

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

О.П. Бочкарева, М.Р. Карпова, Л.С. Муштоватова, И.Ф. Зверева,
И.В. Луцаева, С.В. Кондратьева, А.В. Грицута, Д.С. Вайс

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ. ОБЩИЙ КУРС

Под редакцией О.П. Бочкаревой

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Томск
Издательство СибГМУ
2022

УДК 579.61(075.8)
ББК 52.64я73
М 422

Авторы:

О.П. Бочкарева, М.Р. Карпова, Л.С. Муштоватова, И.Ф. Зверева,
И.В. Луцаева, С.В. Кондратьева, А.В. Грицута, Д.С. Вайс

**Медицинская микробиология. Общий курс : учебное по-
собие / О.П. Бочкарева [и др.] ; под ред. О.П. Бочкаревой. –
М 422 Томск : Изд-во СибГМУ, 2022. – 257 с.**

В учебном пособии приведены современные данные, касающиеся вопросов общей микробиологии: морфологии, физиологии и генетики микроорганизмов, значимых в инфекционной патологии, инфекции и иммунитета, иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных заболеваний.

Данное пособие составлено в соответствии с Федеральными Государственными образовательными стандартами высшего образования (ФГОС ВО) для студентов, обучающихся по направлениям подготовки: 31.05.01 – Лечебное дело и 31.05.02 – Педиатрия.

**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 № 109 от 8.10.2020 г.).

© Макет издательства СибГМУ, 2022
© О.П. Бочкарева, М.Р. Карпова, Л.С. Муштоватова,
И.Ф. Зверева, И.В. Луцаева, С.В. Кондратьева,
А.В. Грицута, Д.С. Вайс, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Основы классификации микроорганизмов.....	5
Морфология микроорганизмов.....	13
Методы микроскопического исследования микроорганизмов.....	16
Структура бактериальной клетки.....	22
Отдельные группы прокариот	43
Микроорганизмы-эукариоты	53
Физиология микроорганизмов.....	68
Основы вирусологии	93
Действие физических и химических факторов на микроорганизмы	111
Антимикробная терапия инфекционных заболеваний.....	115
Санитарная микробиология	127
Нормальная микробиота организма человека	141
Генетика микроорганизмов	150
Инфекция. Инфекционный процесс	168
Иммунология инфекционного процесса.....	176
Серологические методы исследования.....	208
Аллергия	220
Иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний	227
Тестовые задания.....	240
Ответы на тестовые задания	254
Рекомендуемая литература	255

ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие «Медицинская микробиология. Общая 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. Особое внимание уделяется вопросам иммунитета. 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, вирусология» и соответствует темам лекций и практических занятий.

ОСНОВЫ КЛАССИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Термины и понятия

Систематика (греч. *systema* – целое, составленное из частей; *systematicos* – упорядоченный) – биологическая 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) – это процесс деления множества организмов на основании общих признаков на определенные таксономические группы.

Таксономия (греч. *taxis* – расположение по порядку, закон) – это 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 бинаминальную номенклатуру К. Линнея, согласно которой биологическому виду присваивают название, состоящее из двух слов: первое, определяет принадлежность организма к определенному роду, второе – виду. Как правило в родовое название микроорганизмов соответствует 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).

Названия бактериям присваивают в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий – МКНБ (International Code of No-

menclature of Bacteria, ICNB): *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*. При повторном упоминании видового названия бактерий допускается сокращение названия рода до первой буквы, после чего ставится точка и далее пишется второе слово: *B. cereus*, *S. aureus*, *S. enterica*.

Классификация микроорганизмов

В 1923 г. американское общество бактериологов издало первый международный «Определитель бактерий» под редакцией Д. Берджи (David Henricks Bergey). В дальнейшем был создан международный коллектив из лучших специалистов по той или иной группе микроорганизмов, который продолжал обобщать знания по структуре, свойствам микроорганизмов и их систематике.

В настоящее время сведения по систематике и идентификации бактерий публикуются отдельно: в виде *определителя* бактерий и *классификатора* бактерий. Определитель является справочным материалом для работников практических лабораторий и 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 – лишённые клеточной стенки (30 группа).
4. Mendosicutes – архебактерии, 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, протозология) и акариотов (вирусология). Термины «прокариоты», «эукариоты» и «акариоты» используются для обозначения соответствующих групп микроорганизмов по организации генома и также не используются для обозначения таксономических категорий. Прокариоты (греч. – «доядерные») и эукариоты (греч. – «владеющий ядром») отличаются ядерным аппаратом.

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

Архебактерии – особая группа микроорганизмов, отличающаяся от эубактерий и эукариот. Археи – обитатели многих экстремальных биотопов, встречаются также и в обычных биотопах. Среди архебактерий обнаружено большое разнообразие морфологических форм, окраска грамположительная и

грамотрицательная, одиночные и нитчатые формы, размеры варьируют от 0,1 мкм до 15 мкм в диаметре и до 100 мкм в линейных размерах. Некоторые метаболические пути не имеют аналогов среди эубактерий, например, уникальные ферментные системы встречаются у организмов-метаногенов. Археобактерии – обитатели соленых и высокотемпературных биотопов. Также большая численность Археев наблюдается в океанских глубинах, у побережья Антарктики они составляют более 34% прокариотической биомассы.

Современное издание «Классификатора Берджи» разделяет Археев на 2 царства: *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota*. Кренархеоты включают хорошо изученные группы экстремофилов и включает 1 класс *Thermoprotei* (4 отряда и 6 семейств). Эуриархеоты занимают многие экологические ниши и отличаются разнообразием метаболических путей. Тип разделен на 8 классов: *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Halobacteria*, *Thermoplasmata*, *Thermococci*, *Archaeoglobi*, *Methanopyri*, *Methanomicrobia* (9 отрядов, 16 семейств).

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, врастающих в агар колоний.

В домен «*Bacteria*» входит 26 филумов, те из них, которые имеют медицинское значение, включены в таблицу 1.

*Таксономическая схема бактерий
(представители, имеющие медицинское значение) *Domem Bacteria**

Phylum	Class	Ordo	Familia	Genus
Phylum BXII. Proteo- bacteria	Class I. Alpha- proteobac- teria	Ordo II. Rickettsiales	Familia I. Rickettsiaceae	Genus I. Rickettsia
				Genus II. Orientia
			Familia II. Ehrlichiaeae	Genus I. Ehrlichia
		Ordo VI. Rhizobiales	Familia II. Bartonellaceae	Genus I. Bartonella
			Familia III. Brucellaceae	Genus I. Brucella
	Class II. Betaproteo- bacteria	Ordo I. Burkholderiales	Familia I. Burkholderiaceae	Genus I. Burkholderia
			Familia IV. Alcaligenaceae	Genus III. Bordetella
		Ordo IV. Neisseriales	Familia I. Neisseriaceae	Genus I. Neisseria
		Ordo V. Nitrosomonadales	Familia II. Spirillaceae	Genus I. Spirillum
	Class III. Gamma- proteobac- teria	Ordo II. Xan- thomonadales	Familia I. Xanthomonadaceae	Genus I. Xanthomonas
				Genus VII. Stenotropho- monas
		Ordo IV. Thiotrichales	Familia III. Francisellaceae	Genus I. Francisella
		Ordo V. Legionellales	Familia I. Legionellaceae	Genus I. Legionella
			Familia II. Coxiellaceae	Genus I. Coxiella
		Ordo VIII. Pseudomonadales	Familia I. Pseudomonadaceae	Genus I. Pseudomonas
				Genus I. Moraxetta
				Familia II. Moraxellaceae
		Ordo X. Vibrionales	Familia I. Vibrionaceae	Genus I. Vibrio
Ordo XII. Enterobacteriales		Familia I. Entero- bacteriaceae	Genus I. Escherichia	
			Genus X. Citrobacter	
			Genus XI. Edwardsiella	

