунитет растений, они существуют за счет обычных выделений растений и органических загрязнений поверхности растений. Например, *Erwinia herbicola augeum* – грамотрицательные короткие подвижные палочки, образующие колонии золотистого цвета на МПА, являются антагонистами возбудителя мягкой гнили овощей.

Численность и разнообразие микроорганизмов зависят от вида растения и его местообитания, климата, погодных условий и некоторых других обстоятельств и многих других. Так, растения окультуренных почв содержат большее количество микробов, чем растения лесов и лугов; осенью на листьях обнаруживается больше бактерий, чем ранней весной. Имеются различия в микробном сообществе верхней стороны листа и нижней. Верхние листья содержат меньше микробов, чем нижние, на которые бактерии попадают из почвы вместе с капельками влаги, отскакивающими от земли во время дождя. Существенную роль в этом играют свет и температура. Естественно, что растения пустынь, суккуленты, содержат гораздо меньше микроорганизмов на единицу площади поверхности или на грамм, чем растения влажных тропических лесов. Особенно сильно заселены микробами растения, произрастающие на полях орошения, свалках, местах выпаса скота; в этих растениях могут содержаться патогенные для человека микроорганизмы.

Срезанные и сорванные растения необходимо сразу подвергать обработке, так как они являются хорошей средой для размножения микробов. На

высушенных растениях жизнедеятельность микробов значительно снижается, многие бактерии погибают.

ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Микроорганизмы, вызывающие инфекционные заболевания растений называются фитопатогенными. Среди возбудителей инфекционных заболеваний растений насчитывается более 600 вирусов и вирионов, около 250 видов микоплазм, бактерий, риккетсий и актиномицетов, около 20 тыс. видов грибов.

Происхождение фитопатогенов в настоящее время рассматривают как результат изменения сапротрофного способа питания. На поверхности пораженных органов и тканей развиваются патогены, относящиеся к экзопаразитам, а патогены, живущие внутри растений-хозяев, относятся к *эндопаразитам*.

По типу питания микроорганизмы разделяют на *сапротрофов* – извлекают питательные вещества из мертвых тканей (сапрофиты), *некротрофов* и *биотрофов* – получающие питательные вещества после повреждения живых растений. Причем некротрофы прежде убивают растение своими токсическими выделениями, а биотрофы извлекают питательные вещества из живых тканей, и это приводит к его гибели.

По степени паразитизма выделяют *факультативных* и *облигатных фитопатогенов*. Факультативные фитопатогены оказывают на ткани растения наиболее быстрое воздействие, что приводит к гибели клеток. На сочных органах растений это приводит к развитию гнилей, на листьях – пятнистостей. Основное условие существования таких возбудителей – наличие влаги в окружающей среде, так как данные патогены обладают, как правило, внеклеточными ферментами, быстро убивающими живые ткани и вызывающими появление обширных зон мертвой ткани. У облигатных фитопаразитов значительно меньше внеклеточных ферментов, контакт с растением-хозяином не приводит к быстрому разрушению клеток. Между фитопатогеном и хозяином устанавливается прижизненный обмен в течение продолжительного времени. Постепенно развитие облигатного паразита приводит к истощению растения, снижению его продуктивности. Болезни, вызываемые облигатными патогенами, проявляются в большей степени у интенсивно растущих растений и имеют длительный период скрытого развития.

Инфекционное заболевание растения представляет собой сложный процесс взаимодействия возбудителя-фитопатогена и растения-хозяина. Характер развития взаимоотношений зависит от факторов окружающей среды, поэтому каждый патологический процесс может возникать и развиваться при наличии следующих условий:

- восприимчивого к определенному патогену растения-хозяина;
- патогенного организма и достаточного количества инфекционного материала;

- контакта патогена и растения-хозяина при соответствующих условиях внешней среды.

Если хотя бы одно из этих условий отсутствует, инфекционный процесс не развивается. Определяющая роль отводится также и патогенности, вирулентности и агрессивности патогена.

Под *патогенностью* понимают способность микроорганизмов вызывать заболевание определенного вида растений и наносить ему вред. Это свойство может изменяться в зависимости от цикла развития возбудителей и внешних условий. Факультативные формы, вызывающие гибель больших участков, могут быть более патогенными, чем облигатные, вызывающие местные поражения тканей.

Вирулентность – качественная мера патогенности. Это патогенность данного паразита по отношению к определенному виду или сорту растений-хозяев. Один и тот же возбудитель может быть вирулентным для одного сорта и авирулентным для другого.

Агрессивность – количественная мера патогенности. Это способность паразита вызывать массовое заражение восприимчивых растений (эпифитотии), преодолевая их защитные свойства. Высокоагрессивными считаются возбудители, способные вызывать заражение растений при минимальном количестве (дозе) инфекционного начала. Облигатные формы патогенов являются более агрессивными, факультативные – менее агрессивными.

Этапы инфекционного процесса: заражение, инкубационный период и проявление заболевания, или собственно болезнь.

Заражение – совокупность нескольких последовательных процессов, которые практически не разобщены во времени и поэтому весьма сложно установить границы между ними:

- 1) попадание инфекции на поверхность органов растения;
- 2) прорастание спор грибов, семян цветковых паразитов;
- 3) внедрение паразита внутрь тканей.

При заражении бактериями или вирусами второй и третий этапы не наблюдаются, так как они сразу же попадают внутрь тканей.

Пути распространения фитопатогенов в природе весьма разнообразны: при помощи воды – гидрохория, животными – зоохория, по воздуху – анемохория и т. д. Насекомые обычно разносят фитопатогены на ограниченные расстояния, лишь во время их миграций расстояния могут быть более значительными. Так же насекомые могут создавать дополнительные входные ворота для инфекции за счет наличия сосущего-колющего ротового аппарата. Например, *Erwinia amylovora* разносится пчелами и другими опылителями и попадают в ранки, сделанные этими насекомыми. Фитопатогенные бактерии, вирусы и микоплазмы по воздуху, как правило, не распространяются. Таким путем они могут разноситься только с мельчайшими частицами пораженной ткани рас-

тений на незначительные расстояния. Один из основных путей распространения бактерий – посадочный материал: семенами, клубнями и др. Обычно бактерии локализируются между семенной оболочкой и эндоспермом, проникают в зародыш (*Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* и др.). Фитопатогенные бактерии способны сохраняться в почве, семенах и на растительных остатках. Но чем быстрее происходит минерализация этих продуктов, тем меньше сохраняются бактерии. При сохранении фитопатогенных бактерий на поверхности растений или в их тканях, говорят о поверхностной контаминации. В период заражения большинство фитопатогенных бактерий нуждается в повышенной влажности от 50 до 100%. Считают также, что бактерии сильно подвержены действию света. Вместе с этим следует отметить, что пигментированные бактерии чаще поражают надземные, а непигментированные – подземные части растений.

Проникновение возбудителя в ткани растения-хозяина происходит различными путями. Споры грибов способны проникать как в неповрежденные, так и в поврежденные ткани через естественные или искусственные отверстия. Бактерии не могут проникать в растения непосредственно через покровную ткань, заражение происходит только через естественные отверстия – устьица, чечевички или поврежденную покровную ткань. Особое значение для проникновения имеет влага: наличие капельно-жидкой влаги или высокая влажность на поверхности растений способствуют размножению патогенов.

С начала заражения и до момента появления у растений внешних симптомов болезни проходит *инкубационный период*. Длительность его зависит от очень многих факторов: температуры, влажности воздуха, света, питания, от устойчивости или восприимчивости растения.

Проявление заболевания определяется скоростью распространения возбудителя по проводящей системе или другими способами. Характер поражения может быть ограниченным, если у растения активизируются защитные реакции (действие окислительных ферментов, фитонцидов и др.).

Инфекционные болезни растений классифицируются:

- по локализации процесса:

общие – вызывают быструю гибель всего растения или отдельных крупных его частей;

местные – распространяются медленно, поражают отдельные части растений.

- по механизму:

паренхиматозные заболевания – развиваются при попадании микроорганизмов в ткани растений через различные анатомические отверстия (устьица, чечевички, нектарники) и повреждения покровных тканей. Возбудители выделяют ферменты и токсины, которые способны разрушать ткань растения, об-

легчающие их распространение по межклеточным пространствам. Проникновение патогенов вглубь вызывает массовую гибель клеток. К ним относят гнили, ожоги и пятнистости.

Сосудистые поражения развиваются при распространении патогенов по сосудам растений, они размножаются в сосудах, вызывая их закупорку за счёт повреждения стенок, затрудняется питание растений и приводит к увяданию и гибели растения.

Опухоли, возбудители содержат онкогенные плазмиды, которые попадая в клетки растений, они стимулируют опухолевый рост.

• по совокупности анатомических и физиологических изменений:

1. Камедетечения, смолотечения, слизетечения. Чаще всего вызываются бактериями рода *Erwinia* и грибами (класс *Ascomycetes*), в большинстве наблюдаются у лиственных и хвойных деревьев.

2. Гниль. Загниванию могут подвергаться все части растения, но особенно те, которые богаты водой и запасными питательными веществами (клубни, корнеплоды, луковицы), чаще при их хранении. Причиной развития гнилей могут быть и грибы, и бактерии. В случае, когда под воздействием ферментов фитопатогена разрушается межклеточное вещество и клетки распадаются, говорят о возникновении мягких гнилей. Пораженная ткань превращается в бесформенную массу различных цветов. Гнили могут быть также мокрыми, сухими и твердыми. *Мокрые* гнили образуются в органах и тканях, богатых водой. Сухие гнили образуются при разрушении межклеточных веществ и оболочек клеток, относительно бедных водой, ткани теряют структуру и превращаются в волокнистую или порошкообразную массу. Примером развития гнилей такого типа являются поражения древесины трутовиками. Известны некоторые типы заболеваний, когда клетки отмирают без существенного разрушения пектина, т.е. твердые гнили.

3. Налеты появляются на поверхности пораженных органов и представляют собой мицелий и спороншение возбудителя болезни – гриба. Особенности налета – окраска и расположение – могут служить диагностическими признаками возбудителя, например, настоящие и ложные мучнистые росы, чернь.

4. Увядание или вилт – широко распространенный тип поражения растений, гибель которых происходит в результате проникновения возбудителей в корневую и проводящую системы. Наблюдается закупоривание проводящих сосудов, под действием образующихся токсинов происходит некроз стенок. В результате нарушается транспорт воды в растении, и оно увядает. Причиной развития вилта могут быть и грибы, и бактерии. В случае грибной инфекции увядание называется трахеомикозом, в случае бактериальной – трахеобактериозом. Однако увядание может быть связано и с неблагоприятными условиями окружающей среды.

5. Ожог. На листьях, молодых побегах, цветах, плодах образуются водянистые пятна, которые темнеют, становятся коричневыми или черными. Пораженный лист отмирает, на плодах остаются темные пятна. Возбудителями ожога являются бактерии рода *Erwinia*.

6. Пятнистость. Некоторые бактерии (род *Pseudomonas* и *Xanthomonas*), грибы (класс *Ascomycetes* и *Deuteromycetes*), вызывают образование пятен разного цвета, формы, размеров на листьях, семенах и плодах.

7. Опухоли или наросты проявляются как разрастание пораженной ткани. Могут образовываться на различных частях растения. Возникновение наростов происходит в результате увеличения размеров пораженных клеток (гипертрофия), или их количества (гиперплазия). Иногда оба процесса протекают одновременно. Поражения такого типа свидетельствуют о том, что патогены выделяют гормональные вещества, способные нарушить присущий растению способ роста, привести к разрастанию отдельных тканей. Наросты, галлы, опухоли – характерные признаки болезней, вызываемых грибами, бактериями (род *Agrobacterium*), вирусами и механическими повреждениями.

8. Язвы (антракнозы) возникают при поражении насыщенных водой органов и тканей растений и характеризуются размягчением тканей, окружающих места заражения. Вызываются бактериями (род *Erwinia* и *Rhizobium*), грибами, механическими повреждениями, низкой температурой.

9. Хлорозы и мозаика листьев. На листьях появляются бледно окрашенные пятна, чередующиеся с нормально окрашенными участками, возникают из-за нарушения пигментации листьев. При хлорозах это касается общего пожелтения или посветления листьев, при мозаиках пожелтение затрагивает отдельные части листа. Чаще всего причинами этого бывают нарушения питания или поражение вирусами.

10. Деформация. Деформации представляют собой изменения формы пораженного органа (искривление побегов, курчавость листьев, карликовость). Например, некоторые грибные и вирусные болезни связаны с деформациями листьев: скручиванием, морщинистостью, курчавостью. Скручивание листьев является результатом их переполнения крахмалом (в результате нарушения его оттока при поражении проводящей системы). Морщинистость и курчавость проявляются вследствие неравномерного роста мезофилла и жилок, а нитевидность – в результате роста только жилок. Деформации цветков – пролиферации, махровость – являются результатом вирусных поражений.

11. Некрозы проявляются в виде участков отмершей ткани на пораженных органах растения – листьях, стволах, плодах. Пятна могут иметь различную форму: округлую, удлиненную, угловатую. На листьях форма некротических пятен зависит от расположения жилок. При поражениях жилок некрозы проявляются в виде штрихов. Очень часто некрозы четко ограничены от здоровой ткани, и возбудитель локализован в таком пораженном участке. Такое

ограничение распространения возбудителя можно рассматривать как защитную реакцию растения. В других случаях некрозы обильно заселены фитопатогеном, пораженная ткань крупная и хорошо заметна. При некоторых поражениях на границе здоровой и пораженной ткани образуется опробковевший слой, пораженные участки теряют связь со здоровыми и выпадают. Такой тип поражения называется дырчатой пятнистостью. Поражения типа пятнистостей характерны для микозов, бактериозов и вириозов.

12. Пустулы представляют собой участки пораженной ткани с признаками спороношения грибов, вначале прикрытые эпидермисом, который впоследствии разрушается и разрывается. Образование пустул является наиболее типичным признаком поражения ржавчинными грибами.

13. Парша – заболевание, вызванное актиномицетами рода *Streptomyces*, развивающееся на покровных тканях, приводящее к их растрескиванию и образованию струпьев. Обычно возбудитель заболевания не проникает глубоко внутрь ткани, но при сильном поражении может вызвать деформацию плодов. Встречается парша на клубнях картофеля, плодах, семечках.

14. Мумификация выражается в почернении и ссыхании пораженных органов растения. Чаще всего мумифицируются пораженные мицелием паразитирующего гриба богатые питательными веществами органы. Пораженный плод превращается в твердое образование – склероций, кроющие ткани которого темноокрашены. Характерные примеры таких поражений – спорынья злаков, мумификация плодов яблони.

15. Израстание связано с чрезмерным ростом растения за счет выделения фитопатогеном ростовых веществ. С избыточным выделением ростовых веществ связана также и чрезмерная кустистость. В этом случае образуется большое количество стеблей, такие растения называют «ведьмины метлы». На такой процесс расходуется много энергии, растения плохо плодоносят, имеют мелкие листья и тонкие побеги. Считают, что часто этот симптом является признаком фитоплазменного или вирусного поражения.

Инфекционные болезни растений бактериального происхождения – **бактериозы**. К бактериозам относятся различные виды гнилей, бактериальные мшистости, ожоги (некрозы), увядания, опухоли и др.

К **вирусным болезням** относятся мозаичные болезни, желтуха, болезни увядания, карликовость, закукливание и другие. Различают также **микозы**, или грибковые болезни (>80% заболеваний), например, *фузариозы*, *аскохитозы*, *воловни* и многие другие.

К инфекционным болезням растений относят и **актиномикозы**, вызываемые актиномицетами.

Фитопатогенные бактерии. Фитопатогенные бактерии, вызывающие разнообразные бактериозы растений, относятся к уже известным родам или

выделяются в специальные роды. Однако, существующая классификация фитопатогенных бактерий несовершенна, не всегда определена родовая и видовая принадлежность микроорганизма.

В настоящее время фитопатогенные представители обнаружены среди бактерий отделов: грамотрицательных, грамположительных и микоплазм. Фитопатогенные бактерии в большинстве палочковидной формой клеток, хотя встречаются и кокковидные. Некоторые фитопатогенные бактерии имеют слизистую капсулу (ослизнение оболочки), они более устойчивы к солнечному свету. Большинство фитопатогенные бактерии не образуют спор. Являются аэробами или факультативной анаэробами, по характеру питания фитопатогенные бактерии – гетеротрофы, способные расти на питательных средах.

По степени приспособленности бактерий к растениям их делят на 2 группы:

1. Паразиты – бактерии, которые наиболее хорошо живут на живых растениях или сохраняются на не перегнивших растительных остатках. Такие бактерии, попав в почву, сравнительно быстро погибают в ней (10–20 дней). Возбудители мокрой гнили – *Pectobacterium caratovorum*, возбудители пятнистостей – *Xanthomonas malvacearum*, возбудители корневого рака – *Pseudomonas tumefaciens*.

2. Бактерии-сапрофиты, которые вообще ведут сапрофитный образ жизни, но в некоторых случаях вызывают заболевание растений, например, *Pseudomonas fluorescens* вызывающая загнивание растений табака, рапса, бегонии.

Фитопатогенные бактерии выделяют большое количество ферментов патогенности и токсинов. Почти все фитопатогенные бактерии имеют такой фермент, как пектиназа, посредством которого разлагается как в аэробных, так и в анаэробных условиях межклеточное вещество (срединная пластинка), состоящее из пектинов, склеивающих клетки между собой. В анаэробных условиях этот процесс протекает по типу маслянокислого брожения. Таким образом, разложение пектиновых веществ ведет к мацерации тканей. Пектиновых веществ особенно много в паренхиме коры. После их разрушения в коре остаются лишь легко разделяющиеся лубяные волокна. Весьма характерно это для древесных пород при бактериальном поражении коры. После разложения пектиновых веществ от флоэмы остаются лишь тонкие волокна луба – она приобретает вид мочала, а под толстым корковым слоем образуется пустота. По этой же причине на тонких ветвях корковый слой сморщивается в складки, что очень характерно при поражении их бактериозом. Разложение пектиновых веществ, представляющих собой слизистую массу, в тканях флоэмы или ксилемы по схеме маслянокислого брожения у древесных пород связано с выделением наружу через трещины или разрывы слизи, или жидкости независимо от того, где происходит разложение – во флоэме или ксилеме. Образующиеся

в тканях газы в результате жизнедеятельности бактерий помогают такому выделению. Очевидно, что так называемое слизетечение, нередко наблюдаемое у древесных пород и обычно рассматриваемое как безобидное местное явление, на самом деле может быть отражением глубоких патологических процессов, происходящих в стволе дерева.

У многих видов фитопатогенных бактерий имеется *амилаза*, действующая на крахмал и превращающий его в сахара, которые в свою очередь могут сбраживаться другими ферментами по схеме маслянокислого, спиртового, молочнокислого и прочих брожений. При этом сахара растительной клетки оказываются минерализованными до углекислого газа и воды. Вероятно, в связи с этими процессами ксилема и флоэма лесных пород при некоторых бактериальных поражениях бывает исключительно насыщена водой. Так как жизнедеятельность бактерий в древесине растущих деревьев тесно связана с явлениями брожения, это неминуемо приводит к ее разложению. Распад спиртов и органических кислот представляет собой ту фазу, которая приводит к образованию простейших соединений углекислоты, воды, водорода и метана. Наличие в древесине растущих деревьев, пораженных бактериозом, метана может указывать на брожение клетчатки, иначе говоря, на разложение целлюлозы, что связано с разрушением оболочек клеток. Наличие свободного азота может свидетельствовать о редукции нитратов.

У некоторых фитопатогенных бактерий имеется хлорофиллаза, который расщепляет хлорофильные зерна, находящиеся в зеленых тканях растений. Под воздействием этого фермента происходит обесцвечивание листовой пластинки в виде различного рода пятнистостей, а в некоторых случаях и полностью. Листья и хвоя, например, становятся желтыми, а иногда даже и белыми (у белой акации, бархата амурского, сосны и пихты).

Одним из окисляющих ферментов, распространенным у фитопатогенных бактерий является тирозиназа, расщепляющая тирозин и превращающая его в меланин. Этим объясняется тот факт, что пораженная бактериозом поверхность раковых ран или древесины на воздухе быстро коричневеет или чернеет, в некоторых случаях принимает синевато-черную окраску. Особенно резко это проявляется при поражении бактериозом клена, ореха грецкого, бархата амурского и некоторых других пород.

Действие токсинов бактерий на растения слабо изучены. Токсины фитопатогенных бактерий в одних случаях легко выделяются из клетки в окружающую среду (экзотоксины), в других – тесно связаны с нею и выделяются при гибели бактерий (эндотоксины). Токсины играют большую роль при поражении растений бактериями и могут быть разнообразны даже у одного и того же вида возбудителя болезни. Очевидно, что под воздействием токсинов живые клетки будут отмирать. В результате массового размножения бактерий в тканях растений происходит накопление ядовитых продуктов их жизнедеятельности, нарушающих соответствующие ферментативные системы, обмен, что

приводит к гибели. Токсины фитопатогенных бактерий – вещества различной химической природы. Токсин, синтезируемый бактериями *Pseudomonas syringae*, является низкомолекулярным пептидом, ингибирующим синтез глутаминсинтетазы, которая необходима для образования хлорофилла. В результате на листьях появляются пятнистости. В качестве токсинов могут выступать полисахариды и гликопептиды слизистых слоев бактерий.

Некоторые виды фитопатогенов синтезируют фитогормоны, стимулирующих разрастание тканей растения с образованием опухолей, например, гетероауксин, индолилуксусная кислота, синтезируемая бактериями *Agrobacterium tumefaciens*. Опухоли могут вызывать сжатие проводящих сосудов с последующей гибелью растения. К фитогормонам относится также гиббереллин, который синтезируется бактериями и вызывает ненормальное удлинение побегов. Некоторые фитопатогенные бактерии – возбудители инфекционных заболеваний лекарственных растений представлены в таблице 13.

Таблица 13

*Фитопатогенные бактерии - возбудители
инфекционных заболеваний лекарственных растений*

Роды	Виды	Вызываемые заболевания
Erwinia	E. amylovora, E. tracheiphila E. carotovora, E. carotovora	Ожог, увядание Мягкие гнили
Pseudomonas	P. syringae, P. mellea. P. rhizogenes, P. tumefaciens.	Пятнистость Рак корней
Xanthomonas	X. campestris, X. heterocea	Пятнистость, увядание
Pectobacterium	P. phetophthorum, P. aroidae	Гнили
Rhizobium	R. leguminosorum	Рак, язвы
Agrobacterium	A. tumefaciens	Опухоли
Clavibacter	C. michiganense	Увядание
Streptomyces	S. scabies.	Парша картофеля

Характеристика фитопатогенных бактерий

Грамотрицательные

Род *Ervinia* относятся к представителям семейства Enterobacteriaceae. По форме – палочки, могут встречаться как одиночные, так и парами, или виде цепочек. Это подвижные микроорганизмы, в основном перитрихи. Спор и капсул не образуют. Факультативные анаэробы. Среди рода есть пигментообразующие (золотисто-жёлтые колонии на МПА) и не образующие пигмента микроорганизмы. Представители этого рода встречаются как на поверхности растений, так и в почве, особенно хорошо сохраняются на растительных остатках, способны вызывать гнили, увядания, некрозы, язвы.

Внутри рода выделяют две группы: группу бактерий «мягкой гнили» и группу бактерий, вызывающих увядание растений. Для бактерий, вызывающих гнили, характерна продукция пектолитических и других мацерирующих

ферментов, чаще загниванию подвержены овощные культуры. Бактерии, вызывающие увядания, включают два вида *E. amylovora* и *E. tracheiphila*. *E. amylovora* вызывает ожог у представителей семейства розоцветных, *E. tracheiphila* – бактериальное увядание огурцов. *E. amylovora* относится к наиболее вредоносным патогенам, пораженные им деревья имеют вид обгоревших, поражаются также цветки, плоды, побеги. Наиболее часто поражение происходит весной, цветки высыхают, чернеют, но остаются на деревьях. Пораженные плоды коричневеют и сморщиваются. Считают, что никакая другая болезнь плодовых не причиняет такого ущерба, особенно учитывая, что поражаются около 180 видов растений. Бактерии являются карантинным объектом.

Род Pseudomonas – многочисленная широко распространенная в природе группа бактерий, большинство видов которой являются сапрофитами, обитателями почвы, водоемов, где им принадлежит огромная роль в минерализации органического вещества. Наряду с сапрофитами, в состав рода включены и очень вредоносные фитопатогены. Представители данного рода являются аэробными палочками с полярно расположенными жгутиками. Хемоорганогетеротрофы, способны к росту на самых простых по составу средах. Характерным признаком *Pseudomonas* является способность к продукции пигментов, хотя данный признак не всегда является диагностическим. Для фитопатогенных представителей характерно образование желто-зеленых и синих флюоресцирующих пигментов. Такие пигменты традиционно называют флюоресцеинами, хотя в последнее время употребляют и термин «пиовердины». Бактерии рода *Pseudomonas* способны вызывать у растений пятнистости, некрозы, опухоли и гнили, которые обусловлены изменением метаболизма растительной клетки под влиянием веществ (ферменты, гормоны, токсины), выделяемых патогенами.

Род Xantamonas – прямые палочки. В мазке преимущественно одиночные. Спор и капсул не образуют. Подвижные, в основном монотрихи, хотя могут встречаться и перитрихи. Выделяют желтый пигмент и образуют колонии желтого цвета. При культивировании на питательных средах нуждаются в факторах роста и поэтому не растут на простых питательных средах. Основным видом является *X. campestris*, вызывающий сосудистый бактериоз у различных растений.

Род Agrobacterium – прямые палочки одиночные или парные. Подвижные микроорганизмы, в основном перитрихи. Спор и капсул не образуют. Среди рода есть пигментообразующие и не образующие пигмента микроорганизмы. Это факультативные анаэробы. При росте на среде с углеводами выделяют большое количество слизи. Бактерии рода *Agrobacterium* вызывают заболевания практически у всех представителей двудольных и некоторых голосеменных растений. Однодольные растения практически не поражаются. Отличительной особенностью бактерий этого рода является связь между развитием заболеваний и наличием в клетках крупных Ti- и Ri-плазмид, т.е. патогенность

агробактерий определяется наличием плазмид. Штаммы, несущие Ti-плазмиду вызывают развитие корончатых галлов или рака, наследующие Ri-плазмиду – волосатость корня. Особенность инфекционного цикла *A. tumefaciens* – возбудителя корневого рака плодовых – проявляется в его способности длительное время сохраняться в почве. Патоген проникает в растение через повреждения, которые вызывают различные причины (насекомые, механические повреждения при прививке). Бактерия стимулирует нерегулярное интенсивное деление клеток, вследствие чего образуются наросты – опухоли, галлы.

Представители рода *Pectobacterium* имеют палочковидные формы с перитрихальными жгутиками, способны разлагать пектин и вызывать мягкую (мокрую) гниль растений. Бактерии этого рода активны в биохимическом отношении и в своем развитии связаны с насекомыми. *Pectobacterium carotovorum* – возбудитель мокрой гнили моркови, лука, сердцевинной гнили стеблей махорки, редьки и многих других растений. Пораженная ткань размягчается вследствие разрушения срединных пластинок клеток под воздействием фермента протопектиназы и загнивает. *Pectobacterium phytophthorum* – возбудитель черной ножки стеблей, гнили клубней картофеля.

Род *Rhizobium* включает клубеньковые бактерии, которые внедряясь в клетки корней бобовых растений, вызывают их разрастание (образование клубеньков). В клубеньках бактерии с помощью фермента нитрогеназы включают молекулярный азот воздуха в химические соединения, которые усваиваются растениями. Поэтому, несмотря на некоторый вред, наносимый бактериями (отток питательных веществ в зараженные участки корня для формирования клубеньков и питания бактерий), присутствие ризобий в корнях дает ему большие выгоды.

Грамположительные

В группе коринеформных бактерий три рода бактерий имеют фитопатогенных представителей. Наиболее значимыми и распространенными являются бактерии рода *Clavibacter*. Клетки бактерий являются неподвижными полиморфными палочками, строгими аэробами, нуждающимися в некоторых факторах роста. Спор не образуют. Бактерии продуцируют большое количество разнообразных пигментов. Ранее представителей этого рода относили к роду *Corynebacterium*, из которого они в 1988 г. были выделены в отдельный род. Представители данного рода вызывают увядания растений, поражая на ранних стадиях болезни сосуды, а на более поздних и другие части растений. Больные растения отстают в росте, становятся карликовыми с большим количеством стеблей. Листья постепенно теряют зеленую окраску и коричневеют. Темнеют и пораженные сосуды, что особенно хорошо заметно на срезах. Типовым видом является *C. michiganense*.

Представители рода *Streptomyces* относятся к семейству Actinomycetaceae, образуют воздушный мицелий. Колонии складчатые, кожистые или мор-

щинистые. Наиболее экономически значимым из-за причиняемого ущерба является возбудитель парши картофеля *S. Scabies*.

Заражение растений фитопатогенными бактериями происходит через инфицированные семена, почву, грунтовые и дождевые воды, насекомых, а в некоторых случаях, и через воздух. Воздух, как путь распространения бактериальных болезней растений, может иметь значение при наличии массового источника, от которого и переносятся возбудители. Однако роль воздуха в передаче бактериозов ограничена. Возбудители грибковых и бактериальных болезней растений более тесно, чем возбудители заболеваний человека и животных, связаны с почвой, что обусловлено особенностями жизни растений.

Важна роль погибших растений в передаче и распространении болезней, особенно бактериальных, так как почва, содержащая остатки неперегивших полностью больных растений, бывает главным источником инфекта. Однако следует помнить, что фитопатогенные бактерии не могут длительно существовать в почве из-за антагонистического действия других бактерий, актиномицетов и грибов.

Проникновение бактерий в ткани растений до некоторой степени сходно с проникновением бактерий в животные ткани, особенно тогда, когда это сопровождается выделением микробами ферментов, растворяющих межклеточное вещество, и ядовитых веществ, которые убивают клетки, либо уменьшают их сопротивляемость микроорганизмам. При этом клетки мацерируются и отслаиваются друг от друга, что облегчает бактериям или грибам доступ внутрь растительных тканей.

При развитии бактериозов могут отмечаться как общие (диффузные), так и местные поражения. При диффузных бактериозах возбудитель проникает в сосудистую систему, распространяется в проводящих пучках и прилегающих к ним тканях. Нарушается нормальное поступление воды и растение погибает. Основным симптомом является увядание. Например, развитие *Clavibacter michiganensis* на растениях томатов вначале проявляется лишь на листьях, затем – на побегах, в итоге растение увядает. Гибель растения – одна из основных причин высокой вредоносности возбудителей диффузных бактериозов. Местные бактериозы проявляются в поражении паренхиматозных тканей, отдельных органов растений, плодов, побегов. Их основные симптомы – некрозы, хлорозы, гнили, опухоли. Некрозы бактериальной этиологии представляют собой участки отмершей ткани, черной или бурой окраски, которые могут возникать на всех надземных частях растения. Например, некрозы, вызванные *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, приводят к уменьшению ассимиляционной поверхности, отмиранию отдельных побегов, гибели завязей и, в итоге, к существенному уменьшению урожая. Поражение сочных, богатых углеводами тканей приводит к появлению гнилей. Под действием ферментов бактериальных клеток, разрушается межклеточное вещество (мацера-

ция ткани), что типично для бактерий *Erwinia*. Относительно редко встречается образование опухолей, что свойственно бактериям рода *Agrobacterium*. При заражении некоторыми видами бактерий могут проявляться одновременно несколько симптомов поражения. Хлорозы часто сопровождают развитие некрозов, зоны их могут сливаться. Возбудитель бактериального рака томатов вызывает увядание, растрескивание стеблей и пятнистость плодов; возбудитель «черной ножки» – увядание стеблей в период вегетации и гниль клубней в период вегетации и при хранении.

Таким образом, для бактериозов характерны следующие свойства:

- патогены бактериальной природы не способны проникать в растительные организмы через неповрежденные покровные ткани;
- заражение растений зависит от наличия капельно-жидкой влаги;
- перенос на значительные расстояния по воздуху ограничен;
- системный характер инфекции, т.е. наблюдается пассивное распространение бактерий в тканях растения через сосудистую систему, заселение соседних тканей и проникновение в семена и т.д.;
- отсутствие для большинства представителей покоящихся форм и неспособность длительное время выживать в почве.