				Genus XII. Enterobacter
				Genus XIII. Erwinia
				Genus XV Hafnia
				Genus XVI. Klebsiella
				Genus XXI. Morganella
				Genus XXVIII. Proteus
				Genus XXIX. Providencia
				Genus XXXII. Salmonella
				Genus XXXIII. Serratia
				Genus XXXIV. Shigella
				Genus XL. Yersinia
		Ordo XIII. Pasteurellales	Familia I. Pasteurellaceae	Genus I. Pasteurella
				Genus III. Haemophilus
	Class V. Epsilon- proteobac- teria	Ordo I. Cam- pylobacterales	Familia I. Campylo- bacteraceae	Genus I. Campylobacter
			Familia II. Helicobacteraceae	Genus I. Helicobacter
Phylum BXIII. Firmi- cutes	Class I. Clos- tridia	Ordo I. Clostridiales	Familia I. Clostridiaceae	Genus I. Clostridium
				Genus VIII. Sarcina
			Familia III. Peptostreptococcace ae	Genus I. Peptostreptococcus
			Familia V. Peptococcaceae	Genus I. Peptococcus
			Familia VII. Acidaminococcaceae	Genus XIII. Veillonella
	Class II. Mollicutes	Ordo I. Mycoplasmatales	Familia I. Mycoplasmataceae	Genus I. Mycoplasma
				Genus IV. Ureaplasma
	Class III. Bacilli	Ordo I. Bacillales	Familia I. Bacillaceae	Genus I. Bacillus
			Familia IV. Listeriaceae	Genus I. Listeria
			Familia V. Staphylococcaceae	Genus I. Staphylococcus

		Ordo II. Lactobacillales	Familia IV. Enterococcaceae	Genus I. Enterococcus
			Familia VI. Streptococcaceae	Genus I. Streptococcus
Phylum BXIV. Actinobacteria	Class I. Actinobacteria Subclass V. Actinobacteridae	Ordo I. Actinomycetales	Familia I. Actinomycetaceae	Genus I. Actinomyces
		SubOrdo I. Actinomycineae		Genus IV. Mobiluncus
		SubOrdo VI. Micrococcineae	Familia I. Micrococcaceae	Genus I. Micrococcus
		SubOrdo VII. Corynebacterineae	Familia I. Corynebacteriaceae	Genus I. Corynebacterium
Familia IV. Mycobacteriaceae	Genus I. Mycobacterium			
			Familia V. Nocardiaceae	Genus I. Nocardia
		SubOrdo XI. Streptomycineae	Familia I. Streptomycetaceae	Genus I. Streptomyces
		Ordo II. Bifidobacteriales	Familia I. Bifidobacteriaceae	Genus I. Bifidobacterium
Genus III. Gardnerella				
Phylum BXVI Chlamydiae	Class I. Chlamydiae	Ordo I. Chlamydiales	Familia I. Chlamydiaceae	Genus I. Chlamydia
				Genus II. Chlamydophila
Phylum BXVII. Spirochaetes	Class I. Spirochaetes	Ordo I. Spirochaetales	Familia I. Spirochaetaceae	Genus I. Spirochaeta
				Genus II. Borrelia
				Genus IX. Treponema
			Familia III. Leptospiraceae	Genus II. Leptospira
Phylum BXX. Bacteroidetes	Class I. Bacteroides	Ordo I. Bacteroidales	Familia I. Bacteroidaceae	Genus I. Bacteroides
			Familia IV. Prevotellaceae	Genus I. Prevotella

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).

Морфологические типы бактерий, в сравнении с высшими организмами, немногочисленны. Клетки большинства микроорганизмов имеют сферическую, палочковидную или извитую форму, а также существует небольшая группа нитевидных микроорганизмов.

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 булавовидными утолщениями на концах (*коринебактерии* –

возбудитель дифтерии, рис. 2 в) некоторые палочки имеют овоидную (яйцевидную) форму – коккобактерии (возбудитель коклюша, рис. 2 г).

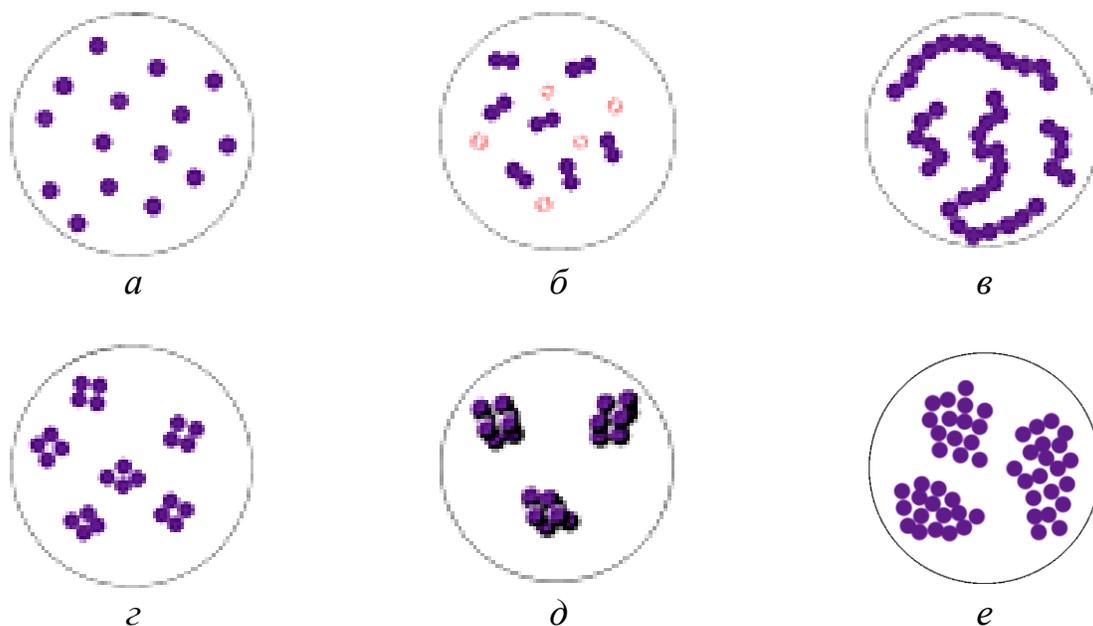


Рис. 1. Кокки: а – микрококки; б – диплококки; в – стрептококки; г – тетракокки; д – сарцины; е – стафилококки

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 (*клебсиеллы*) или под углом друг к другу (возбудитель дифтерии, рис. 2 в).