Фитопатогенные микоплазмы (фитоплазмы). Роль микоплазм как возбудителей заболеваний растений была впервые доказана в 1967 г. при проведении электронно-микроскопического анализа некоторых пораженных растений. До этого времени часто смешивали заболевания, вызываемые вирусами и микоплазмами из-за сходства симптомов. Однако, в развитии таких заболеваний существует ряд различий:

1) микоплазмы переносятся только насекомыми (главным образом цикадами, листоблошками (ксиллидами), повиликой), а период их инкубации и размножения в переносчике достаточно продолжителен: от 2 недель до 1,5 месяцев. Видовое разнообразие для каждого возбудителя достаточно широко и практически соответствует кругу питающих переносчика растений;

2) возбудители термолabileльны как в растении, так и в переносчике и повышением температуры можно добиться их аттенуации;

3) инокуляция соком больного растения стерильной особи насекомого переносчика приводит к заражению последнего, при этом в ткани переносчика появляются частицы, превосходящие по размерам известные вирусы.

В настоящее время известно более 200 видов растений, поражаемых микоплазмами. Общим для этих заболеваний является распространение их в зонах с умеренным и теплым климатом, благоприятствующим развитию сосущих насекомых – основных переносчиков. Наиболее вредоносными микоплазмозами считаются микоплазмозы пшеницы, пасленовых, винограда и некоторых древесных культур.

Взаимодействие микоплазм с их клетками растений-хозяев происходит в три этапа.

Первый этап. Проникновение микоплазм в молодые паренхиматозные клетки флоэмы, где они взаимодействуют с мембранными элементами клетки. Реакция клетки-хозяина проявляется в образовании отдельных выростов мембраны, направленных в сторону клеток микоплазм. Мембранные структуры растительных клеток разбухают и сливаются с мембранными структурами микоплазм.

Второй этап. Дальнейшее развитие инфекции характеризуется нарушением нормального метаболизма растительной клетки. На 3–4 сут. цитоплазма инфицированных молодых клеток темнеет от насыщения рибосомами и полисомами, что свидетельствует об усилении метаболизма пораженных клеток.

Третий этап. В хлоропластах содержится повышенное количество крахмала, что приводит к развитию хлороза и разрушению клеток.

Фитопатогенные представители обнаруживаются в трех семействах микоплазм: *Acholeplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma*. К числу наиболее часто встречающихся у микоплазм факторов патогенности можно отнести продукцию фитотоксинов и ферментов. *Spiroplasma citri* образует два типа токсинов, которые вызывают увядание растений и задерживают прорастание семян. Еще одним из факторов патогенности можно также считать конкуренцию микоплазм с растениями-хозяевами за определенные продукты метаболизма (сахара, аминокислоты).

Микоплазмозы относятся к заболеваниям катастрофическим, часто принимающим характер эпифитотий. При заселении микоплазмами проводящей системы растений и выделении ими продуктов жизнедеятельности обычно происходит усиленное образование дегенеративных клеток флоэмы, в результате больные растения становятся карликовыми, желтушными и увядают. Обычно в пораженных микоплазмами растениях нарушаются процессы регуляции роста, образуются в избытке придаточные почки и побеги, нарушается доминирование верхушки. Растения приобретают вид «ведьминой метлы» из-за образования дополнительных боковых побегов. У них уменьшается размер междоузлий (карликовость), листьев, изменяются генеративные органы, что приводит к бесплодию. После поражения прекращается плодоношение. Из 40 наиболее известных микоплазмозов пасленовых самыми вредоносными считаются «ведьмины метлы» картофеля и столбур томатов.

Фитопатогенные вирусы и вириды. *Вирусы* – мельчайшие (субмикроскопические) возбудители болезней растений, животных и человека, не имеющие клеточного строения и способные размножаться только в живых клетках растения хозяина. Зарегистрировано примерно 600 фитопатогенных вирусов. Большинство вирусов относится к семейству *Reoviridae*, родам *Phytoreovirus*, *Fijvirus*.

При вирусной инфекции имеет место облигатный тип паразитизма, причем его абсолютная форма.

Вирусы растений имеют палочковидную (вирус табачной мозаики), нитевидную (Х-вирус картофеля, тристеза цитрусовых), сферическую (некроз табака) и бациллоидную (штриховатая мозаика пшеницы) формы. Размер вирусов составляет от 25 нанометров (нм) у вируса некроза табака, и до 2500 нм у вируса тристезы цитрусовых. Большинство вирусов растений содержит одноцепочечную линейную РНК, реже встречаются вирусы с двух цепочечными молекулами РНК, закрученными в спираль. Лишь немногие вирусы растений (вирус мозаики цветной капусты) имеют в своем составе ДНК.

Механизм размножения вирусов отличается от способов размножения других микроорганизмов. В клетках зараженного растения вирус репродуцируется путем синтеза отдельных молекул нуклеиновых кислот и белка и последующей сборки из них вирионов. Нередко вирионы агрегируют друг с другом, образуя вирусные включения – кристаллы различной формы (кристаллы Ивановского), или, если вирионы соединяются с уплотнениями цитоплазмы, образуются включения в виде аморфных тел.

Вирусы, вызывающие болезни растений, могут распространяться различными путями. Многие вирусы распространяются переносчиками, которые питаются или паразитируют на растениях. Это главным образом насекомые, клещи, нематоды, грибы и паразитические цветковые растения (повилика). Лишь сравнительно небольшое количество фитопатогенных вирусов передается насекомыми с грызущим ротовым аппаратом – такая передача малоспецифична и имеет значение только для вирусов, способных сохраняться в соке больного растения. В зависимости от особенностей передачи насекомыми вирусы делят на персистентные и непersistентные. Персистентные вирусы сохраняют свою инфекционность в организме переносчика в течение нескольких дней, а иногда в течение всей жизни. Непersistентные вирусы могут быть переданы переносчиками в течение ограниченного промежутка времени, часто не более часа. Вирусы могут передаваться контактно-механическим путем, т. е. при взаимоповреждающем контакте частей здорового и больного растения. Это происходит при соприкосновении надземных или подземных частей растений. Часть вирусов (около 20%) способна передаваться через семена. Некоторые вирусы плодовых и ягодных культур могут передаваться через пыльцу. У вегетативно размножаемых культур (картофель, земляника, тюльпан и др.) вирусы распространяются в основном с посадочным материалом. При различного рода прививках (трансплантации) происходит распространение вирусных болезней. Этим методом передаются все известные фитопатогенные вирусы. Единичные вирусы (вирус мозаики табака, вирус некроза табака) могут передаваться с растительными остатками, с почвой, с гидропонными растворами. Небольшое значение (для вирусов кормовых бобовых трав) имеет место распространения вирусов через стебли повилики.

По характеру воздействия на поражаемое растение вирусы делят на две большие группы – вирусы мозаичного типа (мозаика) и вирусы желтушного

типа (желтуха).

Мозаика характеризуется неравномерной расцветкой пораженных органов (листьев), при которой участки с нормально зеленой окраской чередуются со светлоокрашенными пятнами разной величины и формы. Такую мозаичную расцветку листа хорошо наблюдать при прохождении через него света или на фоне белой бумаги. Кроме изменения окраски при мозаичных заболеваниях наблюдается изменение формы листовой пластинки: морщинистость, курчавость, возникающие вследствие того, что жилки листа задерживаются в росте, а мякоть листа продолжает разрастаться, а также уменьшение размеров листа. При некоторых болезнях мозаичная расцветка обнаруживается на лепестках цветков, как, например, при мозаике тюльпана. При мозаичном заболевании томата такая расцветка заметна на незрелых плодах. Мозаичные болезни вызывают отставание в росте, но резко выраженной задержки роста и развития не наблюдается.

При мозаичных болезнях патологические изменения наблюдаются преимущественно в хлорофиллоносных тканях (паренхима листьев). Мозаика проявляется в распаде хлоропластов и поражении палисадной паренхимы. Эти морфологические изменения ведут к ослаблению фотосинтеза, а затем к отмиранию отдельных клеток и участков тканей. При некоторых заболеваниях происходят изменения в анатомическом строении отдельных органов. Например, в хлоротических участках листьев табака, пораженного мозаикой, клетки палисадной паренхимы по форме приближаются к клеткам губчатой паренхимы, а лист становится тоньше. К типу мозаичных болезней относятся: мозаики табака, свеклы, картофеля, малины, сливы, вишни и др.

Желтухи характеризуются равномерным обеднением листьев хлорофиллом, вследствие чего они приобретают желтоватую или светло-зеленую окраску – общий хлороз. В листьях много накапливается крахмала, и они становятся более жесткими и хрупкими. При желтухе сахарной свеклы, например, листья при сжатии не мнутся, а ломаются с хрустом. То же отмечается для листьев картофеля, пораженного вирусом скручивания.

При поражении желтухами наблюдается сильная задержка роста и развития растения и различные уродства цветков. При столбуре томата наблюдается гипертрофия чашелистиков, которые могут срастаться, образуя колокольчик; лепестки недоразвиваются и остаются зелеными. При закукливании овса наблюдается гипертрофия пестика, сохраняющего зеленую окраску. Часто наблюдается пролиферация – ненормальное израстание цветка.

Вирусные болезни типа желтухи поражают преимущественно проводящую систему, вызывая в ней патологические изменения: гипертрофию ситовидных трубок, омертвление клеток. Вследствие поражения ситовидных трубок задерживается отток питательных веществ, вырабатываемых листьями, а клетки бывают переполнены продуктами фотосинтеза (крахмалом). Анатоми-

ческие изменения происходят при некоторых заболеваниях и касаются редукции клеток. В частности, сильная редукция величины клеток наблюдается в тканях карликовых растений овса, пораженного вирусом закукливания, и в нитевидных ростках клубней картофеля, пораженного столбурным увяданием. К желтухам относятся: мозаика пшеницы, закукливание злаков, столбур пасленовых, скручивание листьев картофеля и др.

По характеру проявления симптомы вирусных болезней растений можно разделить на 5 основных типов:

1. Угнетение роста.
2. Изменение окраски листьев, которые приобретают мозаичную расцветку.
3. Деформация органов.
4. Локальные некрозы.
5. Нарушение репродуктивных функций растений.

При одном и том же вирусном заболевании на растении обычно проявляется несколько типов симптомов. Симптомы вирусных заболеваний могут изменяться по мере развития патологического процесса.

Вредоносность вирусных заболеваний проявляется, главным образом, в снижении урожайности растений и ухудшении качества продукции. Особый вред вирусы наносят при выращивании семенного и посадочного материала. Поражение вирусами отрицательно влияет на пищевую и кормовую ценность продукции, пригодность её к промышленной переработке. Вирусы вызывают у растений стерильность и несовместимость, что отрицательно сказывается на работе селекционеров. У цветочных культур теряется декоративность, что наносит значительный экономический ущерб. Под действием вирусов теряются сортовая чистота, холодостойкость, зимостойкость, снижается всхожесть семян. В среднем размер убытков от развития вирусных болезней составляет примерно 20% общего экономического ущерба, обусловленного деятельностью всех групп возбудителей болезней и вредителей сельскохозяйственных культур.

Вироиды как новый класс патогенов был открыт Т. Динером в 70-х годах XX в. К этой группе фитопатогенов относят вирусоподобные инфекционные агенты, представляющие собой низкомолекулярную одноцепочную РНК, ковалентно замкнутую, имеющую низкую молекулярную массу ($2,5 \times 10^4$ – 15×10^4), являющуюся носителем инфекционности и использующую для своей репликации биосинтетическую систему клетки растения-хозяина.

Вироиды были идентифицированы как возбудители опасных болезней. Один из них стал причиной гибели миллионов кокосовых пальм на Филиппинах за последние пятьдесят лет, другой нанес урон промышленному разведению хризантем в США в начале 1950-х гг. Первый вироид веретенovidности клубней картофеля, или PSTV был идентифицирован в 1971 г. Это самый крупный из известных вироидов; его РНК состоит из 359 нуклеотидов и имеет

форму либо замкнутого кольца, либо структуру типа шпильки. Комплементарные пары оснований соединены водородными связями, образуя двунитевую РНК. Вироиды обнаружены только в ядрах инфицированных клеток. Они реплицируются подобно вирусам, т.е. синтезируют комплементарную цепь, которая функционирует как матрица. При этом виroidы используют ферментные системы клетки-хозяина.

Вироиды характеризуются высокой инфекционностью, термостабильностью, стойкостью к воздействию различных химических соединений. Вироиды распространяются с посадочным материалом, с семенами, передаются от растения к растению механическим путем. Так, виroid экзокортиса цитрусовых быстро распространяется при прививках.

Наиболее характерные симптомы виroidозов: угнетение роста, уменьшение размеров растения и отдельных его органов (листьев, цветков, плодов), ослабление интенсивности окраски, хлороз и антоцианоз листьев, деформация различных органов.

Фитопатогенные грибы. Грибы, вызывающие заболевания лесных пород и культурных растений, наносят огромный ущерб. Массовые грибковых заболевания растений (эпифитотии) могут быть причиной голода населения целых стран. Болезни снижают потенциальный урожай на 10–20% и более. Поражая лекарственные растения, грибы, как и другие микроорганизмы, делают их непригодными для использования в качестве сырья в фармацевтической промышленности.

Фитопатогенные грибы подразделяют на экто- и эндопаразиты. *Эктопаразиты* распространяются преимущественно по листьям, внедряясь в клетки хозяина только специализированными органами (например, гаусториями), и спороносят на его поверхности. К ним относятся возбудители мучнистой росы злаков, тыквенных, табака, картофеля. *Эндопаразиты* развивают свой таллом внутри хозяина, при спороношении они выходят наружу.

В зависимости от типа взаимоотношения гриба и растения-хозяина различают облигатные и факультативные паразиты. Первые поражают только живые ткани и не растут на обычных питательных средах. К таким грибам относятся, например, *Russinia graminias* (черная ржавчина злаков) и *Peronospora tabacina* (ложная мучнистая роса табака). Факультативные паразиты также поражают живые ткани растения, но после его отмирания не погибают, они могут расти на лабораторных питательных средах. К ним относятся многочисленные грибы, разрушающие древесину.

Фитопатогенные грибы различаются по специфичности выбора растения-хозяина. Например, среди возбудителей мучнистой росы *Erisiphales* имеются как виды, поражающие только определенные расы хозяина, так и грибы, которые поражают растения из разных порядков. Ржавчинные грибы *Russinia graminis* в гаплофазе развивается на барбарисе, а в дикариотической – на злаках.

Некоторые паразитические грибы предпочитают отдельные органы растений. Например, пурпурная спорынья *Claviceps purpurea* инфицирует только завязи злаков, *Ustilago violacea* (возбудитель головни злаков) – только тычинки. Грибы рода *Verticillium* развиваются в сосудах растения, нарушая движение соков, что приводит к его увяданию и гибели. Гриб проникает в ткань растения через устьица или через раны на его поверхности; они способны прорывать поверхностные структуры своими инфекционными гифами. Далее гриб распространяется по растению, что сопровождается появлением симптомов его заболевания. На следующей стадии инфекционного процесса гриб развивает органы спороношения, а реакция растения зависит от количества и качества возбудителя заболевания.

МЕРЫ ПРОФИЛАКТИКИ И БОРЬБЫ С ИНФЕКЦИОННЫМИ БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ

Растительный организм обладает защитными механизмами, противодействующими внедрению и размножению фитопатогенных бактерий. Эта защита обеспечивается за счет совокупности наследственных и приобретенных свойств, создающих возможность организму противодействовать внедрению и размножению болезнетворных микробов и их ядовитых продуктов. Сюда можно отнести особенности строения покровных тканей, реакцию клеточного сока, наличие в тканях каких-либо веществ, вредно влияющих на микроорганизмы, и т.д. Растения могут также проявлять активные реакции против болезнетворных агентов: образование некрозов, антиферментов, внутриклеточное переваривание паразита и прочее.

Устойчивость растительных организмов может быть специфически или неспецифически повышена благодаря применению различных веществ.

К специфической резистентности можно отнести явления устойчивости, выработанные к определенному паразиту. Например, проращивание семян пшеницы в экстрактах гриба *Helminthosporium sativum* создает устойчивость растения к этому микроорганизму.

К неспецифической резистентности относятся явления устойчивости, создаваемые путем обработки семян химическими веществами или введением химикатов в растительный организм, путем внекорневой подкормки (опрыскивание растений) или внесением химических веществ в почву.

Меры профилактики

Некоторые болезни передаются семенами, поэтому важным мероприятием оказывается обеззараживание семян. Одним из источников инфекции являются опавшие на поверхность почвы пораженные растительные остатки. Поэтому эффективна глубокая зяблевая вспашка, способствующая перемещению паразитов вглубь почвы, где они погибают под антагонистическим воздействием бактерий и актиномицетов или поедаются простейшими животными. Важное значение имеет сбор и уничтожение опавших листьев, плодов,

ветвей, правильный севооборот, препятствующий накоплению в почве заразного начала. Широко используются меры химической защиты растений. Большое значение имеет правильная обработка почвы и внесение удобрений, что повышает сопротивляемость культурных растений. Весьма важны выведение и подбор устойчивых к заболеваниям сортов, интересны также сверхчувствительные сорта, быстрая гибель которых ведет к прекращению развития паразитического гриба. Инфекцию могут распространять также и зеленые растения, в которых бактерии хорошо сохраняются и переносятся в новые районы страны вместе с зараженными растениями (черенки, окулировочные материалы – глазки). Одним из основных источников заражения бактериозами являются остатки больных растений. Особенно долго и хорошо фитопатогенные бактерии сохраняются в деревянистых частях растений. Некоторые виды насекомых также могут являться источником первичной инфекции. Большую опасность в распространении бактериозов представляют капельки дождя с мелкими частицами остатков больных растений, которые ветром и воздушными течениями разносятся на далекие расстояния (воздух сам по себе не играет роли в непосредственной передаче).

Борьба с уже развившимися болезнями растений может быть 'подразделена на следующие категории:

- 1) карантинные мероприятия, обеспечивающие охрану территории от завоза из других стран возбудителей болезней растений и осуществляемых специально организованной государственной службой карантина растений;
- 2) физико-химические и биологические меры защиты, когда удаляют больные растения, изолируют здоровые, обрезают и удаляют больные части растений, уничтожают промежуточных хозяев и переносчиков болезней, собирают и уничтожают плодовые тела грибов, собирают и сжигают опавшие листья (хвою), дезинфицируют почву, производят лечение ран, обеззараживание семян, опрыскивание и опыление фунгицидами, вводят лечебные составы, используют миколитические бактерии или грибы-паразиты второго порядка, антибиотики (в том числе фитонциды) и др.

МИКРОФЛОРА РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ

Обсемененность микробами растений, в том числе и лекарственных, может быть очень высокой и зависит от условий их произрастания, от характера растения, высоты стебля и других причин. Микрофлора растений, а, следовательно, растительного лекарственного сырья, чрезвычайно разнообразна. На поверхности растений обнаруживаются представители микрофлоры почвы, среди которых основное место занимают спорообразующие бактерии, актиномицеты и грибы.

Особенно сильно заселяются микробами срезанные и сорванные растения, так как они являются лучшей питательной средой, чем живые растения.

Среди микроорганизмов, встречающихся на растениях и в растительном лекарственном сырье, могут встречаться фитопатогенные виды, т.е. виды, вызывающие заболевания растений. Некоторые виды микроорганизмов, находящиеся в лекарственном растительном сырье, обладающие сильной ферментативной активностью, могут при соответствующих условиях разрушать фармакологически активные вещества, тем самым, снижая ценность лекарства.

Консервирование лекарственного сырья и условия его хранения оказывают существенное влияние на микробную обсемененность. При хранении в условиях повышенной влажности микроорганизмы не только более длительно сохраняют жизнеспособность, но могут размножаться и вызывать порчу лекарственного сырья. Порчу лекарственного сырья обнаруживают по изменению цвета высушенного растения, появлению очагов размножения плесени и др.

Лекарственное растительное сырье может обсеменяться микробами на всех этапах заготовки (сбор, первичная обработка, сушка, измельчение, упаковка) и хранения. В аптечных условиях растительное сырье сохраняется, как правило, в измельченном виде, а это значительно увеличивает поверхность материала, и, следовательно, опасность его отсыревания, порчи. При хранении сырья важно соблюдение санитарного режима в аптеках. Неблагоприятное действие оказывают: влажность, пыль, насекомые и другие факторы, повышающие микробное обсеменение и приводящие к порче лекарственного сырья. Внешними проявлениями микробной порчи растительного сырья являются изменение цвета и консистенции, загнивание, плесневение всего растения или его частей. Гниение растительных материалов сопровождается определенным чередованием микрофлоры, (грибы – бактерии), что зависит от качества и глубины расщепления веществ, от рН среды и других причин и использование такого недоброкачественного сырья становится бесполезным.

Недоброкачественное сырье не только бесполезно, но и вредно больному человеку, так как при этом резко снижается содержание или полностью исчезают фармакологически активные вещества, сырье не оказывает необходимого влияния на патологический процесс, а имеющиеся микроорганизмы и продукты их обмена могут ухудшить его состояние.

В связи с этим для предупреждения возможности загрязнения лекарственных средств необходимо соблюдать следующие правила:

1. Использовать сырьё, не повреждённое микроорганизмами.
2. Правильно транспортировать хранить сырьё и готовые лекарственные формы, соблюдая санитарно-гигиенические требования.
3. Соблюдение санитарно-гигиенических норм на этапах технологического процесса (стерилизация, дезинфекция, дератизация и прочее: надёжность упаковочного материала, тары).
4. В лекарственных формах, предназначенных для многократного пользования должен добавляться консервант.
5. Соблюдение правил личной гигиены.

Применительно к различным лекарственным растениям, видовой состав микроорганизмов будет разным. Это зависит от структуры и количества действующих начал, а также других веществ, подвергающихся ферментативному расщеплению в условиях хранения.

Чаще всего портятся плоды, ягоды и корневища, богатые сахаристыми веществами. Более устойчивыми оказываются сухие листья, корни, кора.

Состав микроорганизмов зависит от вида лекарственного сырья, его структуры и фармакологических свойств. Преобладают грибы (*Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Accharomyces*, *Candida*, *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Actinomyces*, иногда – *Sporotrichum* и др), актиномицеты, спорообразующие виды бактерий (*B. subtilis*, *B. mesenterium*) а также неспоровые (*Chromobacterium aurantiacum*, *Phylomonas* и др).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ

Приготовление смывов: в асептических условиях (в стерильной чашке Петри, обожженными ножницами и пинцетом) из листа или верхнего слоя корневища вырезают кусочек площадью 1 см² или берут 1 г лекарственного сырья, которые помещают в пробирку с 10 мл стерильного физиологического раствора и взбалтывают в течение 5 мин. Из полученного смыва готовят четыре десятикратных разведения (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000), для посева используют два последних разведения в связи с большой обсемененностью растительного сырья.

Определение микробной обсемененности: в стерильную чашку Петри вносят 1 мл смыва, после чего в нее наливают 15 мл расплавленного и остуженного до 45 °С МПА, перемешивают и после застывания агара посевают инкубируют при 37 °С 24–48 ч. Производят подсчет выросших колоний на поверхности и в глубине агара. Полученное число колоний следует умножить на степень разведения.

Выявление обсемененности растительного лекарственного сырья дрожжевыми и плесневыми грибами: для выявления дрожжевых и плесневых грибов смыв из растительного лекарственного сырья по 0,5 мл засевают газоном на поверхность двух чашек Петри с твердой средой Сабуро. Посевы инкубируют при температуре 20–22 °С в течение 4 сут. После инкубации подсчитывают число колоний плесневых и дрожжевых грибов на обеих чашках Петри и определяют среднее арифметическое из суммарного числа колоний. Увеличивая полученный результат в 2 раза, определяют количество дрожжевых и плесневых грибов в 1 г или 1 см² исходного сырья.

Допускается содержание в 1 г или 1 см² лекарственного сырья не более 10⁴ микроорганизмов, из них до 10³ грибов.

Раздел 4. ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

4.1. ИНФЕКЦИЯ. ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

Основные формы инфекции

Инфекция – процесс взаимодействия между микроорганизмом и макроорганизмом, протекающий в конкретных условиях внешней и социальной среды. *Инфекционный процесс* представляет собой совокупность физиологических и патологических реакций, развивающихся в макроорганизме в процессе инфекции.

Инфекционное заболевание – есть одна из форм инфекционного процесса.

Развитие инфекции обусловлено несколькими факторами: состоянием защитных сил организма, свойствами возбудителя заболевания и его инфицирующей дозы, условиями внешней среды, путями передачи и входными воротами инфекции.

Формы инфекции. В зависимости от свойств, природы возбудителя, его локализации в макроорганизме, путей распространения, состояния макроорганизма различают следующие основные формы инфекции: 1) экзогенная форма возникает в результате проникновения патогенного микроорганизма извне – от больных или бактерионосителей, из окружающей среды с водой, пищей, воздухом, почвой; 2) эндогенная форма инфекции вызывается условно-патогенными микроорганизмами – представителями нормальной микрофлоры организма в результате снижения резистентности макроорганизма (переохлаждение, травма, оперативные вмешательства, иммунодефицитные состояния).

Инфекции также подразделяют на острые и хронические. Острая инфекция характеризуется внезапным началом и кратковременным течением. Хроническая инфекция протекает длительно, и возбудитель может находиться в макроорганизме в течение нескольких месяцев или лет.

По локализации возбудителя в макроорганизме различают очаговую форму инфекции, при которой микроорганизм локализуется в одном конкретном очаге и генерализованную, когда возбудитель распространяется по всему макроорганизму лимфогенным и гематогенным путем. В этом случае развивается бактериемия или вирусемия. При сепсисе в крови больного происходит размножение возбудителя. В случае возникновения гнойных очагов во внутренних органах развивается септикопиемия. Поступление в кровь токсинов микроорганизмов носит название токсинемии.

В зависимости от количества видов микроорганизмов, вызывающих заболевание, различают моноинфекцию и смешанную (микст)-инфекцию.

Моноинфекция вызывается одним видом микроорганизма, смешанная

инфекция – двумя или несколькими видами.

Реинфекция – это заболевание, вызванное повторным заражением организма тем же возбудителем после выздоровления.

Суперинфекция – повторное инфицирование макроорганизма тем же возбудителем до его полного выздоровления.

Рецидив – возврат клинических симптомов болезни, без повторного заражения микроорганизмами, за счет оставшихся возбудителей в макроорганизме.

Вторичная инфекция – к развивающейся первичной инфекции присоединяется другая инфекция, вызываемая новым видом возбудителя.

Аутоинфекция – развитие инфекционного процесса, вызванного собственной микрофлорой, чаще всего условно-патогенной.

Кроме того, инфекции принято делить по наличию симптомов на: манифестные инфекции – имеют выраженную симптоматику и бессимптомные инфекции – заболевание не имеет выраженных симптомов.

Типичная инфекция – при развитии заболевания клинические симптомы характерны для данной болезни.

Атипичная инфекция – клинические симптомы болезни стерты, носят невыраженный характер. Такое течение болезни связывают со слабой вирулентностью возбудителя, высокой напряженностью иммунитета, либо эффективным лечением.

Медленные инфекции – характеризуются длительным инкубационным периодом, прогрессирующим течением болезни, слабым иммунным ответом и неблагоприятным исходом. Возбудитель сохраняется в организме человека продолжительное время (месяцы, годы) в латентном состоянии, и при благоприятных для него условиях начинает активно размножаться и вызывать тяжелое заболевание.

Персистентная инфекция – возбудитель, проникая в организм, вызывает заболевание, но под воздействием активного лечения химиопрепаратами и приобретенным специфическим иммунитетом подвергается L-трансформации. Такие формы бактерий не чувствительны ко многим химиопрепаратам, а также к антителам и могут длительное время персистировать в организме больного. При определенных условиях (снижении резистентности организма, прекращении лечения) возбудитель восстанавливает свои патогенные свойства и вызывает рецидив болезни.

Латентная (инаппарантная) инфекция. Заболевание протекает скрытно, без внешних клинических симптомов.

Бактерионосительство. После латентной инфекции или перенесенного инфекционного заболевания организм человека не в состоянии освободиться от возбудителя – эта форма инфекции называется бактерионосительством или вирусоносительством. Это состояние формируется при слабой напряженности

постинфекционного иммунитета. При этом человек после клинического выздоровления становится носителем возбудителя в течение многих месяцев и лет, являясь источником инфекции для окружающих.

Абортивная инфекция – возбудитель проникает в макроорганизм, но не размножается в нем, но в связи с высокой резистентностью организма, инфекционный процесс не развивается.

Основные источники инфекции. Пути и способы заражения.

Входные ворота инфекции

Основными *источниками* инфекции могут быть:

- 1) больной человек, бактерионоситель (вирусоносительство), реконвалесцент;
- 2) животные;
- 3) объекты окружающей среды.

Заражение человека от больного может происходить в течение всего периода болезни. При бактерионосительстве выделение возбудителя продолжается после клинического выздоровления пациента. Заболевания (холера, брюшной тиф и т.д.), которыми болеет только человек, называют *антропозными*.

Источником инфекции также являются и животные. Человек заражается непосредственно от больного животного при контакте с ним или при употреблении в пищу инфицированных продуктов, через укусы кровососущих переносчиков. Заболевания, которыми болеет человек и животные, называют *зооантропонозные* (бруцеллез, чума, лептоспироз).

Объекты внешней среды служат естественной средой обитания некоторых патогенных бактерий или могут быть контаминированы выделениями человека и животных.

Механизм передачи – это совокупность эволюционно сложившихся способов перемещения возбудителя инфекционной (паразитарной) болезни от источника в восприимчивый организм. Каждый механизм передачи может реализоваться посредством одного или нескольких путей передачи.

Существует несколько механизмов передачи возбудителя инфекции, каждый из которых включает в себя пути передачи возбудителя инфекции:

1. *Аспирационный* механизм. Пути передачи – воздушно-капельный, воздушно-пылевой. Факторы передачи – жидкий и сухой аэрозоль.
2. *Фекально-оральный* (для антропонозов), *алиментарный* механизм. Пути передачи – водный, пищевой, бытовой. Факторы передачи – вода, продукты питания, руки, мухи, почва.
3. Механизм передачи – *контактный*. Пути передачи – прямой контакт (контактно-половой), контактно-бытовой. Факторы передачи – слизь, гной, серозное отделяемое, предметы обихода, почва, вода.

4. Механизм – *трансмиссивный*. Пути передачи – инокуляционный, контакционный. Факторы передачи – кровососущие членистоногие, слюна кровососущих, коксальная жидкость клещей.

5. Механизм – *вертикальный*. Путь – трансплацентарный. Факторы передачи – кровь матери.

6. Механизм – *искусственный*. Путь передачи – парентеральный. Факторы передачи – медицинский и немедицинский инструментарий.

Ворота инфекции. Место проникновения возбудителя во внутреннюю среду макроорганизма называют входными воротами инфекции. Заражение человека происходит через поврежденную кожу, слизистые оболочки пищеварительного и дыхательного путей, мочеполовую систему. Заражение через неповрежденную кожу встречается редко (лептоспироз).

В зависимости от вида возбудителя и его свойств дальнейшее распространение по организму будет происходить лимфогенным, гематогенным или нейрогенным путем. Некоторые микроорганизмы начинают размножаться на месте внедрения, вызывая очаговую инфекцию. Распространение возбудителя по всему организму вызывает генерализацию инфекционного процесса.

Периоды инфекционного процесса

Отличительной особенностью инфекционного заболевания является, циклическое течение со сменой периодов: *инкубации, продромы, развития болезни, выздоровления реконвалесценция*.

Инкубационный период – период времени от момента внедрения возбудителя в макроорганизм и до появления первых клинических симптомов болезни. При каждом инфекционном заболевании продолжительность инкубационного периода различна и колеблется в широких пределах – от нескольких часов (грипп) до нескольких месяцев (гепатит В). Длительность инкубационного периода зависит от вида микроорганизма, инфицирующей дозы, его вирулентности, пути проникновения в организм и от состояния макроорганизма. Инкубационный период связан с адгезией и колонизацией клеток макроорганизма возбудителем в воротах инфекции. Признаков заболевания в данном периоде еще нет, но в организме уже происходят начальные проявления патологического процесса в виде морфологических изменений, обменных и иммунологических сдвигов и др. Если макроорганизм окажется не способен обезвредить возбудитель, развивается следующий период заболевания.

Продромальный период характеризуется появлением первых общих признаков заболевания без четкой характерной симптоматики для данного инфекционного процесса. Развиваются неспецифические общие для многих заболеваний симптомы в виде лихорадки, недомогания, снижения аппетита, общей слабости, головной боли, субфебрильной температуры. Продолжительность

продромального периода 1–3 сут, но может увеличиваться до 10 дней и зависит от этиологии инфекционного заболевания. Отсутствие продромального периода может свидетельствовать о тяжелой форме инфекционного процесса. В продромальном периоде возбудитель интенсивно размножается в месте его локализации, продуцирует соответствующие токсины и инвазируется в ткани.

Период развития болезни. В период развития болезни наряду с общими неспецифическими признаками проявляются характерные симптомы для данного заболевания. Наиболее типичными признаками инфекционной болезни являются лихорадка, воспаление, явление поражения центральной и вегетативной системы, нарушение функций сердечно-сосудистой системы и органов пищеварения. При некоторых заболеваниях появляются кожные высыпания, желтуха и другие симптомы. В данный период возбудитель заболевания активно размножается в организме, происходит накопление токсинов и ферментов, которые поступают в кровь и вызывают синдром интоксикации или токсикосептический шок. В период разгара болезни происходит активная перестройка иммунологической реактивности организма и выработка специфических антител класса IgM, с последующим синтезом IgG.

Больной в этот период является наиболее опасным для окружающих, вследствие выделения возбудителя из организма в окружающую среду.

Длительность периода разгара и развития болезни зависит от вида возбудителя, состояния иммунологической реактивности организма, своевременной диагностики, эффективности лечения и других условий.

Период выздоровления (реконвалесценция). При благоприятном течении заболевания наступает период выздоровления. Выздоровление характеризуется постепенным исчезновением клинических симптомов заболевания, восстановлением нарушенных функций организма, нейтрализацией и выведением возбудителя и токсинов из организма.

Выздоровление может быть полным, при котором все нарушенные функции восстанавливаются или неполным, если сохраняются остаточные явления (мышечная атрофия при полиомиелитах, клещевом энцефалите, дефекты кожи при натуральной оспе и т.п.). Клиническое выздоровление опережает патоморфологическое восстановление поврежденных органов, а также полное освобождение организма от возбудителя. При большинстве инфекционных заболеваний в период выздоровления организм полностью освобождается от возбудителя, формируется иммунитет.

В некоторых случаях выздоровление переходит в микробоносительство или после кажущегося выздоровления возникает рецидив.

Понятие о патогенности и вирулентности бактерий. Токсины

Патогенность – это потенциальная способность микроорганизма вызывать инфекционный процесс. Патогенность представляет собой видовой признак, появившийся в ходе эволюции микроорганизма и приспособления его к

паразитированию в организме человека. Для патогенности характерна специфичность, т.е. способность вызывать патоморфологические и патофизиологические изменения в определенных тканях и органах.

Для количественной оценки степени патогенности микроорганизма используют термин **вирулентность**, которая измеряется в условно принятых единицах – DLM, DcL, DL₅₀. DLM (Dosis letalis minima) – минимальная смертельная доза микроорганизмов, которая вызывает гибель 95% восприимчивых лабораторных животных. DL₅₀ вызывает гибель 50% зараженных животных, DcL – смертельная доза, вызывающая гибель всех животных.

Степень патогенности микроорганизма зависит от многих факторов и обусловлена как наличием ферментных систем, обеспечивающих существование возбудителя в макроорганизме, так и его способностью противостоять факторам защиты организма, направленных на уничтожение возбудителя. По степени патогенности различают патогенные и условно-патогенные микроорганизмы. *Патогенные* микроорганизмы способны, в большинстве случаев, вызывать инфекционный процесс, а *условно-патогенные*, часто являются естественными обитателями организма человека, вызывают заболевания только при снижении иммунитета и достаточно большой инфицирующей дозе. Степень патогенности микроорганизма связана с его способностью к адгезии, колонизации, инвазии, подавлению фагоцитоза и других факторов.

К факторам патогенности относят способность микроорганизмов прикрепляться к клеткам (*адгезия*), размножаться на их поверхности (*колонизация*), проникать в клетки и ткани (*инвазия*) и противостоять факторам защиты организма (*агрессия*).

Адгезия является пусковым механизмом инфекционного процесса. Под адгезией понимают способность микроорганизма адсорбироваться на чувствительных клетках с последующей колонизацией. Структуры, ответственные за связывание микроорганизма с клеткой называются адгезинами и располагаются они на его поверхности. Адгезины очень разнообразны по строению и обуславливают тропность возбудителей – способность одних микроорганизмов прикрепляться к клеткам эпителия дыхательных путей, других – кишечного тракта или мочеполовой системы и т.д. На процесс адгезии могут влиять физико-химические механизмы, связанные с гидрофобностью микробных клеток, суммой энергии притяжения и отталкивания. У грамотрицательных бактерий адгезия происходит за счет пилей общего порядка. У грамположительных бактерий адгезины представляют собой поверхностные белки и тейхоевые кислоты клеточной стенки. У других микроорганизмов эту функцию выполняют различные структуры клеточной системы: поверхностные белки, липополисахариды и др.

Инвазия. Под инвазивностью понимают способность микроорганизмов проникать через слизистые, кожу, соединительно-тканые барьеры во внут-

ренную среду организма и распространяться по его тканям и органам. Проникновение микроорганизма в клетку связывается с продукцией ферментов, а также с факторами, подавляющими клеточную защиту. Так фермент гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества, и, таким образом, повышает проницаемость слизистых оболочек и соединительной ткани. Нейраминидаза расщепляет нейраминовую кислоту, которая входит в состав поверхностных рецепторов клеток слизистых оболочек, что способствует проникновению возбудителя в ткани.

Агрессия. Под агрессивностью понимают способность возбудителя противостоять защитным факторам макроорганизма. К факторам агрессии относятся: протеазы – ферменты, разрушающие иммуноглобулины; коагулаза – фермент, свертывающий плазму крови; фибринолизин – растворяющий сгусток фибрина; лецитиназа – фермент, действующий на фосфолипиды мембран мышечных волокон, эритроцитов и других клеток. Патогенность может быть связана и с другими ферментами микроорганизмов, при этом они действуют как местно, так и генерализовано.

Важную роль в развитии инфекционного процесса играют токсины. По биологическим свойствам бактериальные токсины делятся на *экзотоксины* и *эндотоксины*.

Экзотоксины продуцируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. По своей химической структуре это белки. По механизму действия экзотоксина на клетку различают несколько типов: цитотоксины, мембранотоксины, функциональные блокаторы, эксфолианты и эритрогемины. Механизм действия белковых токсинов сводится к повреждению жизненно важных процессов в клетке: повышение проницаемости мембран, блокады синтеза белка и других биохимических процессов в клетке или нарушении взаимодействия и взаимокоординации между клетками. Экзотоксины являются сильными антигенами, которые инициируют образование в организме антитоксинов.

По молекулярной организации экзотоксины делятся на две группы:

- 1) экзотоксины, состоящие из двух фрагментов;
- 2) экзотоксины, составляющие единую полипептидную цепь.

По степени связи с бактериальной клеткой экзотоксины делятся условно на три класса.

- Класс А – токсины, секретируемые во внешнюю среду.
- Класс В – токсины частично секретируемые и частично связанные с микробной клеткой.
- Класс С – токсины, связанные и с микробной клеткой и попадающие в окружающую среду при разрушении клетки.

Экзотоксины обладают высокой токсичностью. Под воздействием формалина и температуры экзотоксины утрачивают свою токсичность, но сохраняют иммуногенное свойство. Такие токсины получили название анатоксинов и

применяются для профилактики таких заболеваний, как столбняк, газовая гангрена, ботулизм, дифтерия, а также используются в виде антигенов для иммунизации животных с целью получения анатоксических сывороток.

Эндотоксины по своей химической структуре являются липополисахаридами, которые содержатся в клеточной стенке грамотрицательных бактерий и выделяются в окружающую среду при лизисе бактерий. Эндотоксины не обладают специфичностью, термостабильны, менее токсичны, обладают слабой иммуногенностью. При поступлении в организм больших доз эндотоксины угнетают фагоцитоз, увеличивают проницаемость капилляров, оказывают разрушающее действие на клетки. Микробные липополисахариды разрушают лейкоциты крови, вызывают дегрануляцию тучных клеток с выделением вазодилататоров, активируют фактор Хагемана, что приводит к лейкопении, гипертермии, гипотонии, ацидозу, дессиминированной внутрисосудистой коагуляции (ДВК).

Эндотоксины стимулируют синтез интерферонов, активируют систему комплемента по классическому пути, обладают аллергическими свойствами. При искусственном введении небольших доз эндотоксина повышается резистентность организма, усиливается фагоцитоз, стимулируются В-лимфоциты.

Патогенность бактерий контролируется тремя типами генов: гены – собственной хромосомы, гены, привнесенные плазмидами или умеренными фагами.

4.2. ИММУНОЛОГИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

ИММУНИТЕТ. ВИДЫ ИММУНИТЕТА

Иммунитет (от лат. *immunitas* – освобождение, избавление от чего-либо) представляет собой систему биологических механизмов, направленных на сохранение постоянства внутренней среды организма, с помощью которых он распознает и уничтожает все генетически чужеродное экзогенной (патогенные микроорганизмы, гельминты, их токсины, белки, чужеродные ткани и органы) и эндогенной (собственные мутировавшие и поврежденные клетки) природы.

Распознавание и специфическое реагирование на чужеродные агенты являются функцией *иммунной системы*.

Выделяют два основных механизма защиты организма от чужеродных агентов:

1. Эволюционно сформировавшаяся система клеточных и гуморальных факторов резистентности (от лат. *resistentia* – сопротивление) и контролируемая генетическими механизмами – *врожденный иммунитет*.
2. При дефектах и несостоятельности факторов резистентности организма, в естественных условиях возникает инфекционный процесс, в ходе которого

формируется вторая линия защиты организма, реализуемая с участием иммунной системы – *приобретенный иммунитет*, который характеризуется развитием специфических иммунных реакций на конкретный чужеродный агент.

В зависимости от путей формирования различают несколько типов *приобретенного иммунитета* (рис. 83).

Приобретенный естественный активный иммунитет вырабатывается после перенесенного инфекционного заболевания, скрытой инфекции или многократного бытового инфицирования без возникновения заболевания. Часто его называют постинфекционным и в зависимости от полноты освобождения организма от возбудителя подразделяют на стерильный и нестерильный. Продолжительность может быть различна и сохраняться годами, десятилетиями и даже в течение всей жизни (брюшной тиф, дифтерия, корь).

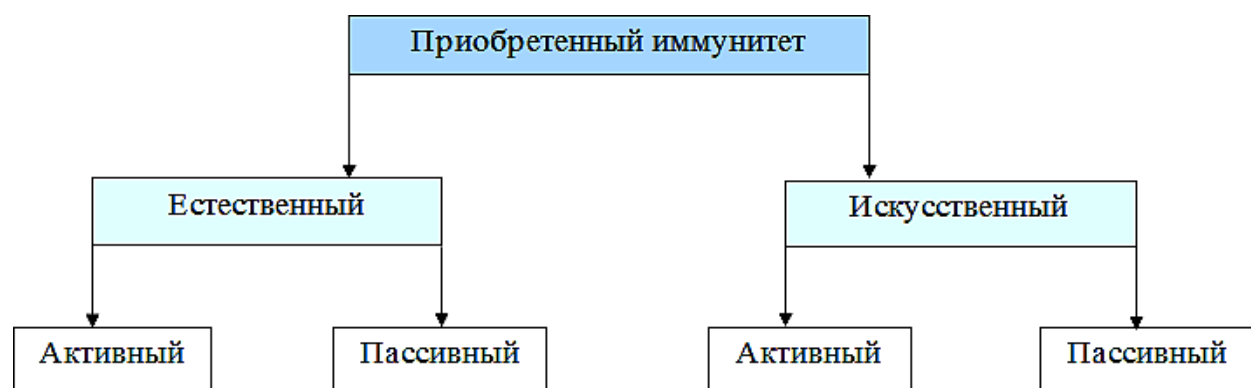


Рис. 83. Типы приобретенного иммунитета

Приобретенный естественный пассивный иммунитет возникает, когда антитела матери передаются с кровью плоду (IgG) и с молоком при грудном вскармливании ребенка (IgA секреторный). Такой иммунитет (плацентарный, материнский) обеспечивает невосприимчивость новорожденного на протяжении 6–7 мес. к возбудителям некоторых инфекционных заболеваний (корь, дифтерия, скарлатина).

Приобретенный искусственный пассивный иммунитет создается введением выработанных другим организмом (животным – гетерологичных, человеком – гомологичных) специфических антител. Продолжительность невосприимчивости от 2–3 недели до 1,5 мес.

Ни одна из форм приобретенного иммунитета не передается потомству.

Приобретенный противоинфекционный иммунитет объединяет два типа иммунного ответа макроорганизма: гуморальный и клеточный. Напряженность гуморального типа зависит от класса и уровня циркулирующих специфических антител, а клеточного – от функциональной активности макрофагов и различных субпопуляций Т-лимфоцитов. Как правило, в механизмах развития защиты против возбудителей инфекционных заболеваний принимают участие оба типа с преобладанием того или другого в разные фазы инфекционного

заболевания.

В зависимости от природы и биологических свойств микроорганизмов приобретенный противоинфекционный иммунитет подразделяют на антитоксический, антибактериальный, противовирусный, иммунитет к грибкам простейшим. Однако, деление это достаточно условное и имеет в настоящее время лишь дидактическое значение.

Наряду с приобретенным иммунитетом существует *видовой иммунитет*, представляющий собой генетически опосредованную невосприимчивость некоторых видов животных и человека к возбудителям заболеваний, поражающих другие виды. Так, люди не восприимчивы к вирусу чумы собак, чумы рогатого скота (клетки человека не имеют рецепторов к вирусу). Животные невосприимчивы к некоторым вирусам (ветряной оспы, гепатита А, гепатита В, кори), некоторым бактериям (гонококки, возбудители сифилиса). Крысы и мыши устойчивы к дифтерийному токсину, а кошки и собаки – к столбнячному.

Видовой иммунитет, как правило, обусловлен отсутствием на клетках рецепторов к патогену (бактерия, вирус, токсины) или мембранных субстратов, соответствующих ферментам проникновения микроорганизма (гонококк).

Существуют и внутривидовые (расовые, этнические) различия в восприимчивости к инфекционным болезням. У жителей некоторых районов Африки обнаружен ген, вызывающий в организме его носителей синтез аномального гемоглобина, так называемого серповидноклеточного гемоглобина, или гемоглобина S (Hb-S). Эритроциты, содержащие такой гемоглобин, принимают форму серпа. Люди, гетерозиготные по данному гену, устойчивы к малярии, вызываемой *Plasmodium falciparum*.

ПОНЯТИЕ О РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА. ФАКТОРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Резистентность организма (от лат. *resistentia* – сопротивление) – сопротивляемость организма к действию различных факторов, в том числе к действию чужеродных агентов (антигенов).

Резистентность организма обусловлена действием факторов неспецифической защиты (резистентности). Механизмы неспецифической защиты формируются под контролем генетического кода в процессе развития организма (врожденный и видовой иммунитет) и определяют неселективный характер ответа на антиген.

Способность вступать во взаимодействие с микроорганизмом и реагировать на него как на фактор, нарушающий нормальные физиологические функции, характеризует общую физиологическую реактивность организма.

Попадание в макроорганизм микроорганизма-паразита включает сложную цепь защитно-приспособительных реакций, направленных в конечном

итоге на устранение возбудителя и восстановление структуры органов и систем организма.

Сопротивляемость организма зависит от непроницаемости кожных и слизистых покровов для большинства микроорганизмов, наличия бактерицидных субстанций в кожных секретах, кислотности содержимого желудка, присутствия в крови и других жидкостях организма (слюна, слеза и др.) таких ферментных систем, как лизоцим, пропердин и др., от количества и активности фагоцитов крови и тканей.

Все эти факторы являются неспецифическими, формируются в пренатальном периоде онтогенеза, они генетически детерминированы. От момента рождения и до естественной смерти макроорганизма (постнатальный период онтогенеза) их функциональная активность постоянно меняется либо в силу возрастных особенностей, либо вследствие воздействия многообразных внешних факторов (физических, химических, биологических, психотропных и др.). В каждый конкретный момент жизни человека совокупность этих факторов определяет степень резистентности его организма. Их биологическая роль заключается в том, чтобы в ходе начавшегося инфекционного процесса воспрепятствовать развитию заболевания.

Таким образом, к факторам резистентности относятся:

1. Невосприимчивость клеток макроорганизма к патогенным микроорганизмам и их токсинам, обусловленная отсутствием на поверхности клеток рецепторов для адгезии.
2. Температурная реакция, при которой прекращается размножение большинства патогенных микробов.
3. Внешние барьеры (кожа, слизистые оболочки, микробиота).
4. Внутренние барьеры (лимфотические узлы, тканевые и клеточные барьеры).
5. Клеточные факторы (фагоциты, естественные киллеры – НК-клетки, тучные клетки).
6. Гуморальные факторы (белки системы комплимента, лизоцим, интерфероны, белки острой фазы, цитокины, пропердин, лизины).

Кожа

Важным фактором резистентности является кожа как механический барьер для внедрения паразита. Отторжение верхних слоев эпидермиса, секреты сальных и потовых желез способствуют их удалению с поверхности кожи. Существенную роль в элиминации микроорганизмов с поверхности кожи играют различные микробоцидные субстанции (молочная и жирные кислоты и др.), обеспечивающие ее «самоочищение». Поэтому различные микроорганизмы, не являющиеся ее постоянными обитателями, не могут в течение продолжительного времени сохраняться на коже. Бактерицидность кожных секретов зависит от их кислотности.

Слизистые оболочки

Для большинства патогенных микроорганизмов слизистые оболочки разных органов являются барьером, препятствующим проникновению внутрь организма. Проницаемость слизистых оболочек зависит от физиологического состояния макроорганизма и от биологической активности данного вида или штамма возбудителя.

На слизистой оболочке патогенные микроорганизмы не имеют оптимальных условий для размножения в связи с бактерицидным действием тканей и секретов, смыванием слюной и др., поэтому в естественных условиях размножение их замедляется.

Нормальная микробиота

На поверхности кожи и всех слизистых взрослого человека одновременно находится 10^{14} – 10^{15} различных микроорганизмов нормальной и условно- патогенной флоры. Представители нормальной микробиоты выполняют важные функции по обеспечению колонизационной резистентности макроорганизма, созреванию и поддержанию активности иммунной системы.

Лимфатические узлы, тканевые и клеточные барьеры

Барьером для большинства микроорганизмов являются лимфатические узлы, а также скопления лимфоидных клеток в различных внутренних органах. В лимфоидной ткани, благодаря действию клеточных факторов (цитотоксический эффект, фагоцитоз и др.) происходит фиксация и гибель значительной части или всех возбудителей.

Наиболее богаты лимфатическими сосудами кожа и слизистые оболочки пищевого канала и дыхательного аппарата. При повреждении кожи и слизистых оболочек находящиеся на их поверхности микробы проникают в лимфатические сосуды и током лимфы доставляются в лимфатические узлы, которые являются своеобразным биологическим фильтром для возбудителей, переносимых с лимфой.

Воспаление. Клеточные факторы

При воздействии на организм многообразных повреждающих факторов физической, химической и биологической природы возникает сложная неспецифическая защитно-приспособительная реакция организма – воспаление. *Воспаление* – местная реакция кровеносных сосудов, соединительной ткани и нервной системы на повреждение. В процесс воспаления вовлекаются лимфатические структуры, сосудистая сеть и локально повреждаемые ткани. Сначала нарушается обмен жидкости, что ведет к нарушению циркуляции в капиллярах. Одно из серьезных изменений – повышение проницаемости капилляров.

Итогом воспалительной реакции является локализация микроорганизмов или ограничение вызванного ими очага поражения, с последующей их элиминацией и частичным или полным восстановлением нарушенных структур.

Первым звеном воспалительной реакции являются сосудистые изменения, выражающиеся прежде всего в повышении проницаемости стенки сосудов. Проницаемость увеличивается под действием биологически активных веществ (гистамин, серотонин, кинины), которые выделяются при повреждении клеток, особенно тучных, и ведет к периваскулярной экссудации плазмы («серозный отек») и миграции клеток-фагоцитов (нейтрофилы, макрофаги) в пораженные участки ткани.

Воспалительный отек (скопление экссудата в воспалительной ткани) выполняет важную роль, как фактор, способный связывать, фиксировать бактериальные токсины в очаге воспаления и препятствующий их всасыванию и распространению в организме. Особенно большое защитное значение имеют фагоцитарная и пролиферативная функции клеток – гистиоцитов, макрофагов. Грануляционная ткань, которую они образуют, представляет мощный защитный барьер против инфекции.

Фагоциты могут быть причислены к главным факторам воспаления. Особую роль при этом играют тканевые макрофаги, обладающие способностью поглощать и переваривать различные чужеродные для организма агенты, включая микроорганизмы. Защитные свойства фагоцитов связаны с наличием в их цитоплазме большого числа лизосом – органелл, богатых различными гидролитическими ферментами, обеспечивающими расщепление значительного числа химических связей. Процесс фагоцитоза нередко сопровождается гибелью клетки-фагоцита, однако при этом происходит гибель большого числа микроорганизмов.

Фагоцитами являются полиморфно-ядерные клетки (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и моноклеарные клетки (моноциты крови), а также фиксированные макрофаги – альвеолярные, перитонеальные, дендритные клетки и др.

Процесс фагоцитоза протекает в несколько стадий.

На первой стадии происходит приближение фагоцита к чужеродному объекту – положительный *хемотаксис*. Далее происходит *распознавание и адсорбция* чужеродного агента и в этом процессе основную роль играет клеточная мембрана фагоцита, которая благодаря своим рецепторам (Fc- рецепторы) обеспечивает контакт с объектом фагоцитоза. Погружение чужеродной частицы внутрь макрофага связано со сложными изменениями физико-химических свойств его цитоплазмы. Вначале актиноподобный белок фагоцита полимеризуется, а затем полимеры сокращаются под действием миозина с кофактором. В итоге образуются псевдоподии, захватывающие фагоцитируемую частицу. *Фагосома* (фагоцитируемый агент, окруженный плазматической мембраной фагоцита и погруженный внутрь цитоплазмы) соприкасается с лизосомальными гранулами фагоцита. При слиянии фагосомы с лизосомами образуется *фаголизосомальная (пищеварительная) вакуоль*.

Завершающей стадией является *переваривание* чужеродного агента

(например, бактерии) до биологически инертных низкомолекулярных соединений. Результатом фагоцитоза является гибель чужеродного агента (завершенный фагоцитоз). Однако, не во всех случаях происходит гибель, а ряд возбудителей могут даже размножаться в фагоците и погубить его (незавершенный фагоцитоз). Среди механизмов защиты патогенных микроорганизмов, приводящих к незавершенному фагоцитозу, можно назвать такие как: препятствие слияния лизосом с фагосомами (токсоплазмы, микобактерии), устойчивость к действию лизосомальных ферментов (гонококки, стафилококки, стрептококки), покидают фагосому, избегая действия микробицидных факторов (риккетсии). Незавершенный фагоцитоз приводит к персистенции патогенных агентов в организме и хронизации инфекции.

Среди механизмов микробицидной активности фагоцитов можно выделить *кислородзависимые и кислороднезависимые механизмы*.

К кислородзависимым механизмам относится респираторный взрыв.

Респираторный взрыв – повышение в фагоцитирующих клетках синтеза активных форм кислорода. Активные формы кислорода можно разделить на первичные и вторичные. Первичные формы – супероксид-радикал (O_2^-) и монооксид азота (NO). Данные формы обладают регуляторным и умеренным бактерицидным действием, синтезируются в клетках в процессе ферментативной реакции. Супероксид-радикал в ферментативной системе НАДФН-оксидазы, монооксид азота – NO-оксидазой.

В результате образования первичных форм кислорода происходит активация комплекса ферментов, которые синтезируют вторичные активные формы кислорода – перекись водорода (H_2O_2), синтезируемая супероксиддисмутазой из супероксид-радикала, хлорноватистая кислота (HOCl), синтезируемая миелопероксидазой из H_2O_2 . Все вторичные АФК обладают выраженной бактерицидной активностью. Они секретируются в фагосому, где происходит расщепление поглощенного объекта, например, анаэробных микроорганизмов.

Кислороднезависимые механизмы реализуются в фаголизосоме при участии лизосомальных ферментов – лизоцим, лактоферрин, гидролазы. Микробицидной активностью обладает молочная кислота, образующаяся в результате гликолиза и понижающая внутривакуольный pH до 4,0. Лизосомы содержат в себе более тридцати различных ферментов, способных гидролизировать большую часть захваченных объектов. В гранулах лейкоцитов найдены и другие микробицидные вещества, например, катионные белки, лактоферрин, различные пероксидазы, активные также в отношении и вирусов.

Тучные клетки (тканевые базофилы) – клетки, в которых находятся цитоплазматические гранулы, содержащие гепарин и биологически активные вещества (гистамин, серотонин). При дегрануляции тучных клеток происходит высвобождение медиаторов воспаления (лейкотриены, цитокины). В результате повышается проницаемость сосудов, комплимент и клетки входят в ткани

очага поражения, что препятствует проникновению патогена во внутреннюю среду организма.

Естественные (нормальные) киллеры (NK-клетки) представляют собой большие гранулодержащие лимфоциты. Данные клетки способны спонтанно убивать опухолевые и инфицированные вирусом клетки. Также они обладают противопаразитарной активностью. Локализованы в печени, красной пульпе селезенки, слизистых оболочках.

Гуморальные факторы

Наряду с клеточными реакциями резистентности в процессе эволюции возник ряд веществ, находящихся в коллоидно-растворимом состоянии или же выделяющихся в жидкие среды организма. Эти вещества осуществляют функцию первичной защиты от чужеродных антигенных и неантигенных частиц. Количество этих гуморальных факторов значительно. К числу более активных, или наилучшим образом изученных, следует отнести нормальные антитела, лизоцим, комплемент, пропердин, лейкоцины, β -лизины, интерферон, цитокины и др.

Нормальные антитела. В сыворотке людей и животных выявляются нормальные антитела против различных микробных антигенов. Они обладают агглютинирующим, комплементсвязывающим, литическим, нейтрализующим влиянием на микробные антигены. Между тем сыворотка крови может содержать иммуноглобулины даже по отношению к антигенам, о которых заведомо известно, что они никогда не поступали в данный организм. Такие антитела получили название естественных или «нормальных». Они обычно определяются в низких титрах, однако их иммунологическая роль довольно выражена, особенно по отношению к инфекционным агентам.

Считается, что нормальные антитела появляются в результате так называемой, неприметной иммунизации возбудителями или антигенами, поступающими с пищей, однако нельзя отрицать и спонтанный (генетически обусловленный) механизм их образования.

Реакции антител по отношению к антигенам, о которых заведомо известно, что они не проникали в данный организм, могут расцениваться и как перекрестные, отсюда и их более низкие титры. Нормальные антитела могут поступать трансплацентарно или с молоком матери. Их титр определяется серологическими реакциями и обычно равен 1:5–1:20.

β -лизины. Многие сыворотки проявляют бактерицидное действие по отношению к грамположительным, главным образом, спорообразующим бактериям и микрококкам. Эта активность не связана с комплементом и сохраняется после прогревания сыворотки при 60–65 °C в течение 30 мин. Характерно, что β -лизины обнаруживаются в сыворотке после образования свернутого сгустка цельной крови и не обнаруживаются в плазме. Считается, что β -лизины выделяются в процессе свертывания крови тромбоцитами.

Бактерицидное действие β -лизинов, по-видимому, обусловлено их влиянием на цитоплазматическую мембрану, в результате чего наступает аутолиз клеточной стенки ферментами цитоплазматической мембраны. β -лизины активны только в присутствии ионов Ca^{++} .

Белки сыворотки крови. «Острофазная реакция» – ранняя реакция, при которой повышается концентрация белков плазмы крови. К белкам острой фазы относятся: С-реактивный белок, сывороточные амилоиды А и Р, факторы свертывания крови, металлосвязывающие белки, ингибиторы протеаз, маннан-связывающий лектин и др.

Система комплемента (от лат. *complementum* – дополнение, средство пополнения) представляет собой систему сывороточных белков, которые принимают участие в реакциях неспецифической защиты: фагоцитоза, хемотаксиса, лизиса клеток, участие в анафилаксии, активации тучных клеток и др. Белки комплемента по структуре являются глобулинами или гликопротеинами. Белки комплемента продуцируются макрофагами, лейкоцитами, клетками печени и составляют 5–10% белков крови. Согласно номенклатуре, принятой ВОЗ, система комплемента обозначается символом С, а ее индивидуальные компоненты символами С1, С2 и т.д. Систему комплемента составляют 20–26 белков сыворотки крови, девять из них являются основными белками (С1–С9), а один представляет комплекс: 4 белка системы пропердина, один – ингибитор фермента активатора.

Каждая белковая фракция обладает определенными свойствами. В норме фракции комплемента находятся в неактивном состоянии. Активированные компоненты комплемента действуют в определенном порядке – в виде каскада ферментов, при этом продукт предшествующей реакции служит катализатором для включения в последующую реакцию компонента и субкомпонента.

Выделяют *три механизма (пути) активации комплемента* (рис. 84):

- 1) классический путь;
- 2) лектиновый путь;
- 3) альтернативный путь.

При классическом пути начальным активатором комплемента является иммунный комплекс антиген-антитело. Активируют систему комплемента IgM и большинство подклассов IgG. Иммунный комплекс связывается с компонентом С1 комплемента, который имея в своем составе активную протеазу расщепляет компоненты С2 и С4 с образованием С3-конвертазы. Конвертаза активирует компонент С5, после чего происходит формирование мембраноатакующего комплекса (МАК). Мембраноатакующий комплекс встраивается в клеточную стенку микроорганизма, образуется «пора», нарушается осмотическое давление внутри клетки, и она погибает.

Классический путь
Комплекс АГ – АТ (IgG, IgM)

Альтернативный путь
Липополисахарид, IgA

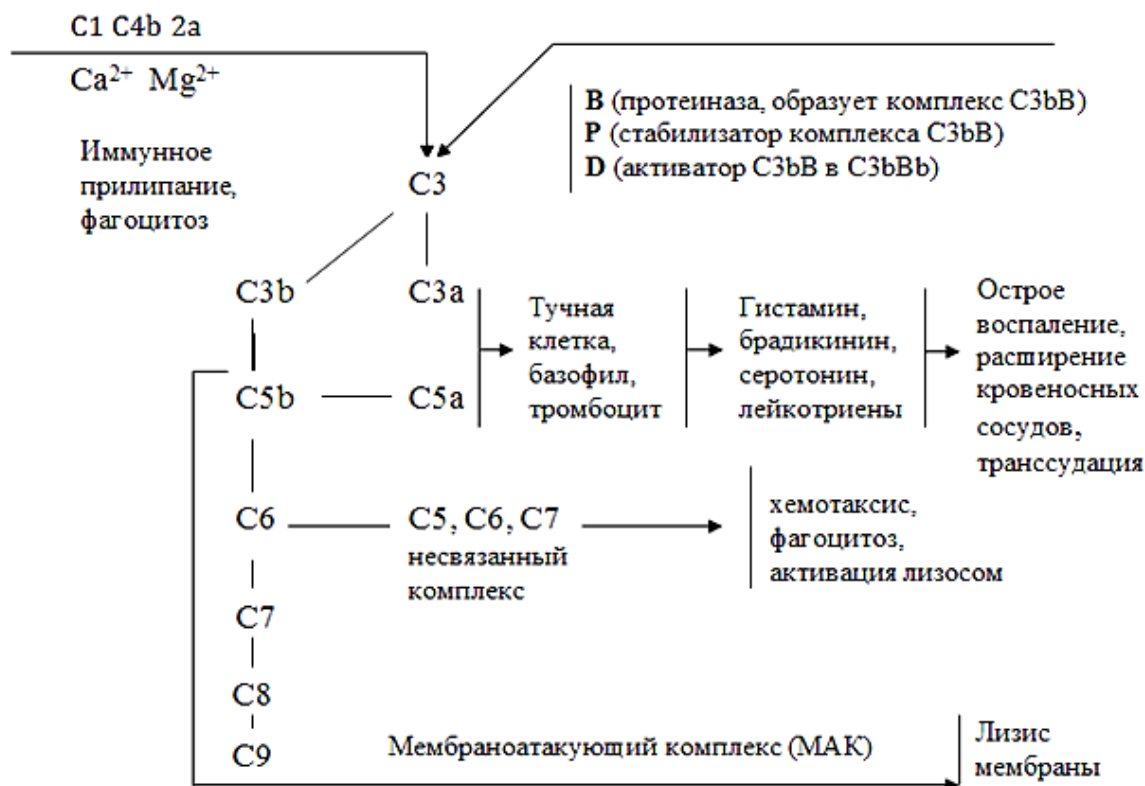


Рис. 84. Пути активации и физиологические функции компонентов комплемента

При альтернативном пути активаторами являются клетки микроорганизмов, полисахариды, липополисахариды (эндотоксины) бактерий, вирусы и другие антигены без участия антител. Запускает реакцию компонент C3b, который в небольшом количестве присутствует в сыворотке крови. Данный компонент связывается с антигеном и при участии факторов В (протеиназа), D (гликопротеин) и Р (*пропердин* – γ -глобулин) и образует C3-конвертазу, которая в свою очередь активирует компонент C5 (рис. 85). Компонент C5 прикрепляется к клетке мишени, образуется мембраноатакующий комплекс и клетка гибнет.