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

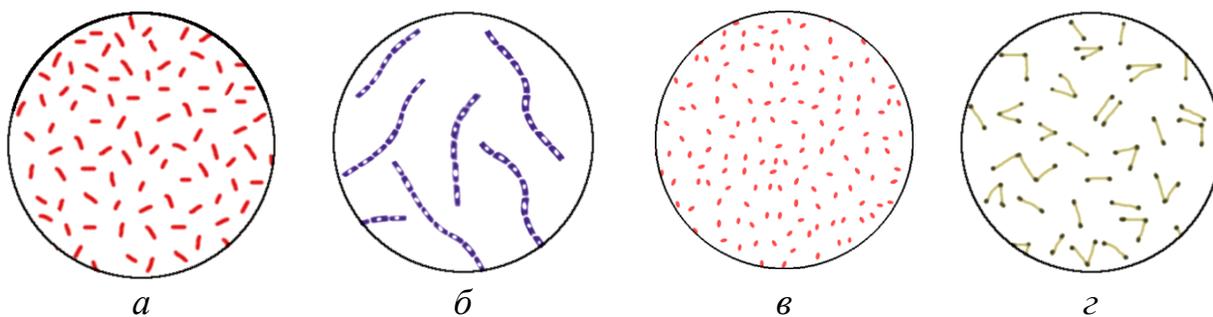


Рис. 2. Палочковидные микроорганизмы: а- кишечная палочка; б – возбудитель сибирской язвы; в – возбудитель коклюша; г – возбудитель дифтерии

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).

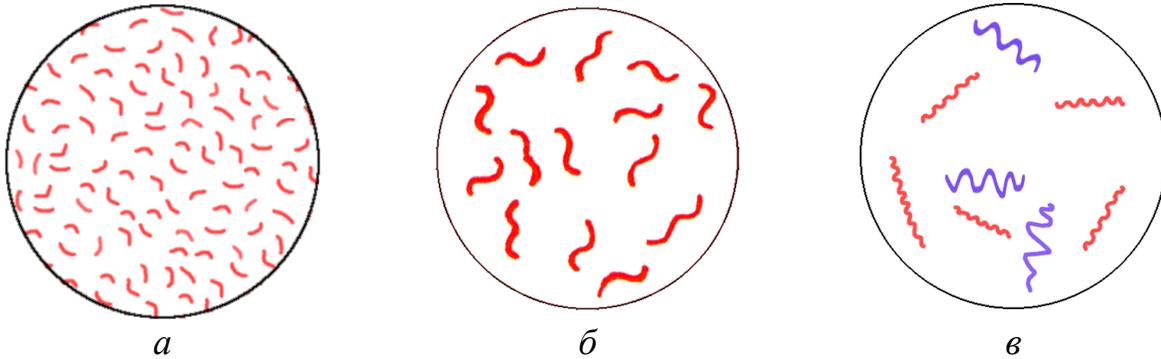


Рис. 3. Извитые микроорганизмы: а – вибрионы, б – спириллы, в – спирохеты

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

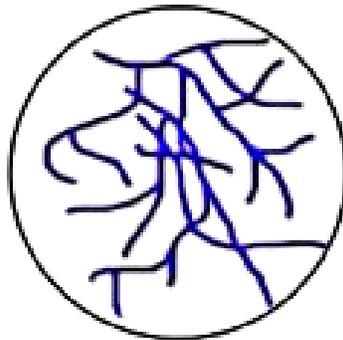


Рис. 4. Нитевидные микроорганизмы

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, т.е. минимальное расстояние, на котором находятся две точки, демонстрируемые микроскопом раздельно.

Современный микроскоп – это сложный оптический прибор, позволяющий изучать объекты в проходящем свете, темном поле, а также в отраженном свете. В настоящее время в практике микробиологических исследований наиболее часто применяются световая микроскопия, микроскопия в темном поле, фазово-контрастная и люминесцентная микроскопия. Для специальных микробиологических исследований используется электронная микроскопия.

Световая микроскопия

Световая микроскопия осуществляется с помощью обычного 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).

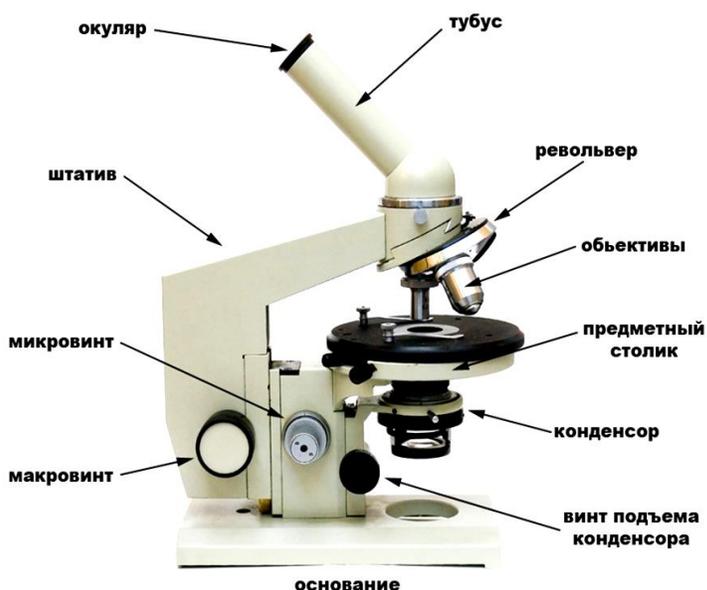


Рис. 5. Строение светового микроскопа

При исследовании микроорганизмов применяется специальный иммерсионный объектив. Иммерсионный объектив 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).

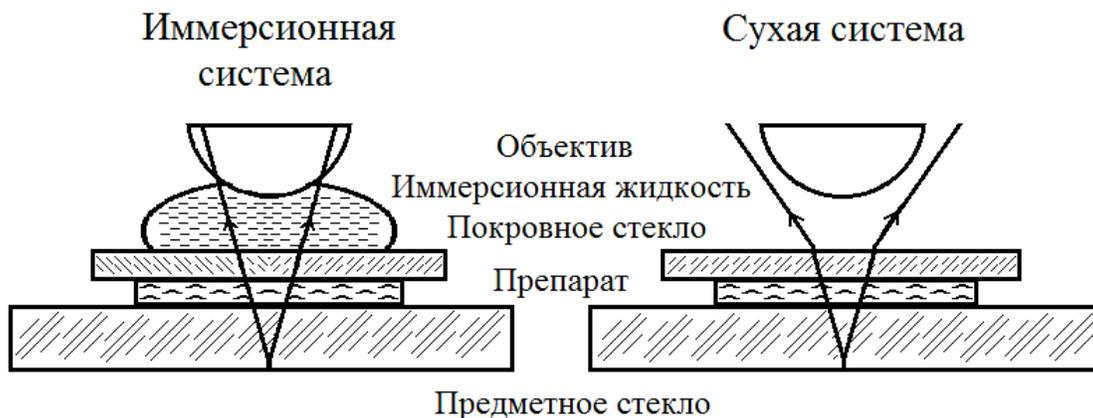


Рис. 6. Схема иммерсионной системы микроскопа

Изображение, получаемое в объективе, увеличивает окуляр, состоящий из двух линз. В отечественных микроскопах применяются окуляры с увеличением: 7, 10, 15. Общее увеличение микроскопа определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра. В микробиологии обычно используются увеличения в 600–1000 раз. Качество микроскопа зависит не от степени увеличения, а от его разрешающей способности. Разрешающая способность обычных светлопольных 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. Капля материала заполняет все пространство между покровным и предметным стеклом, образуя ровный

слой. Темнопольная микроскопия используется для изучения живых неокрашенных микроорганизмов.