Лектиновый путь активации комплемента обусловлен присутствием в крови кальцийзависимого протеина – маннан-связывающего лектина (МСЛ). Этот протеин связывается с остатками маннозы на поверхности микробной клетки, что приводит к активации, протеазы которая расщепляет C2 и C4 компоненты с последующим образованием C3-конвертазы. Дальнейшие реакции протекают по классическому пути активации комплемента.

Комплемент является важным фактором гомеостаза и регулируется механизмами последнего.

Комплемент отличается от иммуноглобулинов тем, что его концентрация в сыворотке крови не повышается в результате иммунизации.

мембран клеток. Активность цитокинов взаимосвязана, один цитокин активирует выработку другого и т.д.

Выделяют несколько групп цитокинов:

- 1) интерфероны;
- 2) гемопоэтины;
- 3) факторы некроза опухоли;
- 4) хемокины.

Интерфероны – это группа белков, вырабатываемых эукариотическими клетками в ответ на внедрение в них ряда биологических агентов – интерферогенов. Интерфероны обладают противовирусной, иммуномодулирующей, противоопухолевой и радиопротекторной активностью. Различают α -, β -, γ -интерфероны (IFN- α , IFN- β , IFN- γ). По химической природе они относятся к гликопротеидам.

IFN- α (лейкоцитарный интерферон) синтезируют лейкоциты периферической крови. Взаимодействует с клетками организма, несущими на своей поверхности рецептор CD118. Основная функция – увеличение экспрессии молекул HLA I класса, это способствует распознаванию и уничтожению цитотоксическими лимфоцитами вирусинфицированных клеток и индукции противовирусных белков подавляющих репликацию вирусов.

IFN- β (фибробластный интерферон) синтезируют фибробласты. Функция такая же как и у IFN- α .

IFN- γ (иммунный интерферон) выделяется иммунными Т-лимфоцитами: CD4 Т-клетками, CD8 цитотоксическими лимфоцитами и NK-клетками. Взаимодействует с рецептором CD119 на поверхности клеток. Является активатором макрофагов, усиливает активность цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток. Активирует экспрессию молекул HLA I и HLA II классов.

Интерфероны ингибируют репродукцию многих вирусов и не только против индуцировавших его образование вирусов, но также и против ряда других не родственных с индуктором вирусов.

Интерферон не влияет на прикрепление или проникновение вируса в клетку или на выделение его из клетки; он ограничивает или ингибирует лишь синтез белков вируса. Он циркулирует в организме человека кратковременно – около двух недель, что следует учитывать при применении интерферона как профилактического или терапевтического средства.

Гемопоэтинами являются факторы роста клеток, к которым относятся интерлейкины (ИЛ-2 – ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-11, ИЛ-13, ИЛ-15), продуцируемые активированными Т- и В-лимфоцитами, макрофагами, а также клетками стромы тимуса. Эти интерлейкины стимулируют активацию и дифференцировку лимфоцитов, лейкоцитов, макрофагов и др.

Также к гемопоэтинам относят колониестимулирующие факторы (КСФ), которые контролируют активацию, пролиферацию и созревание клеток иммунной системы.

Факторы некроза опухоли (ФНО- α , ФНО- β) являются стимуляторами адгезии, антителообразования, активности мононуклеарных клеток и способны лизировать некоторые опухоли, продуцируются макрофагами.

Хемокины привлекают в очаг воспаления лейкоциты, моноциты и лимфоциты. К хемокинам относят ИЛ-8 и др.

Антигены

Антигены (от лат. anti – против, genos – род) – генетически чужеродные для организма вещества коллоидной структуры, которые при попадании в его внутреннюю среду способны вызывать ответную специфическую иммунологическую реакцию, проявляющуюся, в частности, в образовании специфических антител, появлении сенсibilизированных лимфоцитов или в возникновении состояния толерантности к этому веществу.

Основными свойствами антигенов являются иммуногенность и специфичность (антигенность).

Термином *специфичность* обозначают способность чужеродного антигена индуцировать образование специфических к нему антител и вступать с ними в специфическую связь.

Иммуногенностью называют способность антигена индуцировать иммунный ответ, а такой антиген называют *иммуногеном*. Иммуногенность определяется чужеродностью, молекулярной массой, химической природой антигена т.е. вещества, являющиеся антигенами, должны быть чужеродны для организма, макромолекулярны, находиться в коллоидном состоянии, поступать в организм парентерально (минуя желудочно-кишечный тракт, в котором обычно происходит расщепление вещества и потеря его чужеродности).

Под *чужеродностью* антигенов следует понимать определенную степень химического различия между антигеном и макромолекулами организма, во внутреннюю среду которого, он попадает. Простые элементы (железо, медь, сера и др.), простые и сложные неорганические соединения (кислоты, соли и др.), а также простые органические молекулы, такие как моносахара, дисахара, аминокислоты не являются антигенами.

Антигенные свойства связаны с величиной молекулярной массы макромолекулы – она должна быть не менее 10 тыс. дальтон. Чем выше молекулярная масса вещества, тем выше его иммуногенность. Вместе с тем неверно считать, что высокая молекулярная масса является обязательным свойством антигена. Так, глюкагон (гормон поджелудочной железы, мм 3800) вазопрессин – ангиотензин (мм 1000) также обладают антигенными свойствами.

Принято различать *полноценные* антигены, *неполноценные* антигены (*гаптены*) и *полугаптены*.

Полноценными антигенами называют такие антигены, которые вызывают

образование антител или сенсibilизацию лимфоцитов и способны реагировать с ними как в организме, так и в лабораторных реакциях. Свойствами полноценных антигенов обладают белки, полисахариды, высокомолекулярные нуклеиновые кислоты и комплексные соединения этих веществ.

Неполноценные антигены, или гаптены, сами по себе не способны вызывать образование антител или сенсibilизацию лимфоцитов. Это свойство появляется лишь при добавлении к ним полноценных антигенов («проводников»), а среди образующихся антител или сенсibilизированных лимфоцитов часть специфична к «проводнику», а часть – к гаптену, с которым они и могут реагировать как *in vivo*, так и *in vitro*.

Полугаптенами называют сравнительно простые вещества, которые при поступлении во внутреннюю среду организма могут химически соединяться с белками этого организма и придавать им свойства антигенов. К этим веществам могут принадлежать и некоторые лекарственные препараты (йод, бром, антипирин и др.).

Молекула антигена состоит из двух неравных частей. Активная (малая часть) с молекулярной массой около 350–1000 дальтон носит название *антигенной детерминанты (эпитоп)* и определяет антигенную специфичность. Антигенные детерминанты расположены в тех местах молекулы антигена, которые находятся в наибольшей связи с микроокружением. В белковой молекуле, например, они могут располагаться не только на концах полипептидной цепи, но и в других ее частях. Антигенные детерминанты содержат в своем составе по крайней мере три аминокислоты с жесткой структурой (тирозин, триптофан, фенилаланин). Специфичность антигена связана также с порядком чередования аминокислот полипептидной цепи и комбинацией их положений по отношению друг к другу. Примерно на каждые 5000 дальтон относительной молекулярной массы молекулы антигена приходится одна антигенная детерминанта (эпитоп). Количество антигенных детерминант у молекулы антигена определяет его *валентность*. Она тем выше, чем больше относительная молекулярная масса молекулы антигена. Так, у дифтерийного токсина 8 валентностей, гемоцианина – 231 и т.д.

Остальная (неактивная) часть молекулы антигена, как полагают, играет роль носителя детерминанты и способствует проникновению антигена во внутреннюю среду организма, его пиноцитозу или фагоцитозу, клеточной реакции на проникновение антигена, образование медиаторов межклеточного взаимодействия в иммунном ответе (Т-лимфоциты имеют рецепторы к носителю, В-лимфоциты – к антигенной детерминанте). Антигенные детерминанты некоторых антигенов получены искусственным путем. Их введение в организм животных без носителя, приводит к низкому иммунному ответу.

Для проявления антигенности большое значение имеет путь введения антигена в организм и его доза. Для большинства антигенов бактерий и вирусов наиболее результативно внутрикожное и подкожное введение. В зависимости

от пути поступления наблюдается преимущественное накопление антигена в том или ином органе: при внутривенном – в селезенке, костном мозге, печени; при подкожном – в регионарных лимфатических узлах. В клетку организма антигены поступают в результате фаго- или пиноцитоза. Выделяется антиген из организма, в основном, с мочой и (меньше) с испражнениями.

Антигены бактерий и вирусов

Различные микроорганизмы в связи со сложностью их структуры и химического состава содержат различные антигены: белки (полноценные антигены), углеводы, липоидные соединения (гаптены) и их комплексы.

Соответственно анатомическим структурам бактериальной клетки различают:

- *H-антигены* (жгутиковые, если бактерия их имеет).
- *K-антигены* (поверхностные, антигены капсулы – полисахариды, липополисахариды, белки).
- *O-антигены* (соматический – белки, нуклеопротеины, ферменты бактерий).
- Антигены экскретируемые бактериями в окружающую их среду (белки, экзотоксины, полисахариды капсул).

Среди многочисленных антигенов микробной клетки различают такие, которые присущи только данному типу микробов (*типовые антигены*), данному виду (*видовые антигены*), а также общие для группы (рода, семейства) микроорганизмов (*групповые антигены*). Такие антигены извлекают из разрушенных микроорганизмов, иммунизируют ими животных и получают, соответственно типовые, видовые, групповые сыворотки. Такие сыворотки применяют с целью идентификации выделенных из организма больного (или окружающей среды) бактерий, определяя не только вид, но и серотип внутри вида.

Антигенами вирусной природы являются: *гликопротеины и протеины суперкапсида вируса, белки капсида, вирусные ферменты.*

Таким образом, бактериальная клетка (как и микроорганизмы других царств – вирусы, простейшие, грибки) представляют собой сложный комплекс многочисленных антигенов. При попадании во внутреннюю среду макроорганизма на многие из этих антигенов будут образовываться свои специфические антитела. Одни антигены индуцируют образование едва заметного количества антител, другие – быстрое и значительное антителообразование. Соответственно этому различают «слабые» и «сильные» антигены.

Кроме того, выделяют антигены, которые способны связываться с Т-лимфоцитами без помощи антигенпредставляющих клеток (АПК), минуя их активные центры. В результате чего происходит поликлональная активация Т-лимфоцитов (от 2 до 20% всех периферических лимфоцитов), которые выбрасывают в кровь огромное количество цитокинов. Это ведет к общей интоксикации организма и гибели Т-лимфоцитов путем апоптоза, что в свою оче-

редь приводит к развитию иммунодефицита. Такие антигены получили название *суперантигенов*. Суперантигенами для Т-лимфоцитов являются: энтеротоксины стафилококка, токсины синдрома токсического шока, антигены ВИЧ, антигены вируса бешенства.

Не все антигены бактериальной клетки в равной степени участвуют в индукции невосприимчивости (иммунитета) при повторном попадании в макроорганизм патогенных микробов того же вида. Установлено также, что определенные антигены некоторых микроорганизмов могут вызывать развитие различных типов гиперчувствительности (аллергии). Такие антигены называют *аллергенами*.

Антигены организма человека

Белки и углеводы крови и внутренних органов обычно не антигенны для организма, в котором они синтезируются, но в то же время антигенны для других особей того же вида. Эти антигены называются *аллоантигенами* или *изоантигенами*. По изоантигенам отдельные индивидуумы различаются между собой, к ним относятся такие антигены как эритроцитарная система АВ0, система Rh (резус)-фактора, антигены главного комплекса гистосовместимости (HLA). Помимо этого, выделяют так называемые забарьерные органы, т.е. органы, отделенные от кровотока особым барьером (гематоэнцефалический, гематотестикулярный и др.), белки которых в норме не поступают в кровь и являются антигенами для собственного организма. В число таких органов входят мозг, хрусталик глаза, паращитовидные железы, семенник.

Антигены главного комплекса гистосовместимости (ГКГС или *MHC – major histocompatibility complex*) уникальны для каждого организма и определяют его биологическую индивидуальность. У человека антигены МНС исторически называются «человеческий лейкоцитарный антиген» от англ. *HLA, Human Leucocyte Antigen*.

Совокупность локусов (генов) главного комплекса гистосовместимости располагается на коротком плече С₆ хромосомы человека и подразделяется на 3 класса.

Класс I содержит три наиболее изученных локуса А, В, С (рис. 86), каждый из которых может быть представлен вариантами одного и того же гена (аллелями).

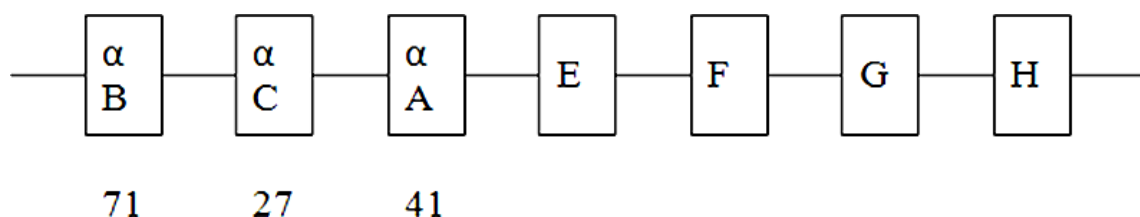


Рис. 86. Локусы (гены) класса I главного комплекса гистосовместимости

А локус включает 41 вариант, В – 71, С – 27. Локусы (гены) класса I контролируют синтез гликопротеидов – человеческих лейкоцитарных антигенов

HLA I, выполняющих роль клеточных рецепторов. Структура HLA I класса представлена на рисунке 87.

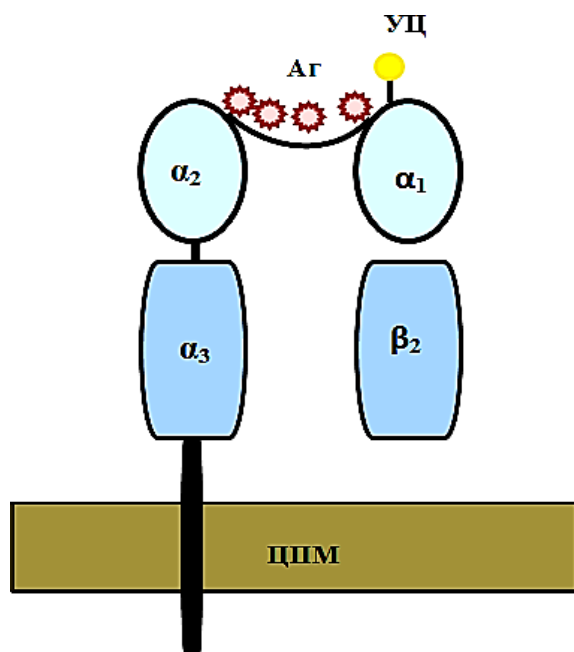


Рис. 87. Структура молекулы HLA I класса. ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; α_1 , α_2 , α_3 – три внеклеточных домена тяжелой цепи; β_2 – микроглобулин; УЦ – углеводная цепочка; Ag – антиген

Тяжелая цепь димера гликопротеида (45 кД) состоит из гидрофильного цитоплазматического домена (участка), гидрофобного трансмембранного, константного внеклеточного (α_3) и двух внеклеточных вариантных (α_2 , α_1) доменов. Домен α_1 имеет короткую углеводную цепочку (УЦ). Легкая цепь димера представлена β_2 -микроглобулином (12 кД), который входит в состав ее константной части. Она не имеет вариантов, кодируется одним из генов 15 хромосомы, не относящимся к ГКГС. Щель между α_1 – α_2 и β_2 является активным центром связывания и презентации антигена (антигенных детерминант) Т цитотоксическим лимфоцитам (Тс).

HLA класса I имеются на поверхности любых ядродержащих клеток организма, что лежит в основе его индивидуальной антигенной специфичности. Они обеспечивают «узнавание» собственных клеток макроорганизма, межклеточную кооперацию, презентацию антигена.

Класс II локусов включает несколько генов (рис. 88). Локусы (гены) DP, DQ, DR контролируют синтез α и β цепей клеточных рецепторов и могут иметь аллели (альтернативные варианты генов), число которых представлено на схеме. Структура антигенов HLA II класса изображена на рисунке 89.

Рецептор HLA II класса представляет собой гликопротеид, состоящий из двух цепей. Цепь A представлена варибельным внеклеточным доменом α_1

(34 кД), константным внеклеточным доменом α_2 (34 кД), гидрофобным транс- мембранным и гидрофильным цитоплазматическими доменами. Домены α_1 и α_2 имеют по одной короткой углеводной цепочке. Цепь В имеет вариа- бель- ный внеклеточный β_1 (28 кД) с одной углеводной цепочкой, константный вне- клеточный β_2 (28 кД), гидрофобный трансмембранный и гидрофильный цито- плазматический. Щель между α_1 и β_1 представляет собой активный центр ре- цептора. Антигены HLA класса II имеются только на макрофагах, В-лимфоци- тах и некоторых активированных Т-лимфоцитах.

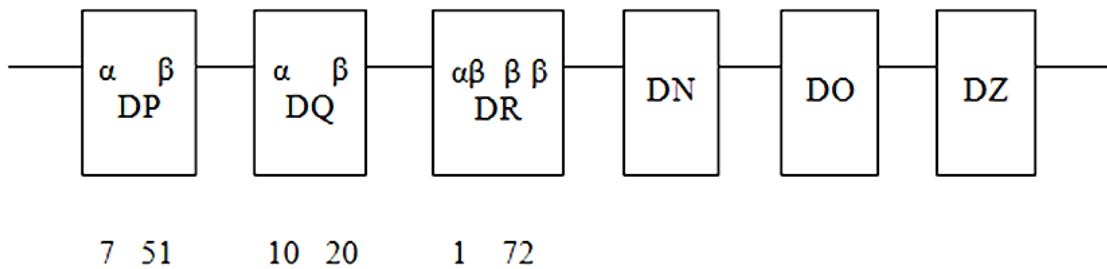


Рис. 88. Локусы (гены) класса II главного комплекса гистосовместимости

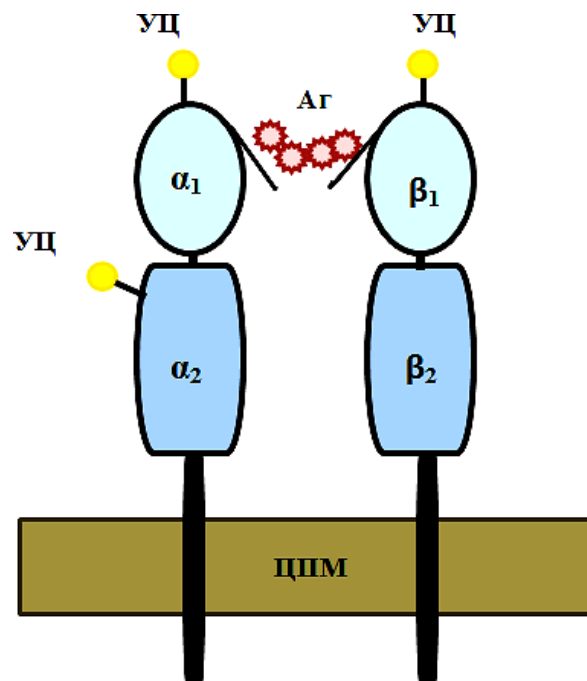


Рис. 89. Структура молекулы ГКГС II класса. ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 – внеклеточные домены; УЦ – углеводная цепочка; Аг – антиген

Класс III локусов ГКГС содержит гены, контролирующие синтез некото- рых компонентов, участвующих в активации C_3 компонента комплемента. Контролируемые этими генами компоненты системы комплемента (C_4 , фактор В, C_2) секретируются в кровь, циркулируют вместе с ней, но на мембранах клеток организма они не фиксируются.

Антитела

Антитела представляют собой белки глобулиновой природы (иммуноглобулины) образующиеся в организме под воздействием антигена и обладающие способностью избирательно связываться с ним. Существуют пять разновидностей молекул (классов) иммуноглобулинов с молекулярной массой от 150 до 900 тыс. дальтон: *IgM*, *IgG*, *IgA*, *IgE*, *IgD*. Молекулы иммуноглобулинов состоят из двух легких (L) и двух тяжелых (H) полипептидных цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (рис. 90).

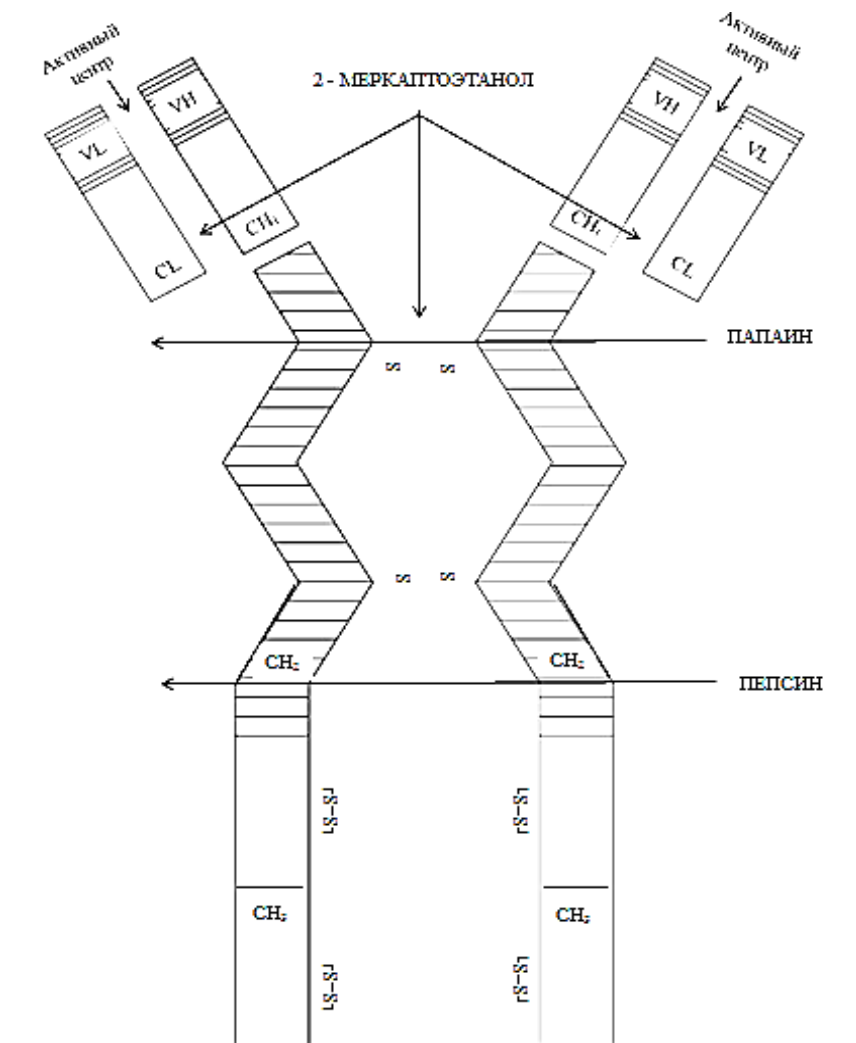


Рис. 90. Структура молекулы *IgG* с указанием мест расщепления на фрагменты 2-меркапэтанолом, папаином и пепсином

Оба типа цепей обладают антигенностью. У тяжелых цепей она специфична для каждого класса иммуноглобулинов и соответственно классам Н-цепи обозначаются μ (мю), γ (гамма), α (альфа), ϵ (эпсилон), σ (дельта). Легкие цепи в антигенном отношении делятся на две разновидности – κ (каппа) и λ (лямбда), одинаковые для разных классов.

Легкие цепи IgG состоят из двух участков (доменов): переменных (VL) и константных (CL). Тяжелые цепи включают в себя один переменный (VH) и 3 константных участка (CH₁, CH₂, CH₃). Переменные участки легких и тяжелых цепей формируют активные центры антител (VL–VH). Участок CL–CH₁ определяет небольшие различия в последовательности расположения аминокислот у индивидуумов одного и того же вида (аллоантигенные различия молекул IgM). Область CH₂–CH₂ участвует в фиксации и активации компонента, а область CH₃–CH₃ – в фиксации антитела к клеткам (лимфоцитам, макрофагам, тучным клеткам). Данный тип строения молекулы характерен и для всех остальных классов иммуноглобулинов, различия заключаются в дополнительной организации этой основной единицы. Так, H-цепь IgM состоит не из 4, а из 5 доменов, а вся молекула IgM представляет собой пентамер молекулы IgG, соединенный дополнительными полипептидными J-цепями. IgA может быть в форме мономеров (сывороточный IgA) и димеров (секреторный IgA). Последний имеет дополнительные J и S цепи. Другие свойства антител представлены в таблице 14.

Таблица 14

Основные характеристики иммуноглобулинов человека

№ п/п	Показатели	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
1	Молекулярная масса	900 тыс.	150 тыс.	170 тыс. и 300 тыс.	190 тыс.	180 тыс.
2	Уровень в крови в г/л	0,5 – 1,8	6 – 16	1 – 5	0,00002	0,03 – 0,04
3	Тип тяжелых цепей	$\mu 1 - \mu 2$	$\gamma 1 - \gamma 4$	$\alpha 1 - \alpha 2$	ϵ	σ
4	Формула	5H5L	2H2L	4H4L	2H2L	2H2L
5	Фиксация С	++++	++	+S	–	–
6	Нейтрализация токсинов	+	+	+	–	–
7	Агглютинация	+	+	+	–	–
8	Бактериолиз	+	+	?	–	–
9	Прохождение плаценты	–	+	–	–	–

Молекула антитела связывается с детерминантой антигена не целиком, а лишь определенной своей частью, называемой *активным центром*. Активный центр представляет собой полость или щель, соответствующую пространственной конфигурации детерминантной группы антигена. Один из активных центров по разным причинам может быть функционально инертным. Такие антитела называются *неполными*. Их появлению обычно предшествует образование полных, т.е. антител с двумя (IgG) активными центрами. Неполные

антитела встречаются у разных классов иммуноглобулинов.

Основная масса антител образуется в клетках плазмочитарного ряда (плазмобласт, проплазмоцит, плазмоцит). Каждая из них продуцирует антитела только одной специфичности, т.е. к одной антигенной детерминанте. Территориально эти клетки располагаются в селезенке, лимфоузлах, костном мозге, лимфоидных образованиях слизистых оболочек.

При первичном контакте организма с антигеном и антителообразовании различают индуктивную и продуктивные фазы. Продолжительность первой фазы составляет около 2 сут. В этот период происходит пролиферация и дифференцировка лимфоидных клеток, развитие плазмобластической реакции. Вслед за индуктивной наступает продуктивная фаза. В сыворотке крови антитела начинают определяться с 3-го дня после контакта с антигеном. Эти антитела относятся к классу IgM. С 5–7 дня происходит постепенная смена синтеза IgM на синтез IgG той же специфичности. Обычно к 12–15 дню кривая антителообразования достигает максимума, далее уровень антител начинает снижаться, но определенное их количество можно обнаружить и через много месяцев, а иногда и лет. При повторном контакте организма с тем же антигеном индуктивная фаза занимает лишь несколько часов. Продуктивная фаза протекает быстрее и интенсивнее, осуществляется синтез преимущественно IgG (рис. 91).

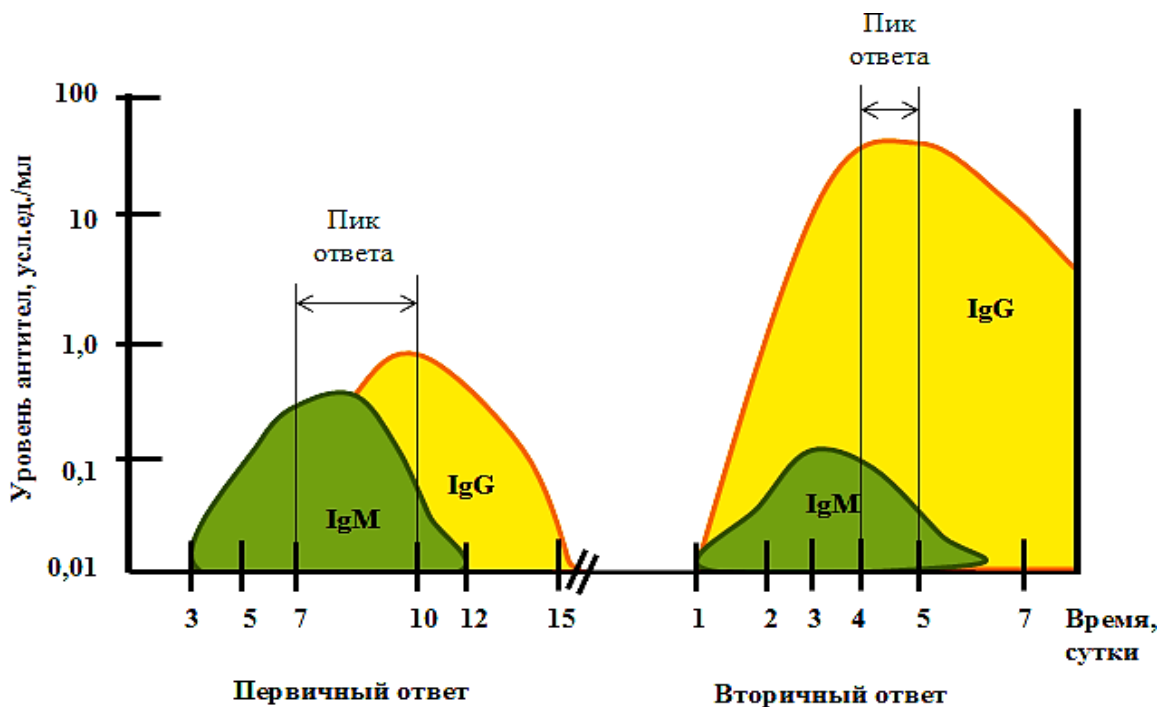


Рис. 91. Первичный и вторичный иммунный ответ

Генетический контроль биосинтеза антител

Типичная молекула иммуноглобулина состоит из 2H и 2L цепей. Полипептидные цепи синтезируются на рибосомах В-лимфоцитов, собираются в

молекулу (глобулу) и транспортируются либо на клеточную поверхность, где они выполняют роль В-клеточных рецепторов, либо в кровь, где они выполняют функции антител.

Синтез полипептидных цепей контролируется тремя генными локусами, расположенными на разных хромосомах. Локусы имеют различные комбинации, в зависимости от контроля той или иной цепи и могут содержать следующие участки:

- 1) L – кодирует лидерный пептид, необходимый для секреции антител на поверхность клетки;
- 2) V – гены варибельной части антитела;
- 3) C – гены константной части;
- 4) J – гены соединительной области полипептида;
- 5) D – гены дополнительной варибельности.

Таким образом, в каждой В-клетке, синтезирующей только один класс (подкласс) антител, функционирует один из локусов генетического контроля синтеза легких цепей (один из многочисленных вариантов V и I или I-C) и локус контроля синтеза H-цепи (один из вариантов V, D, I, C).