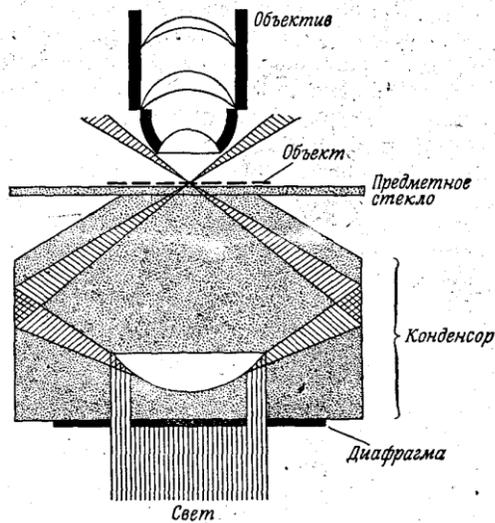


Рис. 7. Схема микроскопа для наблюдения в темном поле (Стейниер Р. и др., 1979)

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).

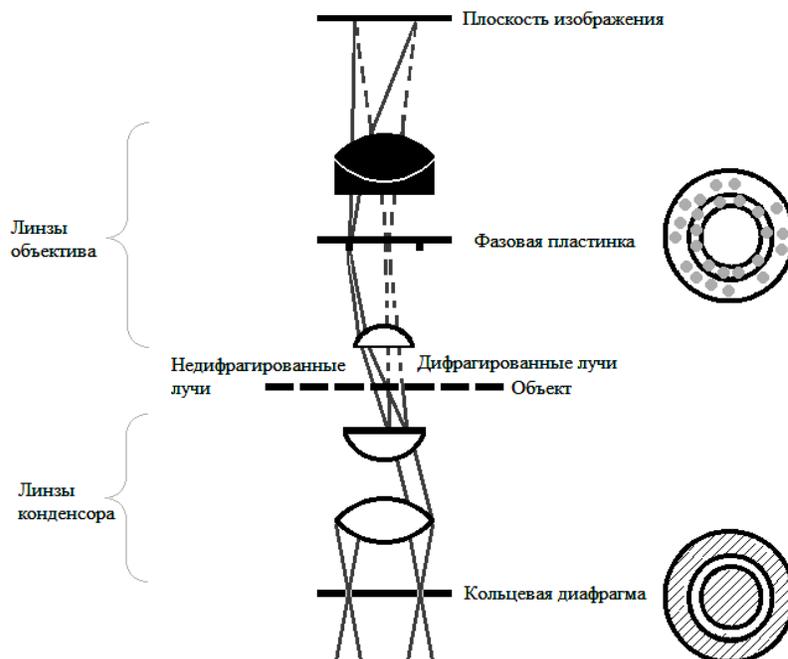


Рис. 8. Схема фазово-контрастного микроскопа

Фазовоконтрастный конденсор представляет собой обычный объектив с револьвером и набором кольцевых диафрагм для каждого объектива. Фазовый объектив снабжен фазовой пластинкой, которую получают нанесением солей редкоземельных элементов на объектив. Изображение кольцевой диафрагмы совпадает с кольцом фазовой пластинки соответствующего объектива.

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

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.

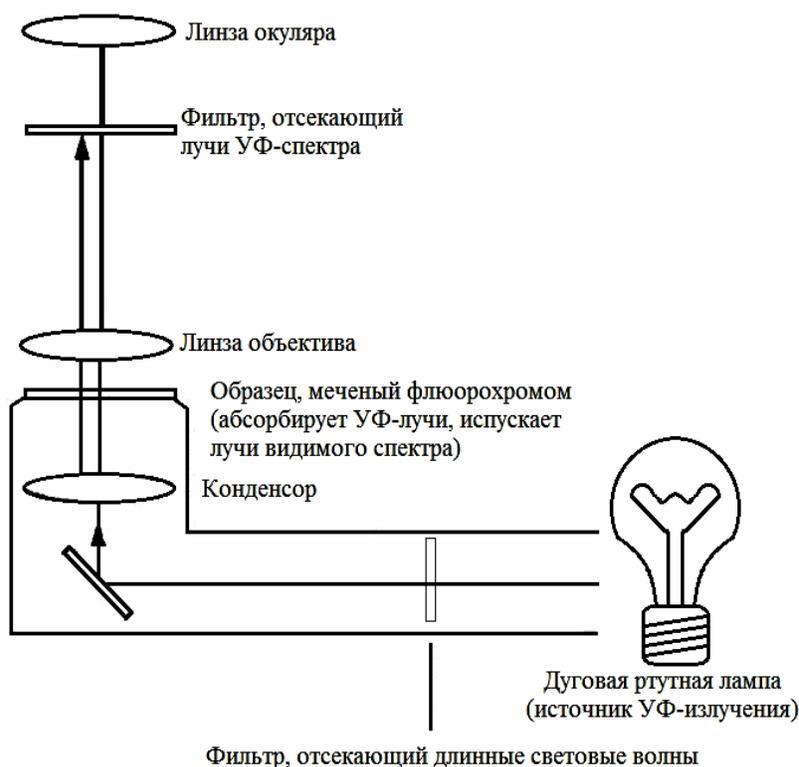


Рис. 9. Схема люминесцентной микроскопии

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, получит 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, обегаящему экран телевизионной трубки. Для растрового микроскопа требуется высокоинтенсивный источник электронов (1). Для этого вблизи поверхности заостренной вольфрамовой проволоки 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 ускоряются 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.

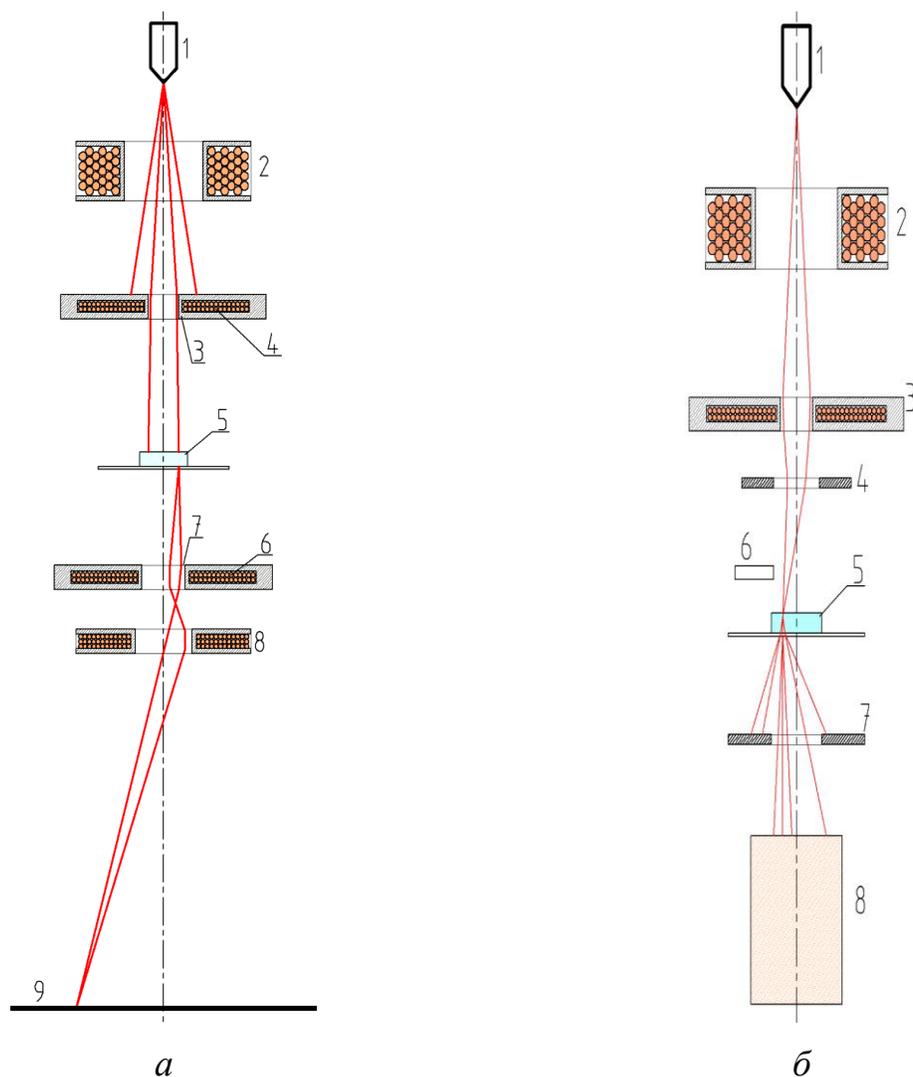


Рис. 10. Схема просвечивающего (а) и растрового (б) электронного микроскопа

СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Бактериальная клетка, несмотря на малые размеры, имеет все основные структурные компоненты, необходимые для осуществления обмена веществ. Бактерии являются прокариотами и существенно отличаются от клеток растений и животных (эукариотов). Основные отличия клеток прокариот и эукариот представлены в таблице 2.

Таблица 2

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).

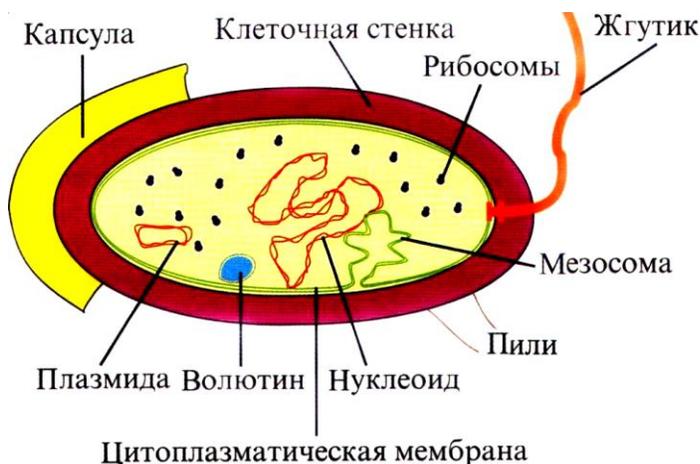


Рис. 11. Схематическое строение бактериальной клетки

Клеточная стенка

Клеточная стенка представляет собой внешнюю структуру бактерий толщиной 30–35 нм. На долю клеточной стенки приходится от 5 до 50% сухих веществ клетки. 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).

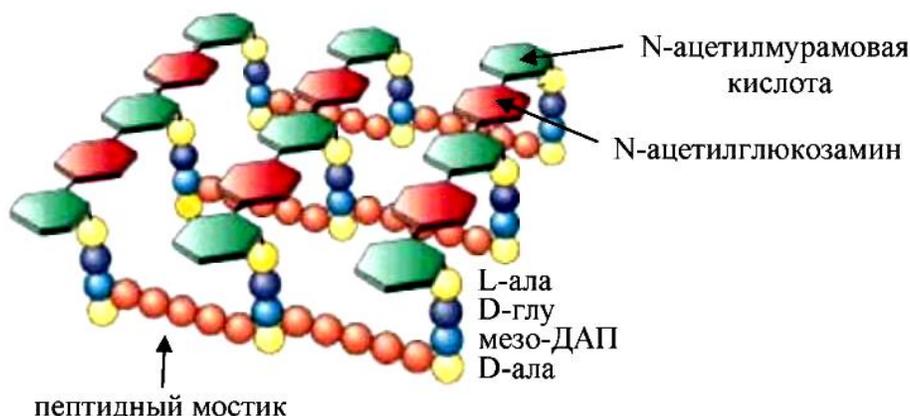


Рис. 12. Схематическое изображение однослойной структуры пептидогликана (<https://scask.ru>)

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 резко различаются как по химическому составу (табл. 3), так и по ультраструктуре.

Таблица 3

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. В клеточной стенке грамположительных бактерий кроме пептидогликана содержатся тейхоевые кислоты (ТК), в меньшем количестве липиды, полисахариды, белки.

Тейхоевые кислоты (полифосфатные соединения) делят на 2 класса:

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

Тейхоевые кислоты могут связываться с клеточными мембранами и осуществлять процесс адгезии, необходимый для бактериальной колонизации, являющейся первой стадией большинства инфекций. Особый интерес представляет изучение явления индукции тейхоевыми кислотами воспалительных процессов, цитотоксичности и иммуносупрессии.

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 обладают высокой биологической активностью: угнетают фагоцитоз, обладают токсическими свойствами, способствуют 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.

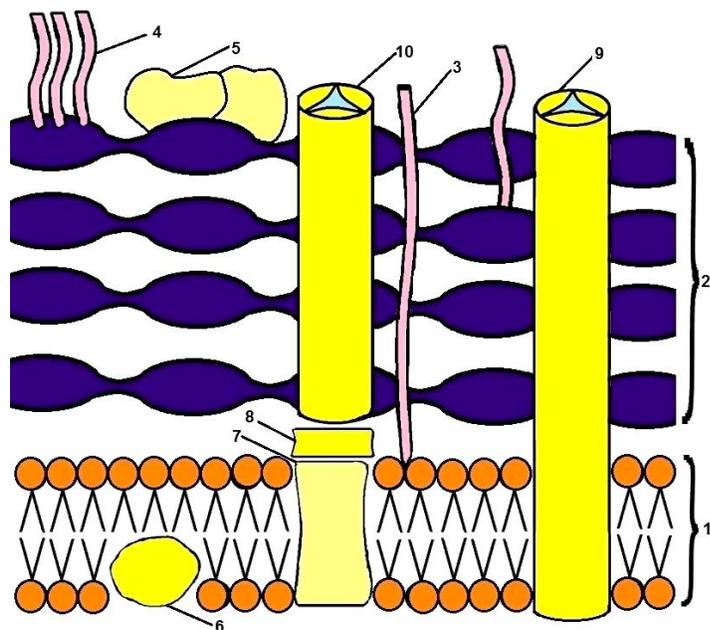


Рис. 13. Строение клеточной стенки грамположительных бактерий.
 1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – слой пептидогликана; 3 – липотейхоевые (мембранные) кислоты; 4 – тейхоевые (стеночные) кислоты; 5 – поверхностный белок; 6 – минорный белок; 7 – мажорный (интегральный) белок; 8 – вставочный белок; 9, 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 (составляющие в среднем 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 с комплексной структурой, обладающие разнообразной биологической активностью. ЛПС наружной мембраны состоит из трех фрагментов:

- липида А – консервативной структуры, практически одинаковой у грамотрицательных бактерий;
- ядра, или стержневой части (лат. *core* – ядро), относительно консервативной олигосахаридной структуры;
- высоковариабельной *О-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.