Клеточная кооперация в иммунном ответе

Процессинг и презентация антигена. Всякая микробная клетка представляет собой сложный антигенный комплекс, в состав которого входят десятки антигенов, каждый из которых индуцирует «свой» иммунный ответ. Таким образом, иммунный ответ на микроорганизм является суммарным эффектом ответа на большинство антигенов, входящих в его структурные и функциональные компоненты. Расщепление микробной клетки до отдельных антигенов и их антигенных детерминант (эпитопов) осуществляется вспомогательными клетками, прежде всего макрофагами, и носит название процессинга. Роль антигенов HLA состоит в транспортировке эпитопов на клеточную поверхность и представлении их (презентации) другим клеткам, участвующим в клеточной кооперации при иммунном ответе.

При поражении соматических клеток макроорганизма микроорганизмами, для которых характерно внутриклеточное паразитирование (вирусы, риккетсии, хламидии, микобактерии и др.) процессинг антигенов осуществляется в протеосомах, а затем эпитопы транспортируются антигенами HLA I на поверхность этих клеток. Комплекс HLA I – эпитоп является сигналом для TCD₈⁺ цитолитической клетки, инициирующей процесс лизиса пораженной клетки вместе с патогеном (рис. 92).

Другая ситуация возникает при заболеваниях, для возбудителей которых внутриклеточное паразитирование не является обязательным (сальмонеллез, шигеллез и др.). Процессинг антигена выполняется после фагоцитоза возбудителя или эндоцитоза его компонентов макрофагами на территории их эндо-

сом. Эпито́пы транспортируются молекулами HLAII на поверхность макрофага и презентуются другим иммунокомпетентным клеткам для последующей продукции антител (рис. 93).

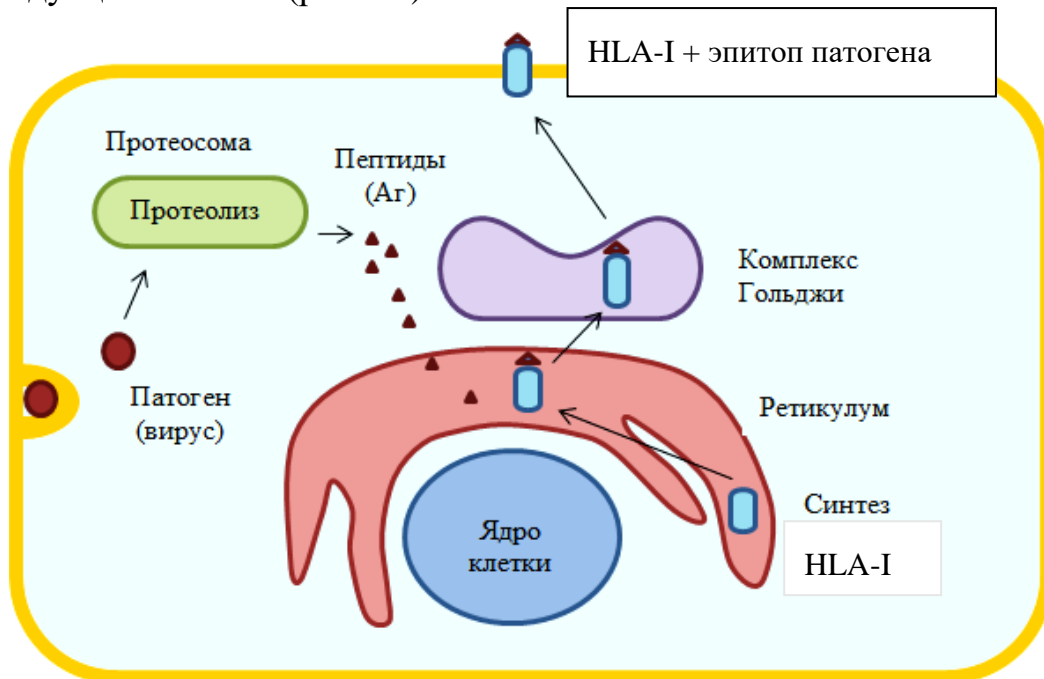


Рис. 92. Презентация антигена соматическими клетками

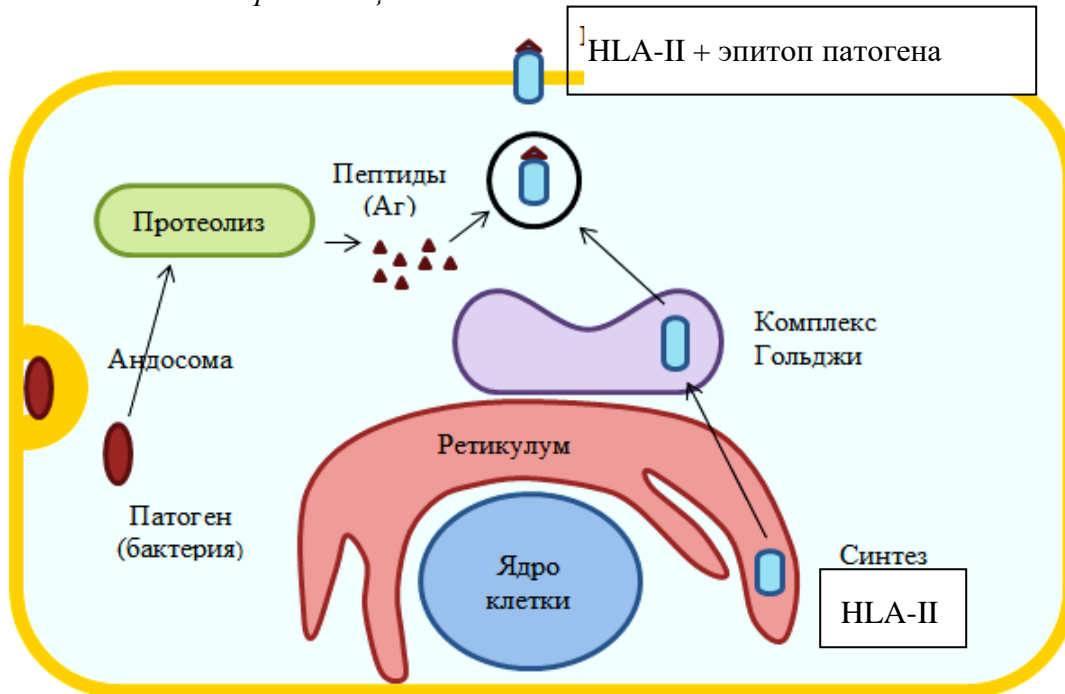


Рис. 93. Презентация антигена макрофагами

Т-клеточный рецептор. Состоит из двух цепей (рис. 94), α -цепь представлена 4 доменами: варибельный внеклеточный домен, константный внеклеточный домен, гидрофобный внутримембранный и гидрофильный цитоплазматический (Мм – 50 кDa). β -цепь имеет аналогичные домены (Мм – 45 кDa).

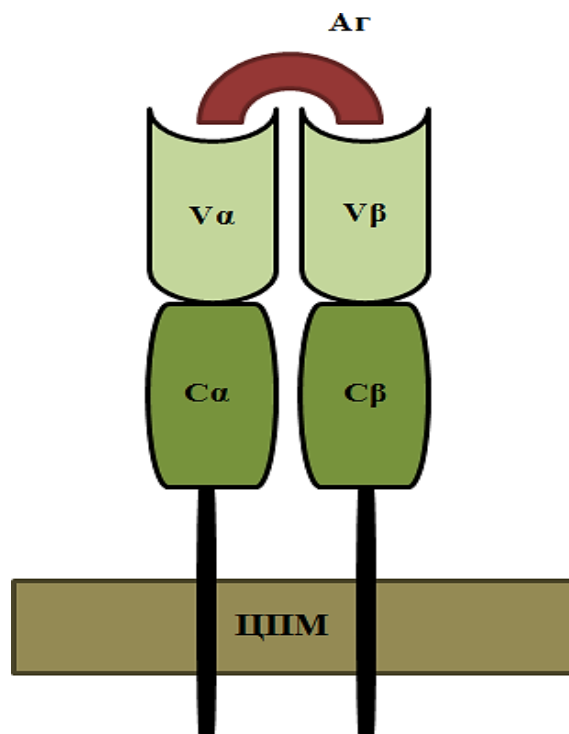


Рис. 94. Строение Т-клеточного рецептора (TCR):
 ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; $V\alpha$ – вариабельный участок α -цепи;
 $V\beta$ – вариабельный участок β -цепи; $C\alpha$ – константный участок α -цепи;
 $C\beta$ – константный участок β -цепи; Аг – антиген

Корецепторы межклеточных взаимодействий (CD рецепторы)

На поверхности клеток, принимающих участие в иммунном ответе, расположены белковые молекулы (молекулярные комплексы) выполняющие роль корецепторов межклеточных взаимодействий. Известно более 300 корецепторов и они обозначаются номерами соответственно принятой классификации таких комплексов (англ. cluster of differentiation, cluster of designation, CD) – CD1, CD2, CD3 ... CD100 и т.д. CD рецепторы могут быть представлены на Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, гранулоцитах и др. Функция некоторых корецепторов сводится к распознаванию «своей» антигенпредставляющей клетки. Например, Т-лимфоцит, имеющий CD4 (Т-хелпер), или CD8 (цитолитический Т-лимфоцит), распознает «свою» антигенпредставляющую клетку через «узнавание» антигенов HLAII или HLAI. Дополнительно Т-цитолитический лимфоцит (Тс) проводит это «узнавание» и через CD28 корецептор Тс и CD80/86 макрофага (рис. 95, 96).

Другие CD рецепторы (CD25, 121, 122, 124, 126, 127, 128, 130 и др.) обладают свойствами некоторых интерлейкинов. Взаимодействие отдельных рецепторов (CD154 Th2 и CD40 В-лимфоцитов) приводит к образованию комплекса, обладающего свойством мощного индуктора пролиферации В-лимфоцитов. Роль многих корецепторов изучена еще недостаточно.

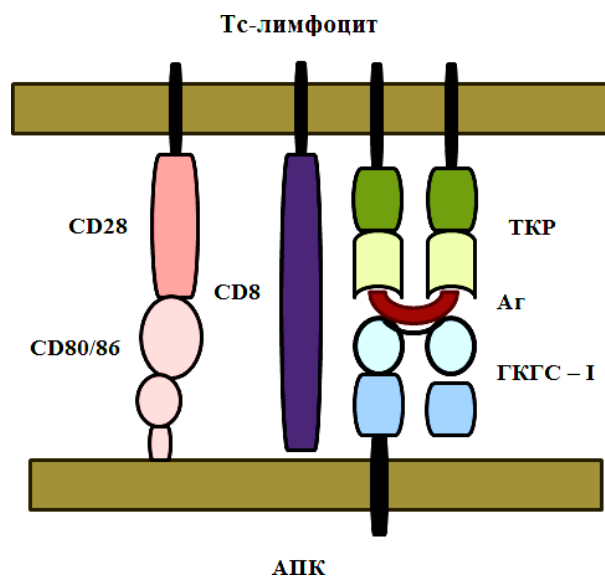


Рис. 95. Корецепторы межклеточных взаимодействий Тс-лимфоцита

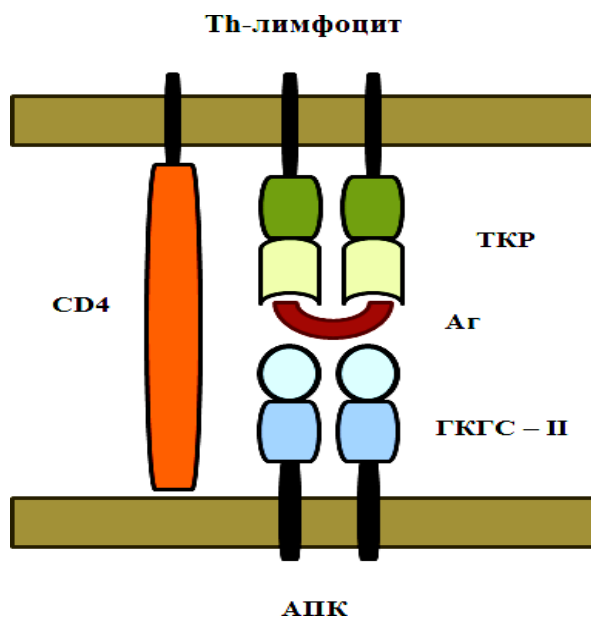


Рис. 96. Корецепторы межклеточных взаимодействий Т-хелпера

Клеточный (Th1) тип иммунного ответа

Клеточный тип иммунного ответа осуществляется Т-системой иммунитета с участием *цитотоксических Т-лимфоцитов*. В качестве антигенов, запускающих иммунный ответ по типу Th1, выступают: внутриклеточные паразиты, опухолевые клетки, вирионы и др. Макрофаг (антигенпредставляющая клетка – АПК) адсорбирует на своей поверхности антиген, поглощает его, расщепляет и представляет на своей поверхности (процессинг антигена) в комплексе с молекулами HLA-II наивному Т-хелперу (Th0). В процессе распознавания антигена происходит активация макрофага, который секретирует цитокины (ИЛ-12, IFN- γ).

Под влиянием ИЛ-12 наивный Т-хелпер (Th0) трансформируется в Th1и

продуцирует IFN- γ , ФНО- α и ИЛ-12. Под их действием из костного мозга поступают цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ или Т-киллеры) и активируют контакт Т-киллеров (CD₈) с рецептором HLA I макрофага или клетки мишени, на котором представлена та же антигенная детерминана. При прямом контакте с такой клеткой ЦТЛ выделяет гранулы, содержащие белки – перфорин, гранзим. Перфорин встраивается в мембрану соматической клетки, образует в ней каналы «поры» и может действовать как мембраноатакующий белок. Гранзим (сериновые протеиназы) индуцирует один из вариантов апоптоза и гибель соматической клетки вместе с находящимися в ней микробами. Выделяемый Th1 ИЛ-2 стимулирует пролиферацию таких, уже антигенспецифических ЦТЛ. Помимо этого, образуется клон Т-клеток памяти, которые долго циркулируют в организме и способны быстро переходить в активированные ЦТЛ. Таким образом, главной функцией ЦТЛ в противоинфекционной защите является уничтожение соматических клеток организма, внутри которых находится возбудитель, а на поверхности – метка, комплекс HLA I + эпитоп патогена.

Гуморальный (Th2) тип иммунного ответа

При развитии гуморального ответа происходит выработка *антител (иммуноглобулинов)* к чужеродному антигену.

Макрофаг переваривает и презентрует антигенную детерминанту в комплексе с HLA II наивному Т-хелперу (Th0). Под влиянием ИЛ-4, который продуцирует макрофаг, Th0 трансформируется в Th2. Важнейшими из интерлейкинов, продуцируемых Th2, являются ИЛ-4,5,6,10, которые активируют В-лимфоциты. На поверхности В-лимфоцитов находится иммуноглобулиновый рецептор (BCR), который распознает, захватывает и переносит антиген внутрь клетки.

В-лимфоцит может получить микробный пептид (антиген) разными путями:

1. Получение растворимого антигена из окружающей микросферы. Пептид не требует дополнительной обработки, так как это уже сделано другой клеткой. Происходит селекция антигеном В-лимфоцита (В-лимфоцитов), имеющего предсуществующие γ -глобулиновые рецепторы на своей поверхности, наиболее специфические к данному антигену.
2. Получение растворимого антигена с помощью γ -глобулинового рецептора, его дальнейший процессинг на территории В-лимфоцита и представления на мембране В-лимфоцита в комплексе с HLA II В-лимфоцита.
3. Получение антигена с поверхности макрофага. Селекция В-лимфоцитов по γ -рецепторам. Процессинг антигена в В-лимфоцитах и его представление Т-лимфоцитам.

Сигнал, полученный от антигенсвязывающего рецептора, а также стимуляция интерлейкинами запускают пролиферацию и дифференцировку В-лим-

фоцитов. В результате образуется клон высокоактивных лимфоцитов, синтезирующих антитела специфичные к данному антигену. Также образуется клон В-клеток памяти, которые долго сохраняются в организме (иммунологическая память). Гуморальный тип ответа наиболее важен в отношении внеклеточно расположенных микроорганизмов. Антитела усиливают их поглощение и переваривание фагоцитами.

Особенности иммунитета при бактериальных, грибковых и протозойных инфекциях

Антибактериальный иммунитет

Формирование механизмов саногенеза (освобождения от антигенов) при различных бактериальных инфекциях лежит в основе некоторых особенностей иммунитета, возникающего в течение таких заболеваний. Так, при бактериальных инфекциях, возбудители которых продуцируют экзотоксин (дифтерия, столбняк ботулизм, газовая гангрена и др.) ведущую роль в формировании иммунитета играют образующиеся в организме антитела (антитоксины). Взаимодействие молекулы антитоксина и молекулы токсина может приводить к разным результатам:

а) блокаде рецепторного участка молекулы токсина и, вследствие этого, ограничению фиксации токсина на рецепторах клеток-мишеней;

б) прямой нейтрализации каталитического (энзиматического, токсического) участка молекулы токсина;

в) образованию иммунного комплекса с нейтрализацией токсического, рецепторного и (или) транслокационного участков (субъединиц) токсина. Такие комплексы фагоцитируются и утилизируются клетками макроорганизма.

Однако антитоксические антитела не блокируют адгезию бактерий на поверхности клеток-мишеней и их колонизацию. Вследствие этого, искусственный антитоксический иммунитет не создает полной защиты макроорганизма и не предотвращает фиксацию бактерий на поверхности клеток-мишеней, колонизацию клеток и ткани, размножение бактерий.

При другой группе бактериальных инфекций (менингококковая инфекция, коклюш, легионеллез и др.) решающая роль принадлежит иммунному лизису и фагоцитозу бактерий. Образующиеся при этих заболеваниях IgG инициируют целый ряд антителоопосредованных биологических реакций:

а) при фиксации АТ на поверхности бактерий происходит активация комплемента по классическому варианту с образованием мембраноатакующего комплекса и последующим лизисом обнаженных участков мембран бактерий;

б) опсонизация бактерий антителами с последующим взаимодействием Fc-фрагментов антител с Fc-рецепторами макрофагов, что приводит к усилению поглотительной и переваривающей активности фагоцита;

в) образующийся комплекс «бактериальный АГ–АТ–С_{1,4,2,3В}» фиксируется на рецепторах макрофагов к С_{3В}, что также ведет к усилению поглотительной активности таких комплексов фагоцитами;

г) нейтрализация антителами антифагинов, выделяемых бактериями наружу (фактор, препятствующий образованию фагоцитами псевдоподий; фактор, препятствующий миграции макрофагов) или входящих в состав их анатомических структур (М-протеин стрептококков, капсульные вещества пневмококков и др.).

Таким образом, формирующийся при этих заболеваниях иммунитет зависит от уровня циркулирующих антител, содержания и активности компонентов комплемента, а также от функционального состояния фагоцитов.

К следующей группе бактериальных инфекций, со своими особенностями формирования иммунитета, относятся такие, возбудители которых являются внутриклеточными паразитами, способными длительно существовать внутри фагоцитов и даже размножаться в них (туберкулез, туляремия, бруцеллез, листериоз и др.).

Основными механизмами, позволяющими бактериям осуществлять внутриклеточный паразитизм являются:

- 1) блокада фаголизосомального слияния (микобактерии туберкулеза);
- 2) резистентность бактерий к действию лизосомальных ферментов (гонококки, стафилококки);
- 3) способность бактерий быстро покидать фагосомы после поглощения и длительно пребывать в цитоплазме (листерии).

Для заболеваний с длительным внутриклеточным пребыванием и размножением возбудителя (персистенция) характерно образование гранул в пораженной ткани. Такие бактерии становятся недоступными для действия антител и гуморальных антибактериальных факторов. Механизм саногенеза и формирования иммунитета при таких заболеваниях связан, прежде всего, с образованием цитотоксических Т-лимфоцитов, оказывающих киллинг- эффект на клетки-мишени, содержание в них паразитирующих бактерий и маркированных рецепторами HLA I, презентующих АГ этих бактерий.

Особенности иммунитета при грибковых заболеваниях

Особенности противогрибкового иммунитета зависят от морфологических свойств грибов (размеры клеток, форма), сложности их антигенного состава, изменчивости в зависимости от условий существования, формы и стадии микоза.

Большинство грибов относятся к свободноживущим организмам и только некоторые из них способны вызывать заболевания. Более того, для возникновения заболевания у человека необходимым условием является наличие у него иммунодефицита по полиморфноядерным лейкоцитам, Т-лимфоцитам, С₃ компоненту комплемента. Функциональными дефектами лейкоцитов явля-

ется их неспособность образовывать псевдоподии (синдром «ленивых лейкоцитов»), неспособность формировать фаголизосомы (синдром Чедиака–Хигаси), нарушение способности к продукции активных форм кислорода, обеспечивающих переваривание микроба. Дефицит по C_3 также ведет к снижению активности фагоцитов. И, наконец, наиболее часто микозы у человека возникают при низкой продукции Т-лимфоцитов (T_c , T_h).

Формирование иммунитета связывают с восстановлением функциональной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов и усиленной продукцией Т-лимфоцитов.

Специфические антитела образуются лишь при некоторых формах глубоких микозов. Считают, что они не принимают участия в механизмах защиты, являясь свидетелями иммунной перестройки организма.

Особенности иммунитета при протозойных заболеваниях

Особенности обусловлены внутриклеточной локализацией возбудителей, изменчивостью их поверхностных антигенов, наличием антигенов, общих с антигенами клеток человека, иммуносупрессивными свойствами паразитов.

При протозойных заболеваниях могут образовываться IgM и IgG, но специфичность их крайне низка вследствие их образования в результате поликлональной активации В-лимфоцитов и антигенной изменчивости паразитов.

Выздоровление наступает при активации Т-лимфоцитов (T_c , T_h). Полноценный постинфекционный иммунитет формируется очень редко.

Противовирусный иммунитет

Особенности противовирусного иммунитета обусловлены своеобразием анатомического строения вирусов, сравнительно небольшим набором антигеновых оболочек, возможностью дрейфа поверхностных антигенов (белков), абсолютным паразитизмом вирусов, особенностью их взаимодействия с чувствительными клетками.

В макроорганизме вирус может находиться в различных состояниях:

- а) внеклеточно (вирион);
- б) внутриклеточно, на разных стадиях быстрого или медленного продуктивного взаимодействия с чувствительной клеткой (вирус);
- в) быть интегрированным в геном клетки-мишени (непродуктивное взаимодействие, провирус).

Соответственно этим основным состояниям вируса формирующийся противовирусный иммунитет направлен на нейтрализацию и удаление вируса и его антигенов из организма, что достигается с помощью антител, а также на уничтожение собственных инфицированных вирусом клеток-мишеней цитотоксическими Т-лимфоцитами (T_c).

Образующиеся при вирусных инфекциях антитела IgG могут участвовать в разных биологических реакциях.

1. Нейтрализация инвазивных свойств вирионов. Образовавшийся комплекс

связывается с поверхностью макрофага за счет его Fc-рецепторов. Поглощение комплекса обычно ведет к гибели возбудителя, непоглощенные иммунные комплексы могут диссоциировать, а освободившиеся вирионы заражают чувствительные клетки. Длительная циркуляция непоглощенных и недиссоциированных иммунных комплексов по всему организму может приводить к депонированию их в различных тканях организма и индуцировать развитие местных воспалительных реакций через активацию системы комплемента или интерлейкинов после фиксации комплекса клетками, имеющими рецептор к Fc-фрагменту антител (гепатит В, инфекционный мононуклеоз, подострый склерозирующий панэнцефалит и др.).

2. Антителоопосредованный комплемент-зависимый цитолиз. Лизис мембраны зараженной клетки происходит за счет мембраноатакующего комплекса (МАК) комплемента. Освободившиеся вирионы подвергаются воздействию антител.

3. Антителоопосредованный цитолиз клеток-мишеней макрофагами и гранулоцитами при выделении ими в момент контакта с пораженной клеткой гранзимов и цитолизина. Такие макрофаги и гранулоциты должны иметь Fc-рецепторы. Специфичностью по отношению к вирусному антигену они не обладают. Цитотоксические Т-лимфоциты в этой реакции не участвуют. Их активность от наличия антител не зависит.

Разрушение пораженных вирусом клеток осуществляется также цитотоксическими Т-лимфоцитами Тс. Тс способны лизировать инфицированные вирусом клетки, реагируя на вирусный антиген представленный клеткой на HLA I. Для цитотоксического действия Тс-лимфоцитам необходим непосредственный контакт с клеткой-мишенью. После этого происходит выделение Тс-лимфоцитом гранзимов или цитолизина, вызывающих изменение мембранной проницаемости клетки-мишени. Ее осмотическое набухание, разрыв мембраны и выход содержимого цитоплазмы в микроокружающую среду.

Способностью к интеграции вирусной нуклеиновой кислоты в геном клетки-мишени обладают ДНК-содержащие вирусы и ретровирусы. Потомство зараженной клетки наследует провирус. Вирусные антигены (белки) в клетке не синтезируются, они не представлены на HLA I. Иммунному надзору такая клетка не поддается.

4.3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Серологические методы исследования применяются для:

- а) выявления с диагностической целью антител в сыворотке крови обследуемого;
- б) определения родовой, видовой и типовой принадлежности микроорганизма.

В основе серологических методов диагностики – реакция специфического

взаимодействия антигена с антителом. Как правило, в лаборатории такие реакции проводят *in vitro*, и проходят они в две фазы:

- 1) специфической;
- 2) неспецифической.

В специфическую фазу происходит специфическое взаимодействие антигена с антителом. А в неспецифическую – комплекс «антиген–антитело» проявляется в виде осадка, зоны помутнения и др. Эта фаза требует определенных условий (наличие электролита, оптимального pH среды).

В лабораторной практике применяют серологические реакции, основанные на прямом взаимодействии антигена с антителом (агглютинация, преципитация) и опосредованные реакции (реакция непрямой гемагглютинации, реакция связывания комплемента), а также реакции с использованием меченых антител или антигенов (иммуноферментный, радиоиммунный анализ, метод флюоресцирующих антител).

Определение антител осуществляют с использованием известных антигенов. В качестве антигенов применяют диагностикумы, содержащие взвесь инактивированных микроорганизмов или их антигены. Как правило, результаты серологической диагностики получают при исследовании парных сывороток крови больных, взятых в первые дни болезни и через определенные промежутки времени от начала заболевания.

Определение возбудителя или его антигенов проводят с известными диагностическими сыворотками, содержащими специфичные антитела.

Реакция агглютинации (РА)

Реакция агглютинации (от лат. *agglutinate* – склеивание) применяется в лабораторной практике для идентификации выделенных микроорганизмов или для обнаружения специфических антител в сыворотке крови.

Механизм реакции основан на взаимодействии детерминантных групп корпускулярного антигена с активными центрами иммуноглобулина в электролитной среде. Реакции протекают в две фазы – соединение антигена с антителом, вторая фаза – выделение в осадок образовавшегося комплекса АГ+АТ. Характер осадка зависит от природы антигена: жгутиковые бактерии дают крупнохлопьевый осадок, капсульные – тяжистый, безжгутиковые и бескапсулярные – мелкозернистый (рис. 97).

Существуют два варианта постановки реакции агглютинации:

- пластинчатый (ориентировочный);
- пробирочный (развернутый).

Пластинчатая агглютинация является качественной реакцией и служит для предварительной идентификации микроорганизмов (рис. 98). Учет реакции агглютинации на стекле производится через 5–10 мин.

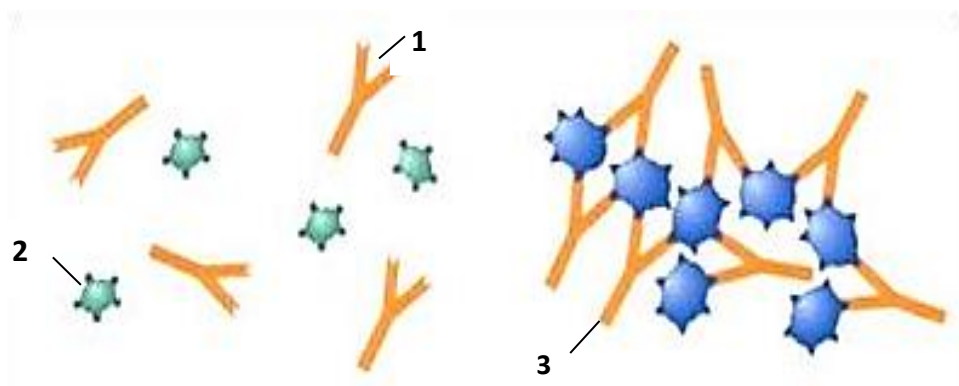


Рис. 97. Реакция агглютинации: 1 – микробная клетка; 2 – антиген, 3 – антитела

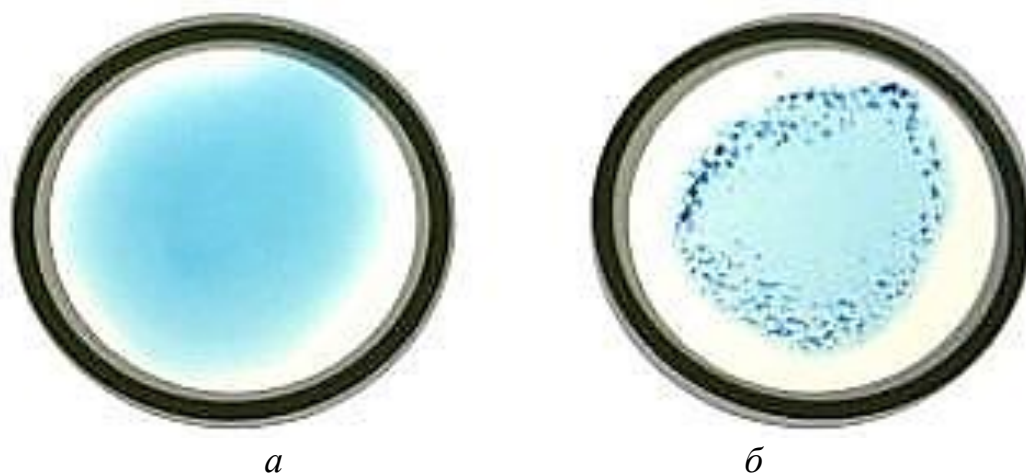


Рис. 98. Реакция агглютинации на стекле: отрицательная реакция (а);
положительная реакция (б)

Пробирочная агглютинация используется для определения количественного содержания антител, при этом в пробирках ставится развернутая реакция агглютинации.

При положительной реакции на дне пробирки образуется осадок (агглютинат). За титр антител принимают последнее разведение, в котором наблюдается агглютинация (рис. 99). Постановка РА должна сопровождаться контролем сыворотки и антигена. Учет пробирочной реакции агглютинации проводят через 18–20 ч.

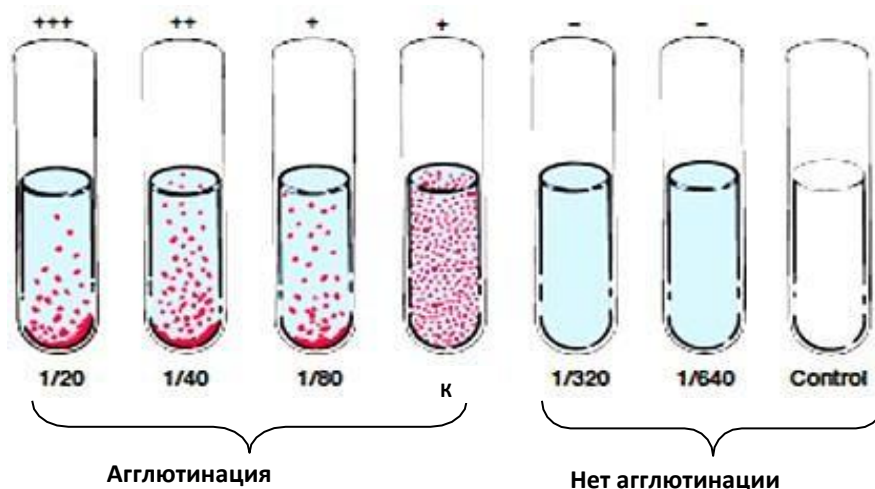


Рис. 99. Развернутая реакция агглютинации в пробирках

Реакция преципитации (РП)

Феномен преципитации (от лат. *praecipito* – осаждать) заключается во взаимодействии мелкодисперсных антигенов (преципитиногенов) с соответствующими антителами (преципитинами) и образованием преципитата (рис. 100). То есть, в отличие от реакции агглютинации в данном методе антиген имеет молекулярную формулу и образует прозрачный раствор.