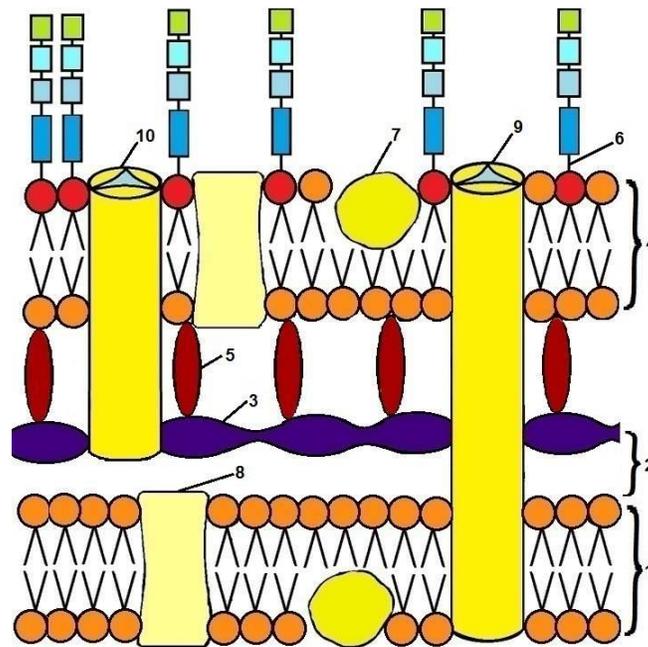


Рис. 14. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

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

От липида А отходит ядро, или стержневая часть ЛПС. О-специфическая цепь, отходящая от стержневой части молекулы ЛПС, обуславливает серогруппу, серовар определенного штамма бактерий. Таким образом, с понятием ЛПС связаны представления об О-антигене, по которому можно дифференцировать бактерии. Генетические изменения могут привести к дефектам, «укорочению» ЛПС бактерий и к появлению в результате этого «шерохова-

тых» колоний R-форм. ЛПС индуцирует синтез Ig M-антител, в иммунологии используется в качестве адъюванта и поликлонального активатора В-клеток.

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. Липидные компоненты придают клеточной поверхности гидрофобность. Гидрофобность, с одной стороны делает клетку 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, неокислотоустойчивые теряют краситель и докрашиваются метиленовым синим в голубой цвет.

При нарушении синтеза клеточной стенки бактерий под влиянием лизоцима, пенициллина, защитных факторов организма и других соединений 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. приобретать 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* этих бактерий морфологически неразличимы. Они представляют собой сферические образования разных размеров. *L-формы* могут возникать в естественных условиях в организме человека в результате длительного лечения некоторыми антибиотиками, чаще всего пенициллином. Они представляют собой осмотически чувствительные, шаровидные, колбовидные клетки различной величины, в том числе и проходящие через бактериальные фильтры.

Различают нестабильные и стабильные *L-формы* бактерий. Первые способны к реверсии в исходный вид при устранении причины, вызвавшей их образование. Они восстанавливают способность синтезировать пептидогликан клеточной стенки. 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).

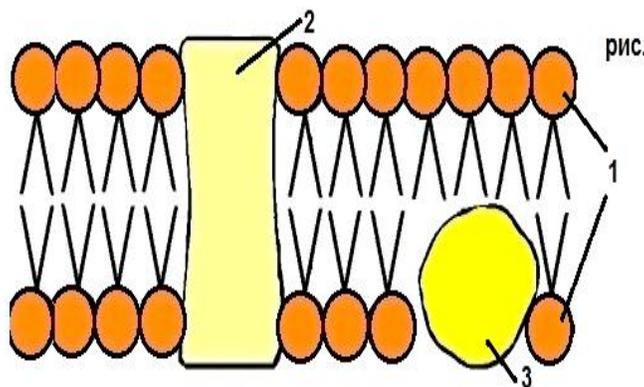


Рис. 15. Схема строения цитоплазматической мембраны:
1 – слой фосфолипидов; 2 – мажорный белок; 3 – минорный белок

С ЦПМ связаны многие ферменты и белки, участвующие в транспорте питательных веществ, а также ферменты и переносчики электронов конечных стадий биологического окисления (дегидрогеназы, цитохромная система, АТФ-аза). На ЦПМ локализуются ферменты, катализирующие синтез пептидогликана, белков клеточной стенки, собственных структур. Мембрана является также местом превращения энергии при фотосинтезе, окислительном фосфорилировании.

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). Толщина периплазмы составляет около 10 нм, объем зависит от условий среды и, прежде всего, от осмотических свойств раствора. 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 – субмикроскопические 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 частиц: 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. Бактериальные рибосомы могут стать «мишенью» для действия многих антибиотиков. В зависимости от интенсивности роста бактериальная клетка может содержать от 5000 до 50000 рибосом, число их тем больше, чем больше скорость роста клетки.

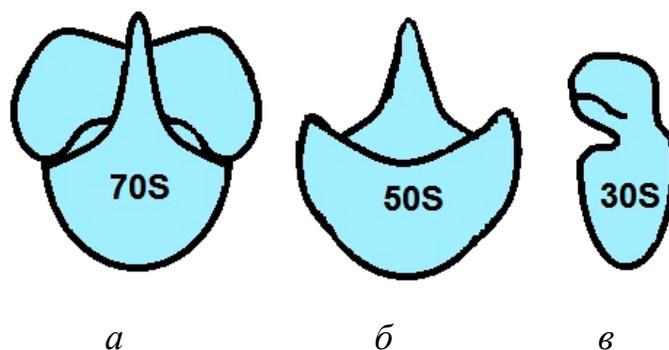


Рис. 16. Рибосомы прокариотической клетки:

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

Структурно и функционально рибосома – это, прежде всего, рРНК. Рибосомная РНК малой субъединицы рибосомы обозначается как 16S рРНК. рРНК, составляющая структурную основу большой субъединицы рибосомы, обозначается как 23S рРНК. Изучение 16S рРНК является основой геносистематики, позволяя оценить степень родства организмов. Также рибосома на 30–50% состоит из белка. Рибосома содержит около 50 различных белков.

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).

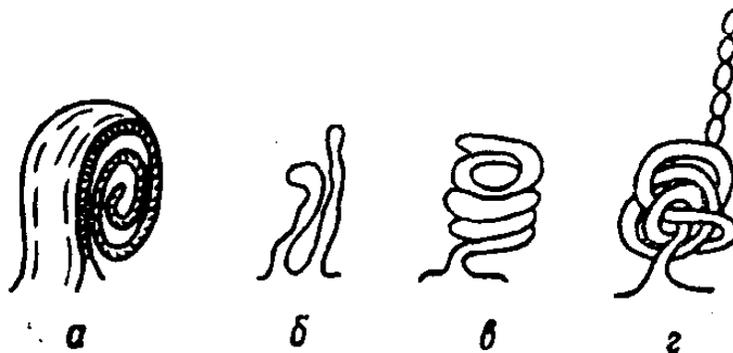


Рис. 17. Типы строения истинных мезосом:
а – ламеллярный; *б–г* – тубулярные типы (Бирюзова, Поглазова, 1977)

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.

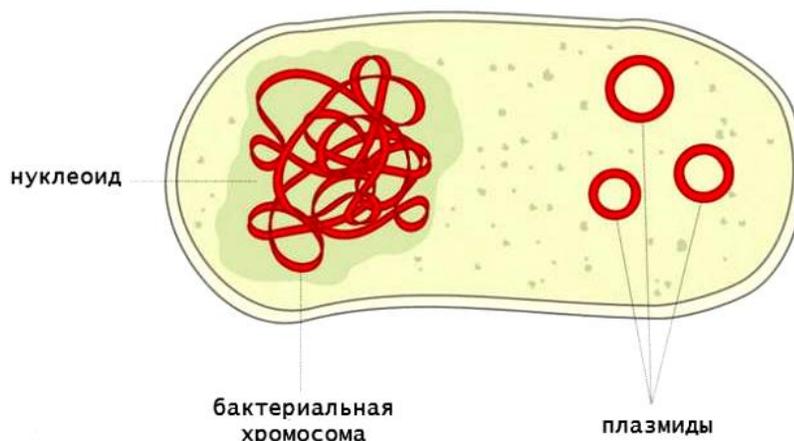


Рис. 18. Нуклеоид и плазмиды бактерий (<https://news4auto.ru>)

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 генетиче-

ского материала бактерии плазмиды играют важную роль в ее жизнедеятельности, детерминируя такие характеристики, 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, спирилл и дрожжей в виде плотных, хорошо контурированных образований в форме шара или эллипса, располагающихся, в основном, у полюсов клетки. Обычно на полюсах бывает по одной грануле. 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 *кловстридий* (*возбудители анаэробной инфекции*). Кловстридии столбняка имеют круглую спору и напоминают барабанные палочки. Кловстридии ботулизма отличаются большими овальными спорами, что придает им вид теннисной ракетки.

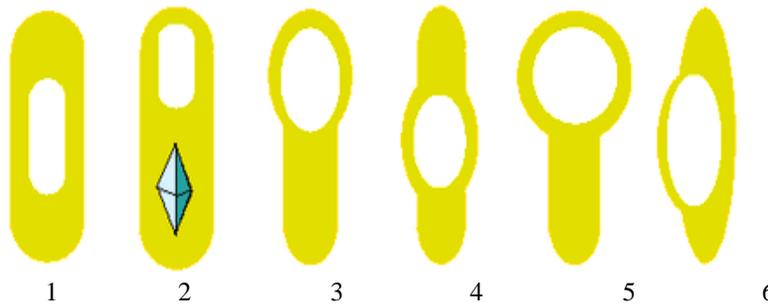


Рис. 20. Типичные формы спорообразующих клеток: 1 – спора расположена в центре; материнская клетка не увеличена (*Bacillus megaterium*); 2 – спора расположена терминально, материнская клетка не увеличена; заметны белковые включения (*Bacillus thuringiensis*); 3 – спора расположена терминально, материнская клетка раздута в форме булавы (*Bacillus pouluxia*); 4 – спора расположена в центре; материнская клетка деформирована и приобрела форму веретена – клостридиальная форма (*Bacillus pouluxia*); 5 – спора расположена терминально; круглая материнская клетка имеет форму барабанной палочки – плектрициальная форма (*Bacillus sphaericus*); 6 – спора расположена латерально; материнская клетка приобрела веретенообразную форму (*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).

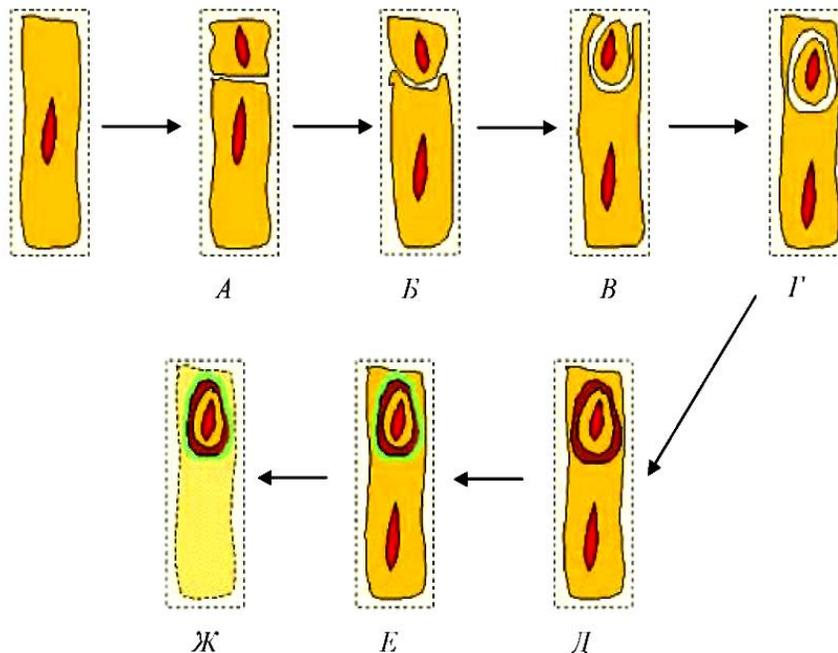


Рис.21. Схема процесса спорообразования: А – отделение протопласта споры; Б, В, Г – образование проспоры; Д, Е, Ж – формирование споры (Лысак В.В., 2008)

Первый этап – подготовительный. В вегетативной клетке бактерий, переходящей к спорообразованию, прекращаются ростовые процессы, удваивается нуклеоид (ДНК) и изменяется метаболизм, а именно распадается значительная часть белков материнской клетки, образуется специфическое для спор вещество – дипиколиновая кислота, которая не встречается в вегетативных клетках.

Второй этап – формирование споры начинается с деления клетки. Часть цитоплазмы и хромосома бактериальной вегетативной клетки отделяются, окружаясь растущей 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 дипиколиновой кислоты и ионов кальция. Спора приобретает термоустойчивость, которую связывают с наличием в ней дипиколината 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 дипиколината 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 °С), 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 дипиколата 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.

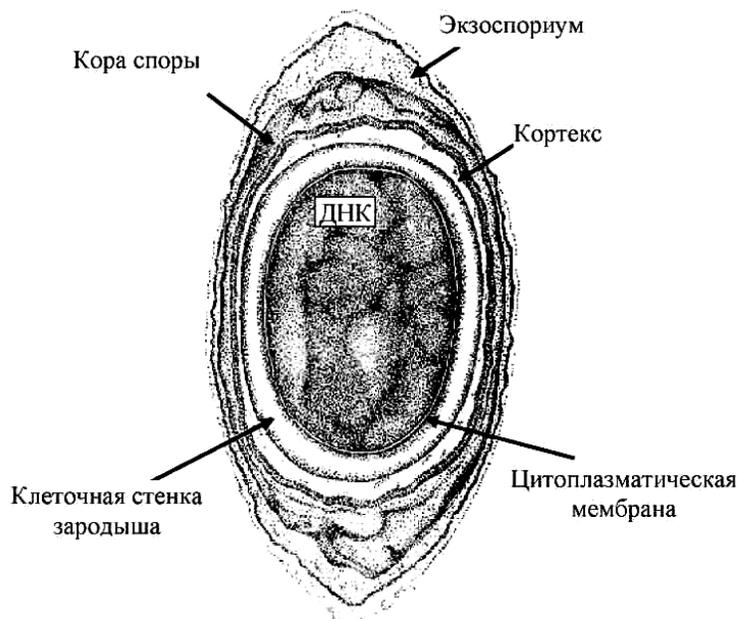


Рис. 22. Схема строения зрелой споры (по С. Халею, 2001)

Окраску спор производят специальным методом Ожешко, который включает предварительное прогревание споры, а также воздействие концентрированных растворов красок при высокой температуре.