Постановку РП осуществляют двумя методами: в жидкой среде – по типу реакции флоккуляции, кольцепреципитации или в плотной среде в агаре (геле). РП применяют в двух целях: выявление антигенов по известной преципитирующей сыворотке или антител с использованием известных антигенов. Существует много вариантов постановок реакции, но чаще всего используют следующие методики: реакция преципитации в геле по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия по Манчини, реакция иммуноэлектрофореза, реакция флоккуляции, кольцепреципитации.

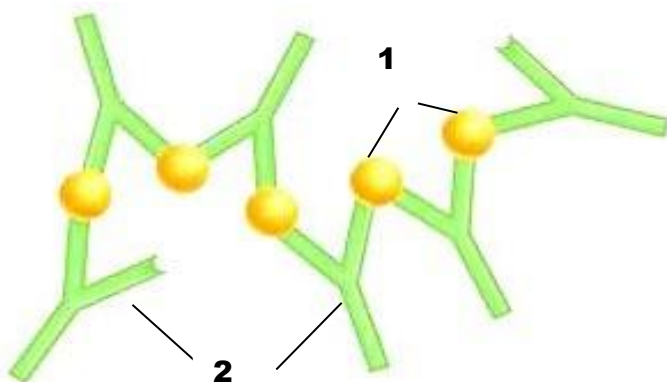


Рис. 100. Реакция преципитации:
1 – антитело; 2 – антиген

Реакция преципитации в геле по Оухтерлони. Для постановки реакции используют 1% агар Дифко, который разливают расплавленным на предметные стекла или чашки Петри слоем толщиной 0,5 см. В застывшем агаре вырезают лунки диаметром 5 мм специальным приспособлением. В одну лунку

помещают взвесь, содержащую исследуемый антиген, в другую – преципитирующую сыворотку. Антиген и антитела диффундируют в питательную среду, вступают в иммунную реакцию и образуют полосы преципитации. Учет реакции проводят предварительно через 4 ч, окончательно – через 24–48 ч. У многокомпонентных систем появляются несколько линий преципитата (рис. 101).

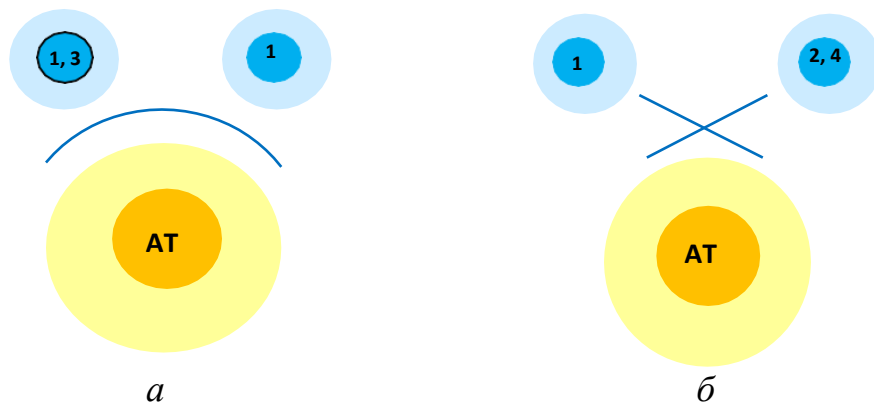


Рис.101. Реакция преципитации в геле по Оухтерлони.
У идентичных антигенов линии преципитата сливаются (а);
у неидентичных антигенов линии преципитата пересекаются (б)

Реакция кольцепреципитации. Данную реакцию применяют для выявления антигенов с помощью преципитирующей сыворотки, содержащей специфические антитела. Это качественный метод исследования. Реакцию проводят путем наслаивания на иммунную сыворотку среды, содержащей определенный антиген. Реакцию ставят в узких пробирках объемом 0,1–0,5 мл. В случае соответствия антигена и антитела на границе между ними через 3–5 мин образуется мутное опалесцирующее кольцо преципитации (рис. 102).

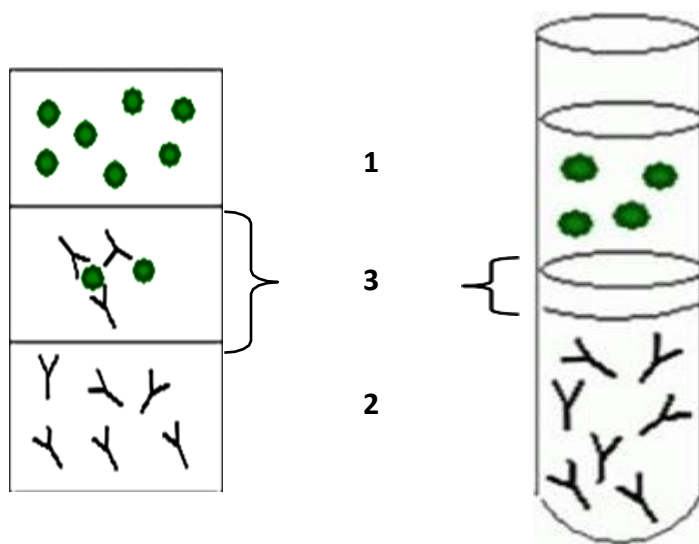


Рис. 102. Реакция кольцепреципитации: антигены (1);
антитела иммунной сыворотки (2); преципитат (3)

Необходимым условием образования нерастворимого иммунного комплекса является эквивалентное соотношение антигенов и антител.

Если в качестве антигенов в реакции используют прокипяченные и профильтрованные экстракты инфицированных тканей, то такая реакция называется *реакцией термпреципитацией* (*реакция Асколи* для выявления сибиреязвенного антигена).

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

РИФ основана на соединении антигенов бактерий, риккетсий и вирусов со специфическими антителами, мечеными флуоресцирующими красителями (флуоресцеинизотиоцианат, родамин, В-изотиоцианит, лиссатинродамин В-200, сульфохлорид и др.), имеющими реакционноспособные группы (сульфохлорид, изотиоцианит и др.). Эти группы соединяются со свободными аминогруппами молекул антител, которые не теряют при обработке флуорохромом специфического сродства к соответствующему антигену. Образовавшиеся комплексы АГ–АТ становятся хорошо видимыми, ярко светящимися структурами под люминесцентным микроскопом (рис. 103). С помощью РИФ можно обнаруживать небольшие количества бактериальных и вирусных антигенов. Различают три разновидности РИФ: прямой и непрямой метод и с участием комплимента.

Прямой метод основан на непосредственном соединении антигена с меченым антителом. *Непрямой метод* – на поэтапном выявлении комплекса АГ–АТ с помощью флуоресцентных красителей. Первый этап заключается в образовании иммунных комплексов определенного антигена со специфическими антителами. Второй этап – в выявлении этого комплекса путем обработки его меченым антигаммаглобулином.

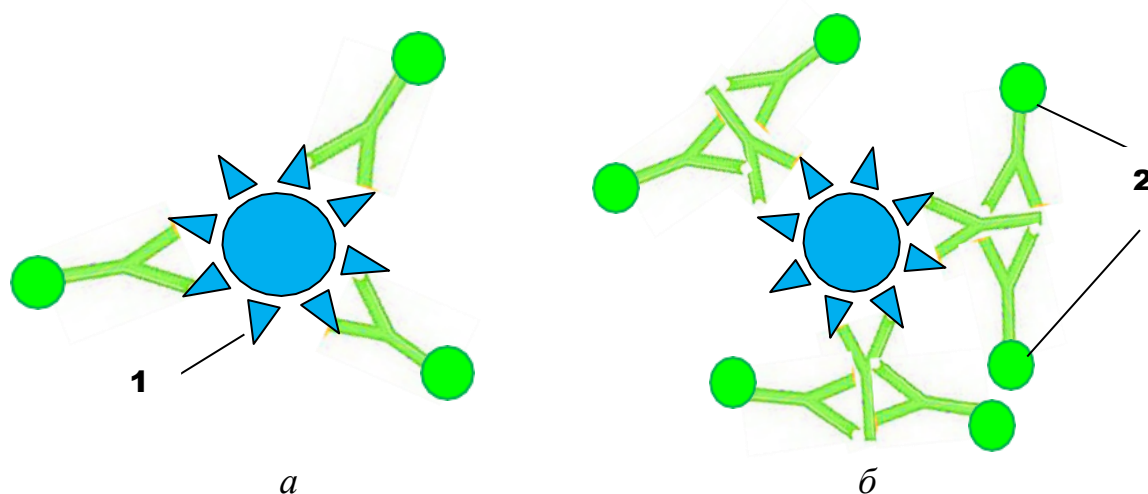


Рис. 103. Реакция иммунофлюоресценции – прямая РИФ (а); непрямая РИФ (б):
1 – бактерия, 2 – флуорохром

Преимущество не прямой РИФ в том, что она улучшает выявление слабо выраженных антигенов. Непрямой метод РИФ применяют также и для выявления антител в сыворотке больного.

Простота, высокая чувствительность, скорость получения результата РИФ позволяет использовать её, как метод ранней экспресс-диагностики гриппа, дизентерии, малярии, чумы, туляремии, сифилиса и др. Для проведения такого исследования используется люминесцентный микроскоп.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод используется для выявления антигенов или антител с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, β -галактозой или щелочной фосфатазой). После соединения антигена с меченной ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат и хромоген.

Например, субстратом для пероксидазы является перекись водорода, а хромогеном – тетраметилбензидин, ортофенилендиамин или 5-аминоса-лициловая кислота. Субстрат расщепляется ферментом, а его продукты деградации вызывают химическую модификацию хромогена. При этом хромоген меняет свой цвет – интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связанных молекул антигена и антител.

Наиболее распространен *твердофазный* ИФА, при котором один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе. В качестве твердого носителя используются микропанели из полистирола. При определении антител в лунки с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больных, антиглобулиновую сыворотку, меченную ферментом и смесь растворов субстрата для фермента и хромогена. Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют не связавшиеся реагенты путем тщательного промывания. При положительном результате изменяется цвет раствора хромогена (рис. 104 А).

Твердофазный носитель можно связывать не только с антигеном, но и с антителом. Тогда в лунки с сорбированными антителами вносят искомый антиген, добавляют иммунную сыворотку против антигена, меченную ферментом, а затем – смесь растворов субстрата для фермента и хромогена (рис. 104 Б).

ИФА применяют для диагностики заболеваний, вызванных вирусными и бактериальными возбудителями.

Иммуноблотинг (ИБ)

Иммуноблотинг или вестернблоттинг (от англ. *blot* – пятно) – высокочувствительный метод выявления белков-антигенов или антител к ним, сочетает

электрофорез и ИФА или радиоиммунный анализ (РИА).

Антигены возбудителя разделяют электрофорезом в полиакриамидном геле, затем переносят на активированную бумагу или нитроцеллюлозную мембрану (пленку), после чего выявляют их или антител к ним с помощью ИФА (рис. 105).

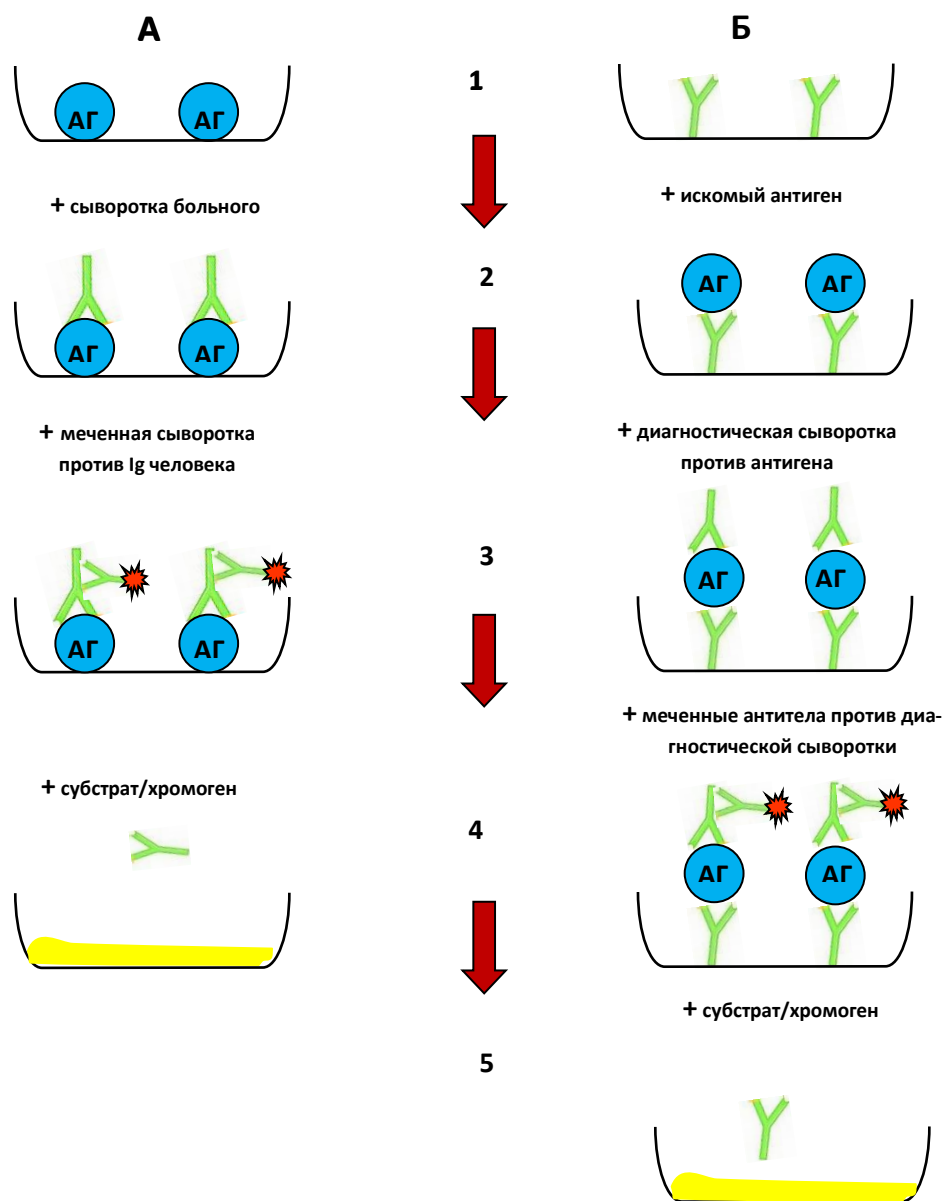


Рис. 104. ИФА: этапы (1-5) определения антител в сыворотке больного (А); антигена в исследуемом материале (Б)

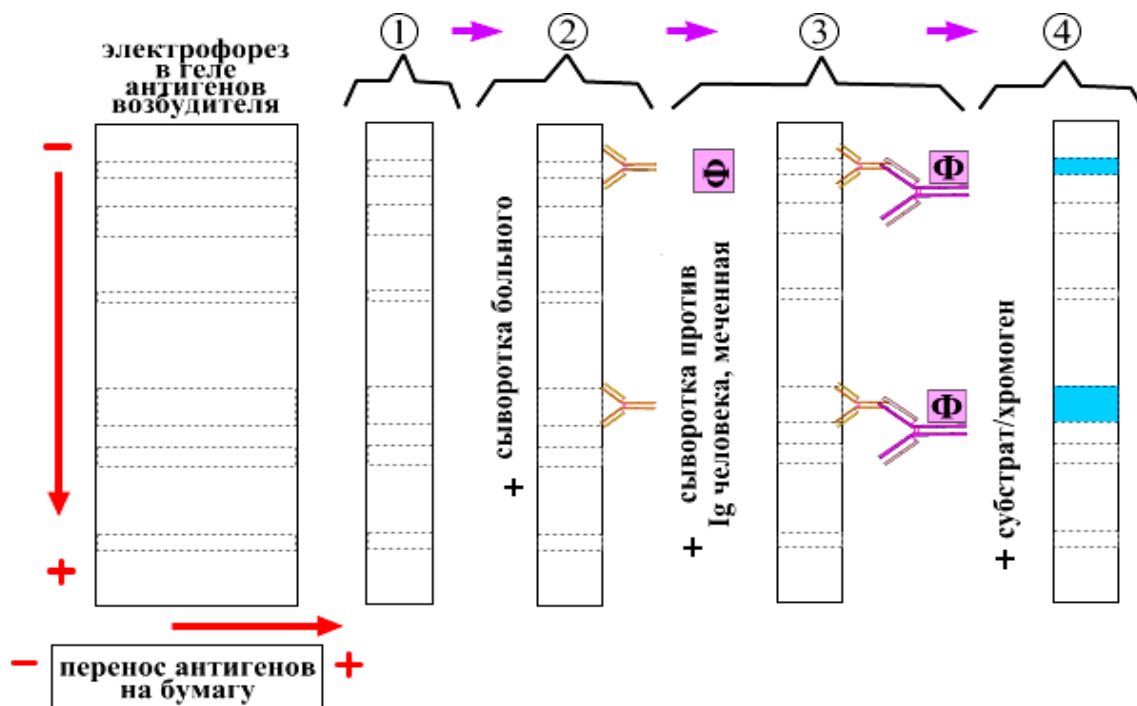


Рис. 105. Иммуноблотинг: этапы (1-4) выявления антител к антигенам возбудителя в сыворотке больного

4.4. АЛЛЕРГИЯ

Аллергия (от греч. *allos* – другой) – специфическая повышенная чувствительность к антигенам, возникающая и развивающаяся в результате неадекватной реакции иммунной системы. Антигены, вызывающие аллергические реакции, названы **аллергенами**. Выделяют аллергены:

- ингаляционные (пыльца растений, эпидермальные антигены, пыль и др.);
- пищевые (яйца, шоколад, орехи и др.);
- лекарственные (антибиотики, гормоны, витамины и др.);
- инфекционные (антигены бактерий, грибов, простейших);
- промышленные (полимеры, пестициды, металлы и др.).

Для формирования аллергии необходима предварительная сенсibilизация макроорганизма аллергеном. **Сенсibilизация** – это процесс приобретения организмом повышенной чувствительности к аллергену. Клинические проявления аллергии развиваются на последующие контакты с аллергеном. Доза антигена (аллергена), вызывающая сенсibilизацию, называется **сенсibilизирующей**. Повторное введение того же антигена через определенный промежуток времени вызывает аллергическую реакцию. Дозу антигена, вызывающую аллергическую реакцию, называют **разрешающей**.

Аллергия проявляется по типу гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) и гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). *Гиперчувстви-*

тельность немедленного типа обусловлена антителами IgE, IgG, IgM. Развивается в течение нескольких минут, часов. Десенсибилизация возможна. *Гиперчувствительность замедленного типа* обусловлена макрофагами и Th1-лимфоцитами, которые отвечают за стимуляцию клеточного ответа. Развивается в течение 6–8 ч. Десенсибилизация невозможна.

По механизму выделяют следующие типы аллергических реакций (классификация по Р. Gell и R. Coombs, 1963):

- I. Анафилактический.
- II. Цитотоксический.
- III. Иммунокомплексный.
- IV. Клеточно-опосредованный.

I, II и III типы гиперчувствительности относятся к ГНТ, IV – к ГЗТ.

Аллергические реакции развиваются закономерно и имеют следующие стадии:

1. Иммунологическая стадия.
2. Патохимическая стадия.
3. Патофизиологическая стадия.

Иммунологическая стадия начинается с контакта аллергена с уже сенсibilизированным к нему организмом, в результате чего образуется комплекс «аллерген – антитело».

Патохимическая стадия (биохимическая) характеризуется выделением биологически активных веществ (БАВ), медиаторов аллергии: гистамина, серотонина, брадикинина, ацетилхолина, гепарина.

Патофизиологическая стадия (стадия функциональных и структурных нарушений) является результатом действия БАВ на ткани-эффекторы. Данная стадия характеризуется расстройством кроветворения, спазмом гладкой мускулатуры бронхов, кишечника, изменением состава сыворотки крови, нарушением ее свертываемости, цитолизом клеток и др. Патофизиологическая стадия обуславливает клиническое проявление аллергической реакции.

I тип аллергических реакций (анафилактический, реагиновый)

Механизм развития аллергической реакции I типа опосредован АТ-реактивами, относящимся к классам IgE и IgG4, которые образуются при первичном контакте с аллергеном. Они прикрепляются Fc-фрагментом к тучным клеткам и тканевым базофилам. При повторной встрече организма и аллергена происходит перекрестное связывание аллергена с IgE, IgG4. Это приводит к дестабилизации цитоплазматической мембраны клеток и выбросу биологически активных веществ: гистамина, гепарина, простагландинов, цитокинов, ферментов и т.д (рис. 106). Ответ на аллерген развивается стремительно, в течение 5–10 мин.

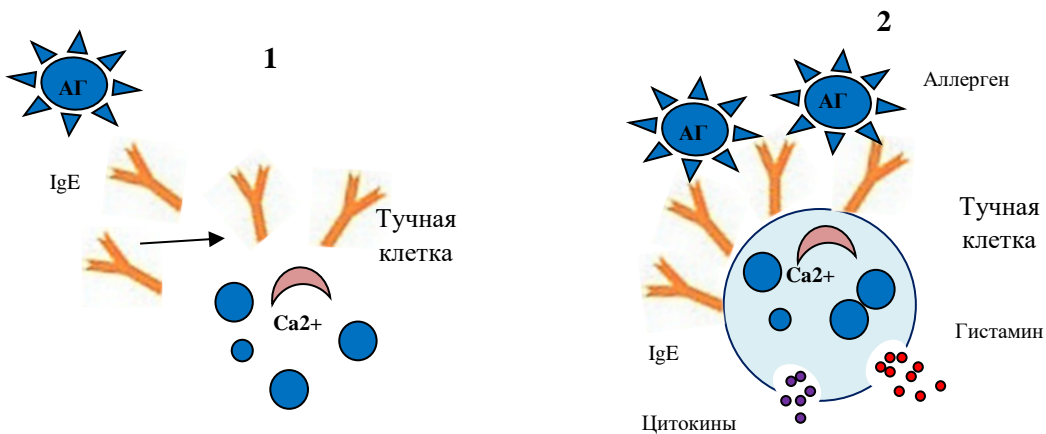


Рис. 106. I тип гиперчувствительности: первичное (1) и повторное проникновение антигена (2)

Биологически активные медиаторы вызывают сокращение гладких мышц, ослабление сердечной деятельности, развитие коллапса, повышение проницаемости кровеносных сосудов, отек, зуд и др.

Клинические проявления. Важнейшей особенностью клинических проявлений аллергической реакции I типа является то, что они развиваются, как правило, на фоне атопии.

Атопия (от греч. *atopia* – странность, необычность) – наследственная предрасположенность к развитию ГНТ. Атопия обусловлена:

- повышенной выработкой IgE к аллергенам;
- повышенным количеством Fc-рецепторов для этих антител на тучных клетках;
- повышенной проницаемостью тканевых барьеров.

Аллергия I типа проявляется в виде крапивницы, ринита, риноконъюнктивита, поллинозов, пищевой аллергии. Может появиться бронхиальная астма. Самое опасное развитие аллергической реакции – анафилактический шок, который протекает остро с развитием коллапса, отеков, спазма гладкой мускулатуры. Часто заканчивается смертью.

Анафилаксия может пассивно переноситься от больного человека к здоровому с помощью IgE-антител к аллергену. Этот феномен получил название *реакция Прауснитца-Кюстнера*.

Лабораторная диагностика. Определение в сыворотке: общего IgE; IgE и IgG к предполагаемым аллергенам; уровня гистамина, интерлейкинов (ИЛ-4, 5). Постановка провокационных назальных, ингаляционных тестов. Кожные тесты (скарификационные пробы) проводят с атопическими аллергенами (бытовыми, пищевыми, пыльцевыми и др.).

Скарификационные кожные пробы учитывают через 15–20 мин после контакта с аллергеном. Положительной проба считается при появлении волдыря (2–10 мм) с гиперемией на месте скарификации. При отрицательной реакции волдырь и выраженная гиперемия отсутствуют. Результаты сравнивают

с контролем – реакцией на растворитель аллергена и гистамин.

II тип аллергических реакций (цитотоксический или цитолитический)

В основе этого типа реакций лежит то, что антигены (эндогенные или экзогенные химические вещества, лекарственные препараты), фиксированные на мембране клетки, взаимодействуют с антителами (IgG или IgM). Затем происходит цитолиз клеток в результате:

- активация системы комплемента (комплементзависимый цитолиз),
- иммунный фагоцитоз,
- развитие антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), которая осуществляется НК-клетками, что приводит к повреждению и лизису клетки.

Комплементзависимый цитолиз. Антитела взаимодействуют с антигенами на поверхности клеток. Затем к Fc-фрагменту антител присоединяются компоненты комплемента, происходит активация по классическому пути с образованием анафилатоксинов (C3a) и мембранатакующего комплекса (МАК). Происходит комплементзависимый лизис клетки (рис. 107).

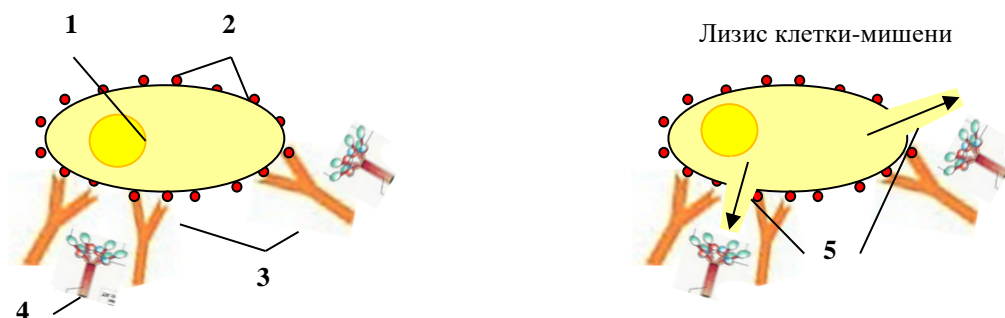


Рис. 107. Комплементзависимый цитолиз: клетка-мишень (1); антигены (2); антитела (3); комплемент (4); МАК (5)

Иммунный фагоцитоз. В результате взаимодействия антител с антигенами клетки-мишени, участия комплемента (опсонина C3b) происходит ее опсонизация, что усиливает поглощение такого объекта фагоцитами (рис. 108).

Антителозависимая клеточная цитотоксичность. Опсонизированные антителами клетки-мишени взаимодействуют с НК-клетками через Fc-фрагмент антител. После этого НК «высвобождают» перфорины и гранзимы, с помощью которых происходит лизис клетки-мишени (рис. 109).

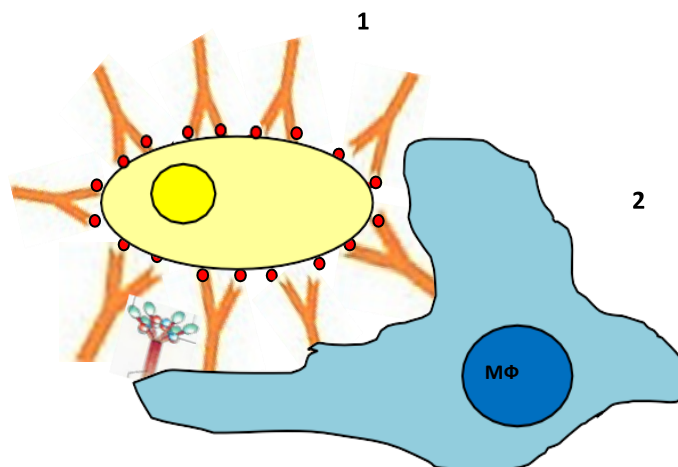


Рис. 108. Иммунный фагоцитоз: опсонизация (1); фагоцит/макрофаг (2)

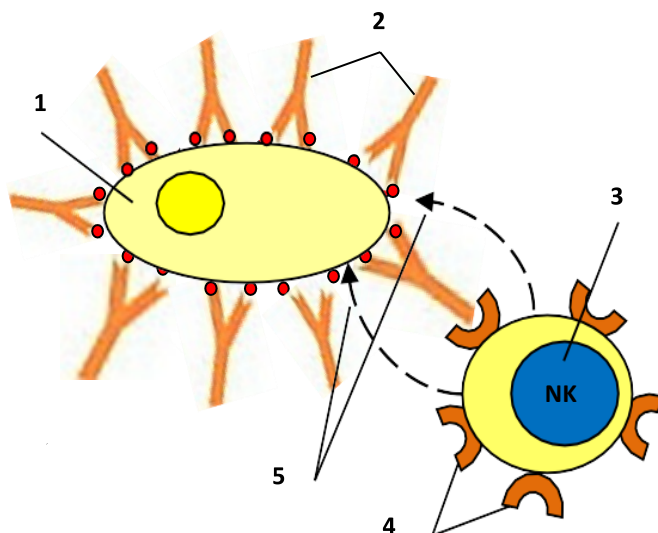


Рис. 109. Антителозависимая клеточная цитотоксичность: клетка-мишень (1); антитела (2); NK-клетка (3); Fc-рецептор (4); перфорины и гранзимы (5)

Клинические проявления. По цитотоксическому типу могут развиваться лекарственно-индуцируемая гемолитическая анемия и тромбоцитопения, так как появляющиеся антитела лизируют клетки (эритроциты, тромбоциты), которые содержат этот антиген. II тип аллергической реакции лежит в основе некоторых аутоиммунных болезней: злокачественная миастения, вульгарная пузырчатка, синдром Гудпасчера, аутоиммунный гипертериодизм.

Лабораторная диагностика включает: определение циркулирующих противотканевых антител, определение при помощи РИФ наличия антител и комплекса в поврежденных участках (биопсия).

III тип аллергических реакций (иммунокомплексный)

Механизм развития основан на образовании растворимых иммунных комплексов (антиген-антитело-комплемент) с участием IgG, реже – IgM.

III тип аллергии инициируется избытком антигенов или недостатком комплемента. Антигены могут быть экзогенными (хронические бактериальные, вирусные, грибковые, протозойные инфекции) или эндогенными. Образовавшиеся иммунные комплексы откладываются на структурах, которые имеют Fc-рецепторы (стенки сосудов, базальные мембраны и др.) (рис. 110). В условиях значительного избытка антигенов такие иммунные агрегаты обладают токсическим действием. Активация комплемента (C3a, C3b, C5a) в местах отложения комплексов приводит к появлению анафилотоксинов, которые меняют проницаемость сосудов, привлекают полиморфно-ядерные лейкоциты, способствуют развитию воспаления. При повреждении гранулоцитов высвобождаются протеолитические ферменты, разрушающие ткани организма, вазоактивные амины (гистамин и др.). Появляются противовоспалительные цитокины, включая ФНО- α и хемокины. На поздних стадиях в процесс вовлекаются макрофаги.

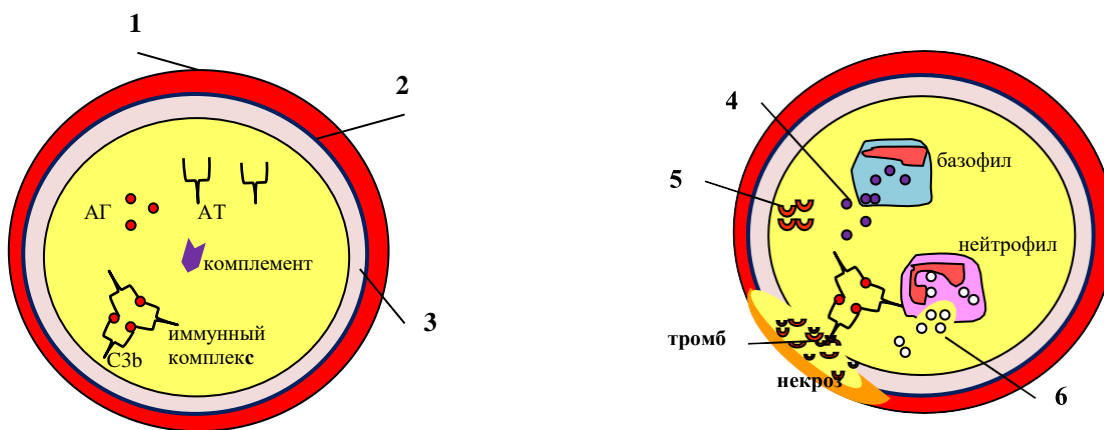


Рис. 110. Гиперчувствительность III типа (отложение иммунных комплексов в стенках кровеносных сосудов): стенка сосуда (1); базальная мембрана (2); эндотелий (3); вазоактивные амины (4); агрегированные тромбоциты (5); ферменты (6)

Клинические проявления. Реакция может общей (сывороточная болезнь) или ограничиться отдельными органами (волчаночный нефрит, васкулит, аспергиллез), тканями (системная красная волчанка, реакция Артюса).