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. Капсульные Аг (К-Аг) многих патогенных бактерий проявляют выраженные иммуногенные свойства и используются для приготовления иммунобиологических препаратов (например, вакцины против пневмококковых и менингококковых инфекций).

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

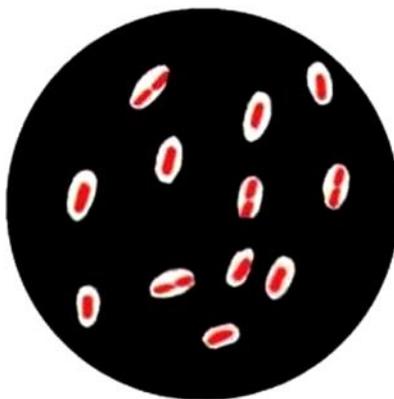


Рис. 23. Выявление капсулы методом негативного контрастирования по Бурри–Гинсу

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 – так называемый Н-антиген. Субъединицы флагеллина закручены в виде спирали.

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

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

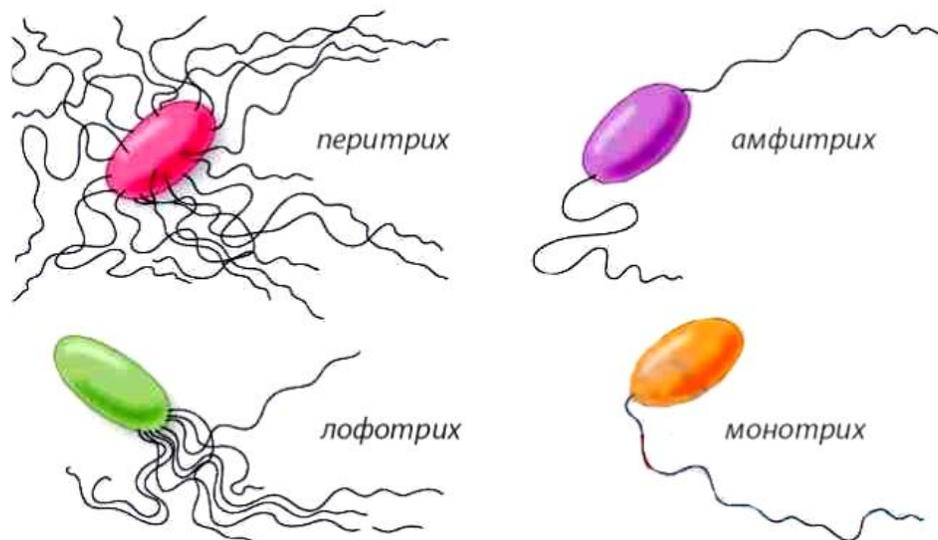


Рис. 24. Типы жгутикования у бактерий. (<https://ik-ptz.ru>)

Жгутик состоит из трех компонентов – спиральной жгутиковой нити (филамента) постоянной толщины, крючка (колена) и базального тельца (рис. 24). 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 оболочке (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 (флагеллиновый мотор). Удаление пептидогликанового слоя клеточной стенки ведет к потере способности бактерий к движению, хотя жгутики при этом остаются неповрежденными.

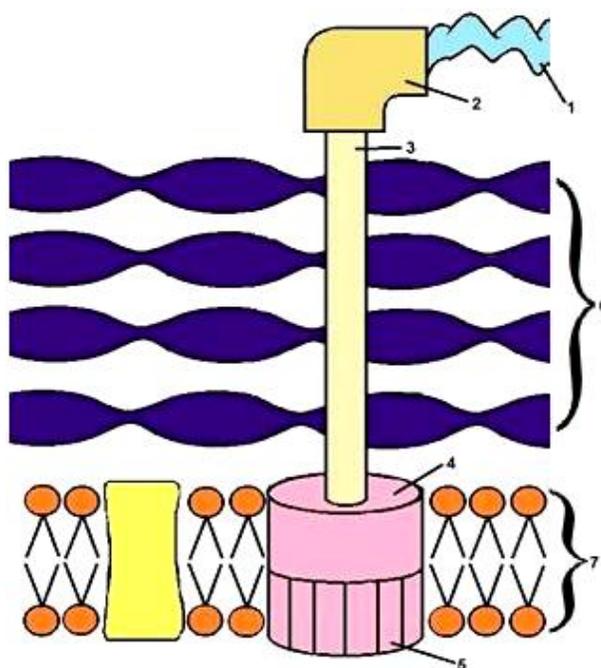


Рис. 24. Строение жгутика грамположительной бактерии:

1 – филамент; 2 – крючок; 3 – стержень;
4 – S-диск; 5 – M-диск; 6 – пептидогликан; 7 – цитоплазматическая мембрана

У грамотрицательных бактерий в базальном тельце две пары колец (рис. 25): 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.

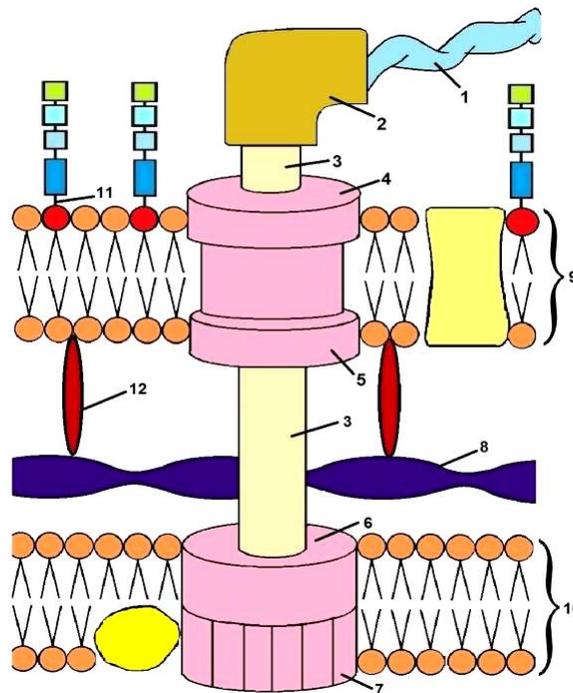


Рис. 25. Строение жгутика грамотрицательной бактерии. 1 – филамент; 2 – колено; 3 – стержень; 4 – L-диск; 5 – P-диск; 6 – S-диск; 7 – M-диск; 8 – пептидогликан; 9 – наружная мембрана; 10 – цитоплазматическая мембрана; 11 – липополисахарид; 12 – липопротейн

В качестве источника энергии используется разность протонных потенциалов на цитоплазматической мембране. Механизм вращения обеспечивает протонная АТФ-синтетаза. Скорость вращения жгутика может достигать 100 об./с. Если клетка имеет много жгутиков, они начинают синхронно вращаться, сплетаясь в единый пучок, который образует своеобразный пропеллер.

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 светлопольной 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. 26).