Лабораторная диагностика. Определяют с помощью РИФ отложения иммуноглобулинов и комплемента в биоптатах тканей. В иммунных комплексах, осажденных полиэтиленгликолем из крови, определяют IgG.

IV тип аллергических реакций (клеточно-опосредованные)

Механизм развития IV типа аллергии, в отличие от реакций I, II и III типов, не связан с антителами, а обусловлен Th1-лимфоцитами и макрофагами, а также цитокинами, секретируемыми этими клетками. Реакция развивается через 1–3 сут. после повторного воздействия аллергена: происходит уплотнение и воспаление ткани в результате инфильтрации Т-лимфоцитами (Th1) и макрофагами. Аллергенами при ГЗТ являются антигены внутриклеточных паразитов (бактерий, грибов, вирусов, простейших), антигены трансплантатов, природные и синтетические гаптены (лекарственные препараты, пищевые красители, ионы металлов и др.). Наиболее сильно ГЗТ проявляется на малоиммуногенные антигены. Лучше всего реакцию вызывают малые дозы антигенов при внутрикожном введении.

В результате первой встречи аллергена с организмом происходит поглощение его макрофагами, и последующая презентация приводит к активации Т-лимфоцитов, формированию пула сенсibilизированных Т-лимфоцитов (пролиферации и дифференцировки этих клеток). Эти клетки являются субпопуляцией Th1-клеток и формируются из Th0-клеток ($CD4^+$ -клетки). В ряде случаев пул сенсibilизированных Т-клеток включает Т-цитотоксические лимфоциты ($CD8^+$ -клетки) (рис. 111).

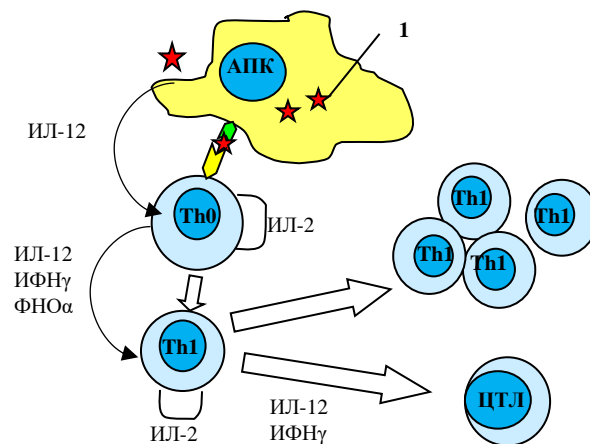


Рис. 111. IV тип аллергических реакций – ГЗТ. Первая стадия сенсibilизации: проникновение аллергена (1), клеточный иммунный ответ, образование Т-лимфоцитов-эффекторов ГЗТ

Повторный контакт сенсibilизированных Т-лимфоцитов с тем же аллергеном приводит к их активации и избыточной продукции цитокинов: ИНФ- γ , ИЛ-2, ФНО- β , ИЛ-3, ГМ-КСФ и хемокинов: ИЛ-8, МИФ (фактор ингибции миграции макрофагов), МАХФ (факторы активации и хемотаксиса макрофагов). Под влиянием этих факторов происходит концентрация макрофагов в

месте нахождения аллергена (раздражителя) и стимуляция их функциональной (фагоцитарной и антигенпрезентирующей) способности и метаболической активности. Под влиянием аллергена и цитокинов макрофаги продуцируют в окружающую ткань гидролитические ферменты, кислородные радикалы, оксид азота, активные формы кислорода и другие биологические активные вещества. Воздействие этих веществ на ткань приводит к развитию воспаления и местного дегенеративно-деструктивного процесса (рис. 112).

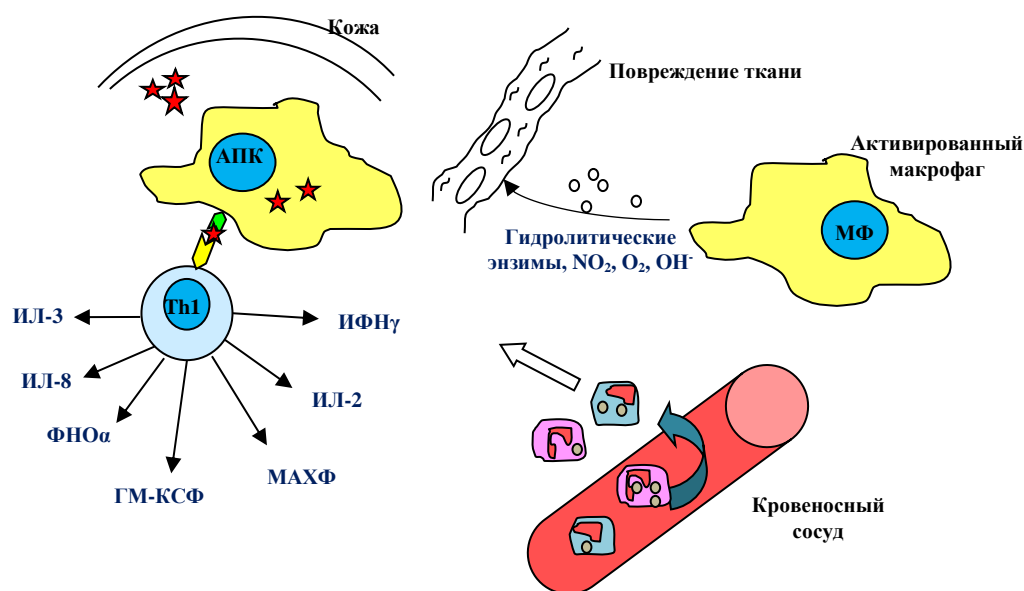


Рис. 112. Вторая стадия развития реакции ГЗТ: проникновение аллергена, усиленная продукция Т-эффекторами цитокинов, скопление и пролиферация клеток, повышение проницаемости сосудов, воспаление

Клинические проявления. Известны три типа аллергии IV типа. Это туберкулиновая, а также контактная и гранулематозная (табл. 15).

Таблица 15

Клеточно-опосредованная аллергия

Форма ГЗТ	Время реакции	Гистология	Клиника
Контактная	48–72 ч	Лимфоциты, позднее – макрофаги	Экзема, отеки
Туберкулиновая	48–72 ч	Лимфоциты, моноциты, макрофаги	Местная индукция (уплотнение)
Гранулематозная	21–28 сут	Макрофаги, эпителиоидные клетки, гигантские клетки; фиброз	Уплотнение (образование гранул) в коже, легких и др.

Необходимо отметить, что один и тот же антиген может вызывать реакции разных видов, которые могут перекрывать друг друга. К важнейшим заболеваниям с гранулематозными реакциями относятся туберкулез, бруцеллез, туляремия, болезнь Крона и др. Активация макрофагов лимфоцитами может способствовать ограничению инфекции, но постоянная стимуляция способна приводить к повреждению тканей. Развитие контактной ГЗТ могут вызвать лекарства, косметические средства, низкомолекулярные вещества (гаптены). Результатом аллергической реакции являются и некоторые аутоиммунные болезни. Например, инсулинзависимый сахарный диабет.

Лабораторная диагностика. Для инфекционных болезней с развитием клеточно-опосредованного типа аллергической реакции при диагностике используют кожно-аллергические пробы с аллергенами возбудителей: туберкулином, бруцеллином, тулярином и др. Возможно гистологическое изучение кожи.

4.5. ИММУНОПРОФИЛАКТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Иммунобиологические лекарственные препараты (ИБЛП) включают достаточно широкий круг препаратов, используемых для профилактики, диагностики и лечения инфекционных, аллергических, аутоиммунных, опухолевых заболеваний. К ним относятся вакцины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены, пробиотики, бактериофаги, цитокины природного происхождения, диагностические препараты.

Современные достижения биотехнологии позволили получить лекарственные препараты нового поколения на основе рекомбинантных белков, которые находят всё более широкое применение в клинической практике. Их разработка является одним из перспективных направлений современной фармацевтики в области генной инженерии. К указанной группе препаратов относятся препараты системы цитокинов, включая растворимые рецепторы и их антагонисты; моноклональные антитела (МкАТ) и препараты модифицированных МкАТ; факторы свёртывания крови, эритропоэтины, препараты на основе белков слияния; вакцины на основе рекомбинантных белков (HBsAg, белки вируса папилломы и др.)

Иммунотерапия – введение с лечебными целями иммунобиологических препаратов, содержащих антитела (специфические сыворотки и иммуноглобулины) или антигены (лечебные вакцины).

Иммунопрофилактика – введение иммунобиологических препаратов, содержащих либо антигены, либо антитела с целью профилактики инфекционных заболеваний.

По составу все иммунобиологические препараты можно подразделить на две группы:

Препараты, содержащие антигены:

- вакцины;

- диагностикумы, эритроцитарные диагностикумы;
- пробиотики, симбиотики, синбиотики;
- аллергены;
- бактериофаги.

Препараты, содержащие антитела:

- лечебно-профилактические сыворотки;
- лечебно-профилактические иммуноглобулины;
- диагностические сыворотки.

Вакцины

Вакцины относятся к наиболее распространенным и широко применяемым иммунобиологическим препаратам. Раздел иммунопрофилактики, занимающийся разработкой и использованием вакцин, называют вакцинологией. Применение вакцин – наиболее эффективный и экономически выгодный способ борьбы со многими инфекционными болезнями. Вакцинация основана на способности организма формировать приобретенный иммунитет и иммунологическую память в отношении возбудителя. С помощью вакцинации ликвидирована на Земле натуральная оспа, практически ликвидированы массовые заболевания полиомиелитом, дифтерией, резко снижена эпидемическая опасность кори, коклюша, столбняка, бруцеллеза, туляремии, сибирской язвы, клещевого энцефалита, бешенства и других инфекций.

Первая вакцина получила своё название по болезни крупного рогатого скота – *vaccinia* (коровья оспа). Два столетия назад ее применил английский врач Дженнер для защиты от натуральной оспы. Это стало первой научно продуманной попыткой предотвратить инфекционное заболевание человека. Лишь столетие спустя Пастером был сформулирован фундаментальный принцип вакцинации: для создания напряженного иммунитета против высоковирулентных микроорганизмов можно применять препараты из тех же микроорганизмов, но с ослабленной вирулентностью.

Вакцины разделяют на живые и инактивированные (убитые, неживые), молекулярные (анатоксины), генно-инженерные, химические; по наличию полного или неполного набора антигенов (АГ) – на корпускулярные и компонентные; а по способности вырабатывать невосприимчивость к одному или нескольким возбудителям – на моно- и ассоциированные.

Живые вакцины – препараты, приготовленные из аттенуированных (ослабленных) либо генетически измененных, а также близкородственных в антигенном отношении микроорганизмов (дивергентные вакцины), способных индуцировать невосприимчивость к патогенному виду. Основное достоинство живых вакцин – полностью сохраненный набор АГ возбудителя, что обеспечивает развитие длительного иммунитета даже после однократной иммунизации. В редких случаях при вакцинации живыми вакцинами могут воз-

никать вакцинно-ассоциированные заболевания, связанные с генетической нестабильностью аттенуированных штаммов, наличием у вакцинированных иммуно-дефицитных состояний.

Живые дивергентные вакцины созданы на основе дивергентных штаммов. Такие штаммы микроорганизмов находятся в близком антигенном родстве с возбудителями инфекционных заболеваний. Антигены таких микроорганизмов формируют иммунный ответ, перекрестно направленный на антигены возбудителя. Наиболее известны и длительно применяются дивергентная вакцина против натуральной оспы, полученная впервые Дженнером из вируса коревой оспы и вакцина БЦЖ для профилактики туберкулеза у людей, полученная из аттенуированного штамма микобактерий бычьего туберкулеза.

Живые вакцины при введении в организм, вызывают так называемый вакцинальный процесс. Этот процесс заключается в размножении в организме вакцинного штамма и воздействии его на иммунокомпетентные клетки. Результатом этого является формирование специфического иммунитета к возбудителю данной инфекционной болезни. Иммунитет, развивающийся после прививок большинством живых вакцин, сохраняется значительно дольше, чем после использования инаktivированных. Так, после однократного введения коревой, краснушной и паротитной вакцин, продолжительность иммунитета достигает 20 лет, вакцины желтой лихорадки – 10, туляреминой – 5 лет.

Живые вакцины получают путем культивирования вакцинного штамма в производственных условиях на питательных средах и субстратах, вирусные вакцинные штаммы – на куриных эмбрионах или в культурах клеток. Полученную таким образом чистую культуру вакцинного штамма дозируют по числу бактерий или вирусов и подвергают лиофильной сушке вместе со стабилизатором для предотвращения инаktivации в процессе сушки и хранения вакцины. Исключением является живая полиомиелитная вакцина, выпускаемая в жидком виде.

Живые вакцины контролируют по основным показателям: содержанию (концентрации) живых бактерий или вирусов вакцинного штамма, остаточной влажности, безвредности, аллергенности, иммуногенности и др.

Убитые корпускулярные вакцины (инаktivированные) препараты, изготовленные из инаktivированных вирулентных штаммов вирусов и бактерий. Инаktivация осуществляется химическими (формалин, фенол, ацетон) и физическими способами (температура, УФ-лучи). Инаktivированные вакцины обычно проявляют меньшую (по сравнению с живыми вакцинами) иммуногенность, что диктует необходимость многократной иммунизации. В группу инаktivированных вакцин входят корпускулярные и компонентные вакцины.

Корпускулярные (цельновирсионные, цельноклеточные) вакцины получают из цельных вирионов или бактерий. Вакцины содержат полный набор АГ и структурные компоненты, оставшиеся после инаktivации и очистки. Спектр

возбудителей, используемых для приготовления инактивированных вакцин, разнообразен. Наибольшее распространение получили бактериальные (например, чумная) и вирусные вакцины (например, для профилактики гриппа, герпеса, гепатита А, клещевого энцефалита, бешенства).

Убитые вакцины безопаснее живых, но менее эффективны и требуют повторного введения (ревакцинаций).

Убитые вакцины могут быть профилактическими (их большинство) и лечебными (гонококковая, бруцеллезная, стафилококковая). Их применяют для стимуляции специфического иммунитета при хронических, вялотекущих формах инфекционного процесса.

Субъединичные (субклеточные, субвирионные, химические) вакцины имеют низкую реактогенность, высокую степень специфической безопасности и достаточную иммуногенную активность. В настоящее время разработаны компонентные вакцины против пневмококков (на основе полисахаридов, капсул), брюшного тифа (О, Н и Vi- Ar), сибирской язвы (полисахариды и полипептиды капсул), гриппа (вирусные нейраминидазы и гемагглютинин). Для придания более высокой иммуногенности компонентные вакцины нередко сочетают с адъювантами (например, сорбируют на гидроксиде алюминия).

В субъединичных вакцинах достигается максимальная очистка АГ от токсичных примесей. Вакцины содержат только поверхностные АГ (в случае противогриппозных вакцин – гемагглютинин и нейраминидазу) и не содержат внутренних вирусных белков. Такие вакцины дают самое низкое число побочных реакций.

Использование очищенных антигенов позволяет повышать иммуногенность препаратов и снижать их недостатки: сенсibilизацию макроорганизма, большую нагрузку на иммунную систему, реактогенность и токсичность, обусловленную наличием липидов и других химических соединений.

Для получения субъединичных вакцин из бактерий или вирусов, после их культивирования в производственных условиях, извлекают протективные антигены, являющиеся белковыми, липополисахаридно-белковыми комплексами. Выделение из бактерий или вирусов протективных антигенных комплексов осуществляют различными физико-химическими методами: осаждением спиртами, высаливанием нейтральными солями, хроматографическими способами, ультрацентрифугированием. В связи с этим субклеточные вакцины раньше называли химическими вакцинами.

Убитые вакцины контролируют по основным показателям: остаточной вирулентности, содержанию бактерий или вирусов вакцинного штамма, остаточной влажности, стерильности, безвредности, аллергенности, иммуногенности и др.

Анатоксины представляют собой обезвреженные бактериальные экзотоксины. Токсин обезвреживают формальдегидом (0,4%) при 37–40°C в течение

ние 4 нед. При таком режиме полностью утрачивается токсичность, но сохраняются антигенность и иммуногенность токсинов. Анатоксины получают путем культивирования токсигенного штамма соответствующего микроорганизма в производственных условиях на жидких питательных средах, обеспечивающих его достаточное накопление. При этом микроорганизм выделяет в среду экзотоксин. Полученную чистую культуру отфильтровывают через бактериальные фильтры и отделяют токсин, который обезвреживают. Обезвреженный токсин, который называют анатоксином (или токсидом), подвергают очистке от балластных веществ питательной среды, компонентов микробных клеток и концентрации. К очищенному анатоксину для усиления его иммуногенных свойств добавляют адъювант.

Анатоксины выпускают в форме моно (дифтерийный, столбнячный, стафилококковый) и ассоциированных (дифтерийно- столбнячный, ботулинический трианатоксин) препаратов.

Для усиления иммунного ответа используют особые вещества – *адъюванты*. **Адъюванты** (*adjuvant* – помощник) – это неспецифические иммуностимуляторы неорганической и органической природы, обладающих свойством повышать иммуногенность при добавлении их к антигенам и вакцинам. Необходимость применения адъювантов связана и с высокой степенью очистки вакцинного антигена, поскольку это уменьшает его иммуногенность. Адъювантами могут быть: минеральные соединения; микробные структуры (белки, нуклеиновые кислоты, липополисахариды); синтетические вещества (полинуклеотиды, гликопептиды, полиоксидоний); цитокины и пептиды. В качестве *адъювантов* для вакцин массового применения во всем мире разрешены лишь соли алюминия и масляный адъювант. Соединения алюминия сорбируют антиген, длительно удерживают его вблизи от места инъекции, что обеспечивает лучшее взаимодействие с представляющими антиген клетками. Минеральные адъюванты стимулируют, в основном, Th2 иммунный ответ.

В отечественных вакцинах Гриппол (против гриппа) и Геп-А-ин-ВАК-ПОЛ (против гепатита А) используется полиоксидоний, который позволяет индуцировать Т-независимый ответ, что обеспечивает высокий уровень ответа на вакцинацию, даже у лиц с генетически предопределенным низким иммунным ответом.

Механизм действия адъювантов сводится к:

- а) созданию «депо» антигена в месте введения вакцин, в результате чего пролонгируется действие антигена, и он длительно действует на иммунную систему;
- б) воспалительной реакции, активирующей иммунокомпетентные клетки;
- в) активации процесса захвата антигена и его переработки фагоцитирующими клетками.

Адъюванты повышают иммуногенность вакцин в десятки раз и более,

особенно молекулярных белковых антигенов, например, анатоксинов, которые без адъювантов быстро резорбируются и расщепляются ферментами организма, в связи с чем, обладают кратковременным действием.

Рекомбинантные (генно-инженерные) вакцины созданы на основе рекомбинантных штаммов бактерий и вирусов. Потенциальным преимуществом этих вакцин является использование только тех антигенов, которые необходимы для формирования иммунитета. К достоинствам генно-инженерных вакцин следует также отнести относительную дешевизну, безопасную технологию приготовления. В ряде случаев, когда возбудитель инфекции не может быть культивирован в необходимых количествах, генно-инженерный подход является единственно приемлемым.

Общий принцип создания генно-инженерных вакцин состоит в том, что ген или гены, кодирующие протективные антигены возбудителя «встраиваются» в геном вирусов, бактерий или эукариотов таким образом, чтобы не нарушалась их биологическая активность. При этом наряду с антигенами хозяина нарабатывается и необходимый для получения вакцины протективный антиген.

Получены рекомбинантные штаммы кишечной палочки, аденовируса, дрожжевых клеток и других микробов со встроенными в их геном генами антигенов разнообразных возбудителей.

В настоящее время разрабатываются два вида генно-инженерных вакцин – субъединичные вакцины и живые генно-инженерные вакцины. Эффективность субъединичных вакцин объясняется тем, что иммунный ответ организма на ряд вирусных инфекций часто обусловлен одним или несколькими поверхностными протективными антигенами вируса. Примером такой вакцины служит вакцина против гепатита В, состоящая из чистого HBs-антигена, полученного генно-инженерным путем (в геном дрожжевой клетки был встроен ген HBs-антигена и клетка получила способность его продуцировать).

В качестве основы живой генно-инженерной вакцины используют хорошо изученный аттенуированный ДНК-содержащий вирус, в геном которого встраивается ген, кодирующий протективный антиген другого вируса. При этом важно, чтобы инфекционность исходного вируса-вектора не нарушалась и полученный рекомбинант обладал способностью индуцировать в организме привитого наряду с собственными антигенами, антиген, кодируемый искусственно встроенным геном. Вирус-вектор находится в организме привитых, а вакцинный процесс обеспечивает прочный иммунитет по отношению к вирусу, против которого создается рекомбинантная вакцина. Такие вакцины называются векторными. Примером является вакцина против коронавируса (Спутник V).

Ассоциированные вакцины. Организм способен формировать полноценный иммунитет при одновременном введении нескольких антигенов. Это по-

служило основанием для создания ассоциированных вакцин. Принципы конструирования ассоциированных вакцин сводятся к определению совместимости разнородных антигенов в едином препарате вакцины, соотношения дозировок антигенов, входящих в препарат, их влияния на процессы формирования иммунитета и реактогенность вакцины.

Ассоциированные вакцины широко применяют в практике для иммунизации против коклюша, дифтерии и столбняка (АКДС – адсорбированная на гидроокиси алюминия убитая корпускулярная коклюшная вакцина в ассоциации с дифтерийным и столбнячным анатоксином), против полиомиелита (вакцина, составленная из двух штаммов вируса I и III типов). За рубежом выпускают также ассоциированные вакцины против коклюша, дифтерии, столбняка и полиомиелита (тетракок); против кори, паротита и краснухи (MMR); АКДС-вакцину с полисахаридной вакциной *Haemophilus influenzae B*, вакцину против гепатитов А и В, вакцину против гепатита В и *Haemophilus influenzae B* и др.

Синтетические пептидные вакцины – препараты, содержащие синтезированные или выделенные нуклеиновые кислоты или полипептидные последовательности, образующие АГ-детерминанты, распознаваемые нейтрализующими антителами. Непременные компоненты таких вакцин – сам АГ, высокомолекулярный носитель и адъювант. Подобные препараты наиболее безопасны в плане возможных поствакцинальных осложнений. Введение синтетических вакцин в комбинации с адъювантами и иммуномодуляторами перспективно у лиц с нарушениями иммунного статуса.

Особые перспективы имеет использование нуклеиновых кислот для иммунопрофилактики инфекций, вызываемых внутриклеточными паразитами. В эксперименте показано, что иммунизация организма РНК и ДНК многих вирусов, малярийного плазмодия или возбудителя туберкулеза приводит к развитию стойкой невосприимчивости к заражению. В настоящее время для профилактики коронавирусной инфекции такая вакцина получена и применяется – ЭпиВакКорона.

ДНК-вакцины получают из плазмидных ДНК, кодирующих протективные антигены возбудителей инфекционных болезней. Такая ДНК, введенная животному, проникает в ядро клетки, длительное время существует вне хромосом без репликации, транскрибируется и экспрессирует соответствующие антигены, вызывающие в организме привитого формирование иммунитета. ДНК-вакцины могут быть получены в большом количестве, они стабильны и лишены инфекционных агентов. Перспективным направлением является разработка многокомпонентных вакцин, содержащих две или несколько плазмидных форм, которые кодируют разные антигены.

На животных изучены вакцины из ДНК вирусов ВИЧ, гриппа, бешенства, лимфоцитарного хориоменингита, гепатитов В и С, простого герпеса, папилломы, а также возбудителей малярии, лейшманиоза, туберкулеза.

Конъюгированные вакцины – препараты, представляющие собой комплексы бактериальных полисахаридов и токсинов. Подобные комбинации значительно усиливают иммуногенность компонентов вакцин, особенно полисахаридной фракции (например, сочетание АГ *Haemophilus influenzae* и дифтерийного анатоксина). В этой ситуации последний играет роль носителя, и в ответ на введение АГ полисахаридов формируется пул длительно циркулирующих клеток памяти.

Пробиотики – ИБЛП, содержащие живые микроорганизмы, представителей микробиоты. Эти микроорганизмы и продукты их метаболизма, входящие в состав пробиотиков, оказывают положительное влияние на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма человека, благодаря стабилизации и оптимизации функций его микробиоты. Пробиотики по своему составу подразделяются на: монокомпонентные – пробиотики, полученные на основе одного штамма; поликомпонентные – пробиотики, в состав которых входят микроорганизмы нескольких штаммов, принадлежащих к одному или нескольким видам, или разным родам, дополняющие или потенцирующие друг друга по ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам. Сорбированные – пробиотики, полученные на основе одного или нескольких штаммов микроорганизмов, сорбированных на частицах активированного угля, кремния диоксида коллоидного и других сорбентах. Комбинированные – пробиотики, в состав которых помимо одного или нескольких видов микроорганизмов входят активные компоненты иной природы (например, лизоцим, инулин, активные вещества лекарственных растений, витамины, микроэлементы, гормоны и др.), оказывающие терапевтическое воздействие на организм человека.

Лечебно-профилактические бактериофаги – ИБЛП, содержащие комплексы вирулентных (строго литических) бактериальных вирусов. Благодаря строгой специфичности действия лечебно-профилактические бактериофаги, в отличие от антибиотиков, не угнетают нормальную микрофлору, не подавляют иммунную защиту, а также не обладают токсическим действием и не вызывают аллергизацию. На литическую активность бактериофагов не влияет наличие резистентности бактерий к антибиотикам. Специфическая направленность бактериофагов отражена в их названии: монопрепараты содержат вирулентные фаги бактерий одного рода или вида; комбинированные бактериофаги состоят из нескольких монопрепаратов. Лечебно-профилактические бактериофаги используют для перорального, наружного, местного, ректального применения, интраназального и конъюнктивального введения, введения в дренированные полости. Их выпускают в различных лекарственных формах – в жидкой, в виде таблеток, суппозиториях, линиментов, мазей.

Иммуномодуляторы – препараты химической или биологической природы, способные модулировать иммунные реакции в результате воздействия

на активность иммунокомпетентных клеток, регуляторные механизмы, процесс образования иммунных факторов или другие иммунные процессы. В зависимости от оказываемого эффекта иммуномодуляторы делят на три группы: иммуностимуляторы, иммунодепрессанты и средства заместительной терапии. По механизму действия иммуномодуляторы делят на вещества, влияющие на Т-систему иммунитета, В-систему иммунитета и систему мононуклеарных фагоцитов.

Иммуномодуляторы биологической природы относятся к ИБЛП. По происхождению они подразделяются на гетерологичные и гомологичные. Гетерологичные иммуномодуляторы биологического происхождения подразделяются на бактериальные (вещества, имеющие в составе лизаты, рибосомы бактерий), растительные (сок эхинацеи пурпурной, полисахариды растений), нуклеиновые кислоты (пекарские дрожжи, молоки осетровых рыб и др.), тимического происхождения (пептиды из тимуса крупного рогатого скота) и костномозгового происхождения (пептидные медиаторы, продуцируемые клетками костного мозга свиней и др.).

К гомологичным иммуномодуляторам относятся вырабатываемые в организме так называемые эндогенные иммуномодуляторы (цитокины естественные и рекомбинантные).

Цитокины – вещества белковой природы, которые образуются в клетках, преимущественно иммунокомпетентных, и являются средством клеточного взаимодействия. Описано несколько десятков цитокинов, составляющих самостоятельную систему регуляции иммунной системы. Для производственного получения природных цитокинов используют метод естественного активирования клеток-продуцентов с последующим фракционированием материала или метод генной инженерии (рекомбинантные цитокины). Рекомбинантные цитокины отличаются от природных сниженной нежелательной активностью при сохранении специфической активности.

Основным назначением препаратов цитокинов является коррекция иммунодефицитных состояний, сопровождающих развитие инфекционных и онкологических заболеваний, профилактика осложнений при радио- и химиотерапии онкологических больных. Для лечения тяжелых или хронических воспалительных заболеваний применяют ингибиторы цитокиновой активности. Перспективным направлением является использование препаратов цитокинов в качестве иммуноадьювантов при вакцинации.

Растительные вакцины – вакцины, разработанные на основе трансгенных растений. Структурный ген, кодирующий вирусный или бактериальный антиген при помощи растительного вектора, встраивается в ядерную хромосому растительной клетки. Полученное таким путем трансгенное растение содержит инфекционный антиген и при использовании в пищу происходит естественная оральная иммунизация.

Производство и контроль вакцин. Вакцины производятся на специализированных предприятиях. Технология и условия производства, качество вакцин определяются производственными регламентами, техническими условиями, наставлениями и инструкциями, утвержденными официальными государственными органами.

Способность вакцин вызывать состояние невосприимчивости проверяют биологическим (заражают патогенными микробами предварительно иммунизированных лабораторных животных) и эпидемиологическим (отслеживая заболеваемость среди иммунизированных лиц) способами.

Общие требования к вакцинам касаются, прежде всего, безопасности и специфической активности вакцин. Для обеспечения безопасности вакцин должны быть изучены свойства вакцинного штамма, клеточного субстрата, свойства полуфабриката и конечного продукта (стерильность, токсичность, пирогенность, химические и биологические примеси, добавки, контаминация и пр.).

Специфическая активность вакцин включает такие показатели, как количество антигена в единице объема, количество живых или убитых микробных клеток, составляющих основу вакцины, уровень специфических антител в сыворотке крови животных, иммунизированных данной вакциной, степень защищенности таких животных на введение разрешающей дозы инфекционного агента и др.

Применение вакцин. Вакцинацию проводят однократным или многократным введением вакцины. Живые вакцины, как правило, применяют однократно, инактивированные – многократно. Различают первичную иммунизацию и ревакцинацию (повторное введение вакцины). При первичной вакцинации создаются иммунитет, и повышенная способность реагировать на антиген (иммунореактивность, иммунологическая память), в результате чего при повторном введении вакцины организм более активно и быстро отвечает на антиген. Ревакцинации обеспечивают длительное поддержание иммунитета на защитном уровне.

Вакцинопрофилактика инфекционных болезней проводится в рамках плановых прививок и прививок по эпидемическим показаниям. Плановые прививки можно подразделить на две группы.

К первой группе относятся вакцинации, проводимые во всех регионах страны в рамках календаря прививок. В календарь профилактических прививок России включена вакцинация против гепатита В, туберкулеза, пневмококковой инфекции, полиомиелита, коклюша, дифтерии, столбняка, кори, паротита и краснухи. В календаре указаны схемы и сроки прививок с момента рождения и в определенные периоды жизни каждого человека.

Ко второй группе относятся прививки, проводимые населению, проживающему на территориях, эндемичных по природно-очаговым и зоонозным ин-

фекциям, группам с высоким риском заражения (профессиональным, социальным и др.), а также лицам, представляющим опасность для окружающих в случае заболевания. К этой группе плановых прививок относится вакцинация против гриппа, клещевого и японского энцефалитов, гепатита В (взрослые), гепатита А, бешенства, желтой лихорадки, бруцеллеза, туляремии, сибирской язвы, чумы, холеры, лептоспироза, брюшного тифа, менингококковой инфекции, риккетсиозов.

Прививки по эпидемическим (экстренным) показаниям проводят в случае возникновения неблагоприятной эпидемиологической ситуации, а также в случае контакта восприимчивого (непривитого) лица с источником инфекции. К первой группе могут быть отнесены прививки против гриппа, менингококковой инфекции, особо опасных инфекций. Ко второй – прививки в очагах, а также экстренная профилактика столбняка, антирабические прививки.

Противопоказания к вакцинации. Противопоказания к вакцинации предусмотрены инструкциями и обязательно учитываются при проведении вакцинации. К ним, прежде всего, относятся острые заболевания сердечно-сосудистой системы, почек, печени, дыхательной и нервной систем, некоторые хронические болезни, иммунодефициты, выраженные явления аллергии и др. Перечень противопоказаний изложен в инструкциях, прилагаемых к каждой вакцине.

Прививочные препараты для пассивной иммунизации

Для лечения и экстренной профилактики инфекционных заболеваний используются иммунные сыворотки и иммуноглобулины (извлекаемые из сывороток специфические активные фракции) – препараты, которые содержат антитела и используются для создания пассивного иммунитета в наиболее короткие сроки. Существует два способа получения специфических сывороток:

- первый – гипериммунизация животных (гетерологичные сывороточные препараты);
- второй – вакцинация людей-доноров (гомологичные сывороточные препараты).

Сывороточные препараты получают путем специальной обработки крови иммунизированных животных, а также сыворотки людей, вакцинированных соответствующим антигеном либо перенесших определенное инфекционное заболевание.

Гетерологичные сывороточные препараты. С целью получения лечебно-профилактических гетерологичных сывороточных препаратов в производственных условиях используют, в основном, крупных животных – лошадей, волов, быков, коров. Наиболее часто используют лошадей как вид животных, обладающих высокой иммунологической реактивностью, от которых в

сравнительно небольшой срок можно получить сыворотку, содержащую специфические антитела в достаточно высоком титре. Кроме того, они удобны в отношении технических манипуляций и ухода. Схемы гипериммунизации обычно индивидуальны для каждой лошади-производителя. В период максимального нарастания титра специфических антител проводят забор крови. Полученная от лошадей-производителей кровь освобождается от форменных элементов и дефибринируется раствором хлористого кальция. Полученную сыворотку разливают в бутылки и консервируют.

Для уменьшения побочных реакций, а также повышения эффективности сывороточных препаратов применяется их очистка и концентрация, т.е. выделение иммунологически активных фракций сывороточных белков.

Гомологичные сывороточные препараты. Иммуноглобулины, получаемые из крови людей (доноров-добровольцев), специально вакцинированных против того или иного возбудителя (его токсинов). Выгодно отличаются от сывороточных препаратов животного происхождения тем, что, не являясь для организма человека гетерологичными, практически не реактогенны. При введении таких препаратов пациенту, антитела циркулируют в организме более длительное время, чем иммуноглобулины гетерологичных препаратов, обеспечивая пассивный иммунитет (лечебный эффект) в течение 4–5 недель.

В настоящее время применяют донорские сыворотки, очищенные концентрированные с использованием спиртового метода осаждения (противостолбнячная, противоботулиническая), и донорские иммуноглобулины (антистафилококковый, противогриппозный, против клещевого энцефалита), а также иммуноглобулин человеческий нормальный, используемый для профилактики и лечения, паротитов, кори, полиомиелита и др. инфекций.

Применение сывороточных препаратов. Сывороточные препараты нашли широкое применение для лечения и профилактики многих инфекционных заболеваний, особенно вызываемых токсинами бактерий и вирусами. Основная их ценность заключается в том, что индуцируемый ими пассивный иммунитет (лечебный эффект) наступает почти сразу же после введения. Своевременное применение препарата может предотвратить развитие болезни, заболевание имеет более легкое течение, уменьшается летальность. Гомологичные иммуноглобулины и очищенные сыворотки практически ареактогенны. Однако, они содержат смесь молекул IgG, принадлежащих к различным аллотипическим вариантам и, поэтому, в результате введения препарата возможны явления изоиммунизации и образования антител – антигаммаглобулинов, а в случаях применения обогащенных IgM и IgA препаратов – появление изоантител и к ним. В связи с этим весьма редко, но все же могут возникать реакции анафилактического типа при повторных введениях гомологичных сывороточных препаратов.

Реакции на введение гетерогенных сывороток. Анафилактические ре-

акции. При введении чужеродной сыворотки формируется сенсibilизация организма к гетерогенному белку, и повторная инъекция этой же сыворотки может сопровождаться анафилактической реакцией, вплоть до шокового состояния больного. Введение сенсibilизирующей дозы антигена (чужеродного белка) индуцирует образование специфических антител, относящихся к классу IgE и IgG, которые фиксируются на мембране тканевых базофилов (тучных клеток). Попадая повторно в организм, специфический антиген вступает в иммунную реакцию с антителами, фиксированными на клетках-мишенях, следствием чего является активация протеаз клеток, дегрануляция клеток-мишеней и высвобождение биологически активных веществ (гистамина, МРС-А, серотонина и др.), вызывающих сокращение гладкомышечной мускулатуры, увеличение проницаемости сосудов, гиперсекрецию и др.; состояние больного осложняется бронхоспазмом, кожными высыпаниями, отеком слизистой оболочки гортани и полости носа, сосудистым коллапсом. Нарастание указанных явлений может привести к анафилактическому шоку.

С целью выявления состояния сенсibilизации, перед пассивной иммунизацией ставят кожную пробу с гетерологичной сывороткой. При положительных пробах на внутрикожное и подкожное введение препарата его применяют с лечебной целью только по жизненным показаниям под наркозом, имея средства противошоковой защиты.

Для предупреждения анафилактических осложнений создается состояние десенсibilизации путем введения в организм небольших разрешающих доз специфического антигена (например, лошадиного белка). А.М. Безредка предложено вводить сначала небольшое количество сыворотки (0,5–1,0 мл) подкожно или несколько более мелких, но постепенно возрастающих доз внутривенно с интервалом 15–30 мин (дробное введение), затем большая, оставшаяся доза сыворотки.

Сывороточная болезнь развивается при введении чужеродной сыворотки в больших дозах через 7–12 дней даже при первичном введении препарата. В основе ее формирования лежит образование иммунных комплексов, образованных антигенами с преципитирующими антителами. Эти комплексы оседают вокруг мелких кровеносных сосудов, повреждают их эндотелий, вызывая местные и общие тромбозы, нарушающие трофику тканей.

Продромальный период характеризуется гиперемией, увеличением лимфатических узлов, в разгаре болезни наблюдаются кожные высыпания, лихорадка, острая эмфизема легких, артралгии, отеки слизистых оболочек, альбуминурия, лейкопения, увеличение СОЭ. Симптомы заболевания отмечаются 6–7 суток. Перенесенное состояние не приводит к десенсibilизации организма.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ПЕРВОЕ СЛОВО В БИНАРНОМ НАИМЕНОВАНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ – ЭТО НАЗВАНИЕ
 - 1) вида
 - 2) рода
 - 3) семейства
 - 4) класса
2. ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ К КОККАМ ОТНОСЯТСЯ
 - 1) клостридии
 - 2) бациллы
 - 3) сарцины
 - 4) боррелии
3. К СПИРОХЕТАМ ОТНОСЯТСЯ
 - 1) вибрионы
 - 2) кампилобактерии
 - 3) сарцины
 - 4) боррелии
4. К ПОСТОЯННЫМ КОМПОНЕНТАМ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ ОТНОСИТСЯ
 - 1) цитоплазматическая мембрана
 - 2) капсула
 - 3) спора
 - 4) жгутики
5. В СОСТАВ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ВХОДЯТ
 - 1) белки и липополисахариды
 - 2) липополисахариды и фосфолипиды
 - 3) белки и фосфолипиды
 - 4) белки и тейхоевые кислоты
6. В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКЕ РИБОСОМЫ РАСПОЛАГАЮТСЯ В
 - 1) составе эндоплазматической сети
 - 2) аппарате Гольджи
 - 3) цитоплазме
 - 4) цитоплазматической мембране

7. ОСНОВНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ ПЕПТИДОГЛИКАНА ЯВЛЯЮТСЯ
- 1) N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота/N-ацетилглюкозамин и тейхоевые кислоты
 - 2) N-ацетилмурамовая кислота и тейхоевые кислоты
 - 3) N-ацетилглюкозамин и липополисахарид
8. ПО МЕТОДУ ГРАМА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ ОКРАШИВАЮТСЯ В
- 1) розовый цвет
 - 2) малиновый цвет
 - 3) рубиново-красный цвет
 - 4) фиолетовый цвет
9. ОКРАСКА ПО МЕТОДУ НЕЙССЕРА ПРИМЕНЯЕТСЯ С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ
- 1) включений
 - 2) спор
 - 3) кислотоустойчивых бактерий
 - 4) капсулы
10. КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫЕ БАКТЕРИИ ПО МЕТОДУ ЦИЛЯ-НИЛЬСОНА ОКРАШИВАЮТСЯ В ЦВЕТ
- 1) фиолетовый
 - 2) голубой
 - 3) красный
 - 4) синий
11. В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ СОДЕРЖАТСЯ В БОЛЬШОМ КОЛИЧЕСТВЕ
- 1) миколовые кислоты
 - 2) тейхоевые кислоты
 - 3) диаминопимелиновая кислота
 - 4) белки
12. ОСНОВНАЯ ФУНКЦИЯ СПОР БАКТЕРИЙ – ЭТО
- 1) размножение
 - 2) движение
 - 3) сохранение в неблагоприятных условиях
 - 4) защита от иммунных механизмов организма
13. ОСНОВНЫМ МЕТОДОМ ОКРАСКИ СПОР ЯВЛЯЕТСЯ ОКРАСКА ПО
- 1) Граму

- 2) Ожешко
 - 3) Бурри–Гинсу
 - 4) Нейссеру
14. ОСНОВНЫМ МЕТОДОМ ВЫЯВЛЕНИЯ КАПСУЛЫ БАКТЕРИЙ ЯВЛЯЕТСЯ ОКРАСКА ПО
- 1) Граму
 - 2) Ожешко
 - 3) Бурри–Гинсу
 - 4) Нейссеру
15. КЛЕТКИ АКТИНОМИЦЕТОВ НАЗЫВАЮТСЯ
- 1) спорангии
 - 2) гифы
 - 3) цисты
 - 4) конидии
16. В ПОРАЖЕННЫХ ТКАНЯХ АКТИНОМИЦЕТЫ ОБРАЗУЮТ
- 1) зерна
 - 2) гранулы
 - 3) друзы
 - 4) цисты
17. ОСНОВНЫМ СОКРАТИТЕЛЬНЫМ БЕЛКОМ БАКТЕРИЙ ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) актин
 - 2) миозин
 - 3) флагеллин
 - 4) альбумин
18. БАКТЕРИЯ С РАСПОЛОЖЕНИЕМ БОЛЬШОГО КОЛИЧЕСТВА ЖГУТИКОВ ПО ВСЕЙ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) монотрих
 - 2) лофотрих
 - 3) амфитрих
 - 4) перитрих
19. ОБЩЕЕ НАЗВАНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ РИККЕТСИЯМИ
- 1) микозы
 - 2) хламидиозы
 - 3) риккетсиозы
 - 4) актиномикозы

20. МИКРОКОЛОНИИ ХЛАМИДИЙ В ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ НАЗЫВАЮТСЯ

- 1) ретикулярные тельца
- 2) хламидийные включения
- 3) элементарные тельца
- 4) тельца Гварниери

21. ГРИБКИ, ОБРАЗУЮЩИЕ ГИФЫ, – ЭТО

- 1) бластомицеты
- 2) дрожжеподобные
- 3) спорообразующие
- 4) гифомицеты

22. ГРИБКИ МОГУТ РАЗМНОЖАТЬСЯ

- 1) половым путем
- 2) бесполом путем
- 3) половым и бесполом путями
- 4) бинарным делением

23. ТИП SARCOMASTIGOPHORAE ИМЕЕТ ДВА ВИДА ОРГАНЕЛЛ ДВИЖЕНИЯ

- 1) псевдоподии и жгутики
- 2) ложноножки и реснички
- 3) плавники и реснички
- 4) жгутики и реснички

24. ПРИ ОКРАСКЕ ПРОСТЕЙШИХ ПО РОМАНОВСКОМУ–ГИМЗЕ ЯДРО И ЖГУТИКИ ОКРАШИВАЮТСЯ В

- 1) голубой цвет
- 2) красный цвет
- 3) фиолетовый цвет
- 4) коричневый цвет

25. ОСНОВНЫМ ТРЕБОВАНИЕМ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫМ К ПИТАТЕЛЬНЫМ СРЕДАМ, ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) высокое содержание солей
- 2) стерильность
- 3) наличие ферментов
- 4) наличие липидов

26. ФОТОТРОФЫ – ЭТО МИКРООРГАНИЗМЫ, КОТОРЫЕ

- 1) в качестве источника энергии используют свет

- 2) получают энергию за счет окислительно-восстановительных реакций
 - 3) питаются инертным органическим материалом
 - 4) зависят от питательных веществ макроорганизма
27. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИМИ СРЕДАМИ НЕ ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) МПА
 - 2) среда Эндо
 - 3) среда Плоскирева
 - 4) среда Гисса
28. ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ
- 1) простые
 - 2) сложные
 - 3) элективные
 - 4) среды, содержащие глицерин
29. АУТОТРОФЫ – ЭТО БАКТЕРИИ, КОТОРЫЕ
- 1) используют органический углерод
 - 2) используют для построения клеток CO_2
 - 3) используют для питания свет
 - 4) используют в качестве доноров электронов органические соединения
30. ФАКТОРАМИ РОСТА НЕ ЯВЛЯЮТСЯ
- 1) аминокислоты
 - 2) пуриновые и пиримидиновые основания
 - 3) витамины
 - 4) липиды
31. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ В БАКТЕРИАЛЬНУЮ КЛЕТКУ НЕ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ
- 1) простой диффузией
 - 2) облегченной диффузией
 - 3) активным транспортом
 - 4) эндоцитозом
32. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АНАЭРОБОВ ПРОИСХОДИТ В УСЛОВИЯХ
- 1) повышенного давления
 - 2) повышенного содержания O_2

- 3) повышенного содержания CO_2
 - 4) пониженной температуры
33. ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБОВ ПРИМЕНЯЕТСЯ СРЕДА
- 1) Левенштейна–Йенсена
 - 2) Китта–Тороцци
 - 3) Эндо
 - 4) Клиглера
34. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРОВОДЯТ НА
- 1) среде Ру
 - 2) среде Гисса
 - 3) агаре Цейслера
 - 4) МПБ
35. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ
- 1) синтеза витаминов
 - 2) переноса наследственной информации
 - 3) подвижности микробной клетки
 - 4) идентификации бактерий
36. СРЕДИ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮТСЯ
- 1) облигатные аэробы
 - 2) облигатные анаэробы
 - 3) факультативные анаэробы
 - 4) микроаэрофиллы
37. ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ – ЭТО
- 1) углеводы
 - 2) белки
 - 3) липиды
 - 4) нуклеиновые кислоты
38. ТРАНСФЕРАЗЫ – ЭТО
- 1) ферменты-переносчики
 - 2) ферменты сшивки
 - 3) осуществляют внутримолекулярные перестройки в субстрате
 - 4) ферменты патогенности
39. ПОЛНОЕ УНИЧТОЖЕНИЕ ВСЕХ МИКРООРГАНИЗМОВ В МАТЕРИАЛЕ НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) дезинфекция

- 2) стерилизация
- 3) антисептика
- 4) асептика

40. ХОЛОДНАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ – ЭТО

- 1) тиндализация
- 2) автоклавирование
- 3) фильтрация
- 4) пастеризация

41. КОМПЛЕКС МЕР, НАПРАВЛЕННЫХ НА СНИЖЕНИЕ ЧИСЛА ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ОБЪЕКТАХ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) стерилизация
- 2) асептика
- 3) дезинфекция
- 4) химиотерапия

42. ПРИ БАКТЕРИЦИДНОМ ЭФФЕКТЕ АНТИБИОТИКА БАКТЕРИЯ

- 1) прекращает расти
- 2) прекращает делиться
- 3) погибает

43. АНТИБИОТИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПУТЕМ БИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА, НАЗЫВАЮТСЯ

- 1) природные
- 2) синтетические
- 3) полусинтетические

44. ОСНОВНОЙ МИШЕНЬЮ ДЛЯ АНТИБИОТИКОВ, УГНЕТАЮЩИХ СИНТЕЗ БЕЛКА, ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) клеточная стенка
- 2) нуклеоид
- 3) рибосомы
- 4) цитоплазматическая мембрана

45. МИКОПЛАЗМЫ УСТОЙЧИВЫ К ПЕНИЦИЛЛИНУ ИЗ-ЗА ОТСУТСТВИЯ У НИХ

- 1) цитоплазматической мембраны
- 2) клеточной стенки
- 3) жгутиков
- 4) включений

46. ПЛАЗМИДА, КОНТРОЛИРУЮЩАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИ-БИОТИКАМ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) R-фактор
- 2) S-фактор
- 3) J-фактор
- 4) A-фактор

47. ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ФОРМОЙ ВИРУСА НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) капсид
- 2) профаг
- 3) вирион
- 4) элементарное тельце

48. РАЗМЕР ВИРУСНОЙ ЧАСТИЦЫ ИЗМЕРЯЕТСЯ В

- 1) мкм
- 2) нм
- 3) кДа
- 4) см

49. ВИРУСЫ ОТНОСЯТСЯ К ЦАРСТВУ

- 1) Fungi
- 2) Animalia
- 3) Protista
- 4) Vira

50. БАКТЕРИОФАГИ – ЭТО

- 1) вирусы животных
- 2) вирусы человека
- 3) вирусы растений
- 4) вирусы бактерий

51. НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА ВИРУСА ВМЕСТЕ С КАПСИДОМ НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) суперкапсид
- 2) пеплос
- 3) нуклеокапсид
- 4) капсомер

52. ЛУЧШЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛЮ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ЯВЛЯЕТСЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ В

- 1) лабораторных животных
- 2) куриных эмбрионах

- 3) органах
 - 4) культуре клеток
53. СКОПЛЕНИЯ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ИЛИ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВИРУСОВ В ЦИТОПЛАЗМЕ ИЛИ ЯДРЕ КЛЕТОК, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ ПОД МИКРОСКОПОМ ПРИ СПЕЦИАЛЬНОМ ОКРАШИВАНИИ НАЗЫВАЮТСЯ
- 1) вирусные гранулы
 - 2) вирусные частицы
 - 3) вирусные включения
 - 4) вирусные бляшки
54. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УМЕРЕННОГО ФАГА С БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКОЙ НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) фаговая конверсия
 - 2) лизогения
 - 3) адсорбция
 - 4) бактериофагия
55. ОБЩЕЕ МИКРОБНОЕ ЧИСЛО ПОЧВЫ – ЭТО
- 1) общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы
 - 2) минимальное количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы
 - 3) общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 кг почвы
 - 4) количество жизнеспособных кишечных палочек в 1 г почвы
56. КОЛИ-ИНДЕКС ПОЧВЫ – ЭТО
- 1) общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы
 - 2) минимальное количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы
 - 3) общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 кг почвы
 - 4) количество жизнеспособных кишечных палочек в 1 г почвы
57. ДЛЯ ОЦЕНКИ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДЫ ИСПОЛЬЗУЮТ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
- 1) ОМЧ
 - 2) коли-титра
 - 3) перфрингенс-титра
 - 4) всех вышеперечисленных показателей

58. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ ВОЗДУХА ОСНОВАННЫЙ НА ОСЕДАНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЧАСТИЦ И КАПЕЛЬ ПОД ВЛИЯНИЕМ СИЛЫ ТЯЖЕСТИ НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) аспирационный
 - 2) седиментационный
 - 3) титрационный
 - 4) метод мембранных фильтров
59. МИКРОФЛОРА, МАКСИМАЛЬНО ПРИСПОСОБИВШАЯСЯ К СУЩЕСТВОВАНИЮ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА, НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) облигатная
 - 2) транзиторная
 - 3) факультативная
 - 4) нет верного ответа
60. НАРУШЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) биоценоз
 - 2) дисбиоз
 - 3) анабиоз
 - 4) энтеробиоз
61. ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ ВЫЗЫВАТЬ ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) инфекционное заболевание
 - 2) патогенность
 - 3) вирулентность
 - 4) экзоинфекция
62. ФОРМА ИНФЕКЦИИ, ПРИ КОТОРОЙ ВОЗБУДИТЕЛЬ НАХОДИТСЯ В МАКРООРГАНИЗМЕ И ВЫДЕЛЯЕТСЯ ПРИ ОТСУТСТВИИ КЛИНИЧЕСКИХ СИМПТОМОВ У ПАЦИЕНТА, НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) носительство
 - 2) микстинфекция
 - 3) сепсис
 - 4) локализованная
63. ФЕРМЕНТОМ ПАТОГЕННОСТИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИМ БАКТЕРИЯМ ИНВАЗИЮ В ПОДЛЕЖАЩИЕ ТКАНИ, ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) гиалуронидаза
 - 2) гемолизин
 - 3) интерферон
 - 4) ДНКаза

64. ЭКЗОТОКСИНЫ ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЯВЛЯЮТСЯ
- 1) белками
 - 2) углеводами
 - 3) липидами
 - 4) полисахаридами
65. К КЛЕТОЧНЫМ ФАКТОРАМ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ОТНОСИТСЯ
- 1) лизоцим
 - 2) комплемент
 - 3) фагоцитоз
 - 4) интерферон
66. К ГУМОРАЛЬНЫМ ФАКТОРАМ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ОТНОСИТСЯ
- 1) комплемент
 - 2) фагоцитоз
 - 3) воспалительная реакция
 - 4) НК
67. АКТИВАЦИЮ КОМПЛЕМЕНТА ПО КЛАССИЧЕСКОМУ ПУТИ ИНДУЦИРУЕТ
- 1) антиген
 - 2) антитело
 - 3) микроорганизм
 - 4) комплекс антиген-антитело
68. К СЕРОЛОГИЧЕСКИМ РЕАКЦИЯМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТКИ ОТНОСЯТСЯ
- 1) ИФА, РИФ
 - 2) РНГА, РЛА
 - 3) РИФ, РА
 - 4) РП
69. ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ МИКРОСКОП
- 1) световой
 - 2) темнопольный
 - 3) фазовоконтрастный
 - 4) люминесцентный

70. ПРИ ПОСТАНОВКЕ НЕПРЯМОЙ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ КРАСИТЕЛЕМ МЕТЯТ
- 1) антиген
 - 2) специфические антитела
 - 3) антиглобуллиновые антитела
 - 4) антигены и антитела
71. НА СТРИПАХ ПЕРЕД ПОСТАНОВКОЙ ИММУНОБЛОТИНГА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ НАХОДЯТСЯ
- 1) антигены возбудителя
 - 2) специфические антитела
 - 3) антиглобуллины
 - 4) иммуноглобулины класса М
72. ДИАГНОСТИЧЕСКУЮ ДОСТОВЕРНОСТЬ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА ПАРНЫХ СЫВОРОТОК ИМЕЕТ НАРАСТАНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ В
- 1) 2 раза
 - 2) 3 раза
 - 3) 4 раза
 - 4) 5 раз
73. НА ДНЕ ЛУНКИ ПЛАСТИКОВОЙ МИКРОПЛАНШЕТЫ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА СОРБИРУЮТ
- 1) антиген
 - 2) антитела
 - 3) иммуноглобулины класса А
 - 4) антиглобулины
74. К ЦЕНТРАЛЬНЫМ ОРГАНАМ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОТНОСИТСЯ
- 1) лимфатические узлы
 - 2) селезенка
 - 3) тимус
 - 4) миндалины
75. CD-МАРКЕРЫ ЯВЛЯЮТСЯ
- 1) цитотоксическими ферментами
 - 2) маркерные молекулы иммунных клеток
 - 3) маркерами опухолевых клеток
 - 4) маркерами антител

76. АНТИГЕНЫ HLA I КЛАССА НАХОДЯТСЯ НА ПОВЕРХНОСТИ
- 1) только эритроцитов
 - 2) всех клеток организма
 - 3) только антигенпредставляющих клеток
 - 4) всех клеток организма кроме эритроцитов
77. АНТИГЕНЫ HLA II КЛАССА НАХОДЯТСЯ НА ПОВЕРХНОСТИ
- 1) только эритроцитов
 - 2) всех клеток организма
 - 3) только антигенпредставляющих клеток
 - 4) всех клеток организма кроме эритроцитов
78. СИНТЕЗ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЯВЛЯЕТСЯ ФУНКЦИЕЙ
- 1) нейтрофилов
 - 2) В-лимфоцитов
 - 3) Т-лимфоцитов
 - 4) макрофагов
79. ОСНОВНОЙ КЛЕТКОЙ, РЕГУЛИРУЮЩЕЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ, ЯВЛЯЕТСЯ
- 1) В-лимфоцит
 - 2) Т хелпер
 - 3) Т киллер
 - 4) макрофаг
80. ОСНОВНЫМИ ЦИТОКИНАМИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ЯВЛЯЮТСЯ
- 1) С3а, С3b
 - 2) гистамин, серотонин
 - 3) ИЛ-4, ИЛ-6
 - 4) ИЛ-12, ИНФγ
81. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ Е ИГРАЮТ ОСНОВНУЮ РОЛЬ В
- 1) анафилактических аллергических реакциях
 - 2) цитотоксических аллергических реакциях
 - 3) иммунокомплексных аллергических реакциях
 - 4) Т-клеточных аллергических реакциях
82. АНАТОКСИНЫ ПРИМЕНЯЮТ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ
- 1) вирусных инфекций
 - 2) токсинемических (токсических, токсигенных) инфекций
 - 3) бактериальных инфекций
 - 4) смешанных инфекций

83. ШТАММ МИКРООРГАНИЗМА СО СНИЖЕННОЙ ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ, КОТОРЫЙ ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЖИВОЙ ВАКЦИНЫ, НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) аттенуированный
 - 2) девергентный
 - 3) рекомбинантный
 - 4) инаktivированный
84. ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРИОБРЕТЕННОГО ИСКУССТВЕННОГО АКТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ЧЕЛОВЕКА ИСПОЛЬЗУЮТСЯ
- 1) иммуноглобулины
 - 2) вакцины
 - 3) аллергены
 - 4) бактериофаги
85. АДЬЮВАНТЫ ВКЛЮЧАЮТ В СОСТАВ ВАКЦИНЫ ДЛЯ
- 1) увеличения срока годности
 - 2) повышения иммуногенности
 - 3) снижения реактогенности
 - 4) консервации
86. ИНФЕКЦИОННЫЕ АЛЛЕРГЕНЫ ПРИМЕНЯЮТСЯ ДЛЯ
- 1) лечения инфекционных заболеваний
 - 2) профилактики инфекционных заболеваний
 - 3) диагностики инфекционных заболеваний
 - 4) выявления атопических аллергий
87. ДИАГНОСТИКУМ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ
- 1) выявления антител в сыворотке крови
 - 2) обнаружения возбудителя
 - 3) идентификации возбудителя
 - 4) выявления нуклеиновых кислот возбудителя
88. ПРОБИОТИКИ ПРИМЕНЯЮТСЯ ДЛЯ
- 1) лечения вирусных инфекций
 - 2) коррекции дисбиоза
 - 3) диагностики инфекционных заболеваний
 - 4) профилактики инфекционных заболеваний
89. ПРИ ИСПЫТАНИИ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГРИБОВ ИСПОЛЬЗУЮТ
- 1) жидкую среду Сабуро

- 2) тиогликолевую среду
- 3) кровяной агар
- 4) сывороточный агар

90. ИСПЫТАНИЕ НА ПИРОГЕННОСТЬ ПРОВОДЯТ НА

- 1) мышах
- 2) крысах
- 3) кроликах
- 4) собаках

91. В ОСНОВЕ ЛАЛ-ТЕСТА ЛЕЖИТ

- 1) реакция клеток крови и индикаторов среды
- 2) реакция лизата амебоцитов и медиаторов воспаления
- 3) реакция клеток крови и эндотоксинов грамположительных бактерий
- 4) реакция лизата амебоцитов и эндотоксинов грамотрицательных бактерий

92. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЕ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ НАРУЖНО, – ЭТО

- 1) препараты должны быть стерильными
- 2) общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата
- 3) общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^8 КОЕ в 1 г (мл) препарата
- 4) общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^7 КОЕ в 1 г, общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г

93. ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ИСПОЛЬЗУЮТ ВОДУ

- 1) дистиллированную
- 2) водопроводную
- 3) очищенную
- 4) для инъекций

94. ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ВОДЫ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ ИСХОДНОЙ ЯВЛЯЕТСЯ ВОДА

- 1) дистиллированная
- 2) водопроводная
- 3) очищенная
- 4) для инъекций

95. ЭПИФИТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – ЭТО

- 1) микроорганизмы, находящиеся на корнях растений
- 2) микроорганизмы, вызывающие заболевания растений
- 3) микроорганизмы, населяющие надземные части растений
- 4) микроорганизмы, организма человека

96. РИЗОСФЕОРНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – ЭТО

- 1) микроорганизмы, находящиеся на корнях растений
- 2) микроорганизмы, вызывающие заболевания растений
- 3) микроорганизмы, населяющие надземные части растений
- 4) микроорганизмы, организма человека

97. ИНФЕКЦИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ РАСТЕНИЙ, ВЫЗВАННЫЕ ГРИБКАМИ, НАЗЫВАЮТСЯ

- 1) бактериозы
- 2) актиномикозы
- 3) микозы
- 4) микофитозы

98. ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ КОЛЬЦЕВЫЕ МОЛЕКУЛЫ ОДНОНИТЕВОЙ РНК, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ РАСТЕНИЙ НАЗЫВАЮТСЯ

- 1) прионы
- 2) вирусы
- 3) микоплазмы
- 4) виroidы

99. В 1 МЛ ВОДЫ ОЧИЩЕННОЙ ДОПУСКАЕТСЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НЕ БОЛЕЕ

- 1) 1 КОЕ
- 2) 10 КОЕ
- 3) 100 КОЕ
- 4) 1000 КОЕ

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

№ вопроса	Ответ	№ вопроса	Ответ	№ вопроса	Ответ
1.	2	34.	2	67.	4
2.	3	35.	4	68.	1
3.	4	36.	3	69.	4
4.	1	37.	2	70.	3
5.	3	38.	3	71.	1
6.	3	39.	2	72.	3
7.	1	40.	3	73.	1
8.	1	41.	3	74.	3
9.	1	42.	3	75.	2
10.	3	43.	1	76.	4
11.	1	44.	3	77.	3
12.	3	45.	2	78.	2
13.	2	46.	1	79.	2
14.	3	47.	3	80.	3
15.	2	48.	2	81.	1
16.	3	49.	4	82.	2
17.	3	50.	4	83.	1
18.	4	51.	3	84.	2
19.	3	52.	4	85.	2
20.	2	53.	3	86.	3
21.	4	54.	2	87.	1
22.	3	55.	1	88.	2
23.	1	56.	3	89.	1
24.	2	57.	2	90.	3
25.	2	58.	3	91.	4
26.	1	59.	2	92.	2
27.	1	60.	3	93.	4
28.	3	61.	3	94.	3
29.	1	62.	1	95.	1
30.	4	63.	1	96.	3
31.	4	64.	1	97.	4
32.	3	65.	3	98.	4
33.	2	66.	1	99.	3

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Красноженов, Е. П. Иммунобиологические препараты для профилактики, лечения и диагностики инфекционных заболеваний / Е. П. Красноженов. – Томск: б. и. – 2010. – 250 с.
2. Воробьев, А. А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / А. А. Воробьев. – М.: МИА, 2004. – 691 с.
3. Воробьев, А. А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / А. А. Воробьев [и др.]. – Издание 2-е изд., испр. и доп. – М.: Медицинское информационное агентство, 2012. – 704 с.
4. Карпова, М. Р. Методы микробиологического контроля лекарственных средств / М. Р. Карпова [и др.]. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2018. – 249 с.
5. Карпова, М. Р. Основы дезинфектологии / М. Р. Карпова [и др.]. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2018. – 181 с.
6. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология: учебное пособие для вузов / О. К. Поздеев. – Издание 4-е изд., стер. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 768 с.
7. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология: учебное пособие / О. К. Поздеев. – Издание 4-е изд., стер. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 768 с.
8. Красноженов, Е. П. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии / Е. П. Красноженов. – Издание 2-е изд., испр. и доп. – Томск: Издательство Томского университета, 2003. – 260 с.
9. ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/gost-r-52249-2009>
10. ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств Good Manufacturing Practice for medicinal products (GMP) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.consult-pharma.ru/index.php/ru/documents/proizvodstvo/710-gostr-52249-2009-part1>
11. ГОСТ ИСО 14644-1-2002 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ/data_normativ/40/40425/

Учебное издание

Мария Ростиславовна Карпова, Людмила Степановна Муштоватова,
Ольга Петровна Бочкарева, Ирина Феликсовна Зверева,
Инна Владимировна Луцаева, Елена Владиславовна Попова,
Матвей Сергеевич Коровин, Елена Викторовна Романова

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ. ОБЩИЙ КУРС

Под редакцией Л.С. Муштоватой

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Редактор Коломийцев А.Ю.
Технический редактор Коломийцева О.В.
Обложка Кривцова Л.Д.

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. +7 (3822) 901–101, доб. 1760
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 26.03.2023

Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. л. 19,9. Авт. л. 16,5.
Тираж 100 экз. Заказ № 11

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru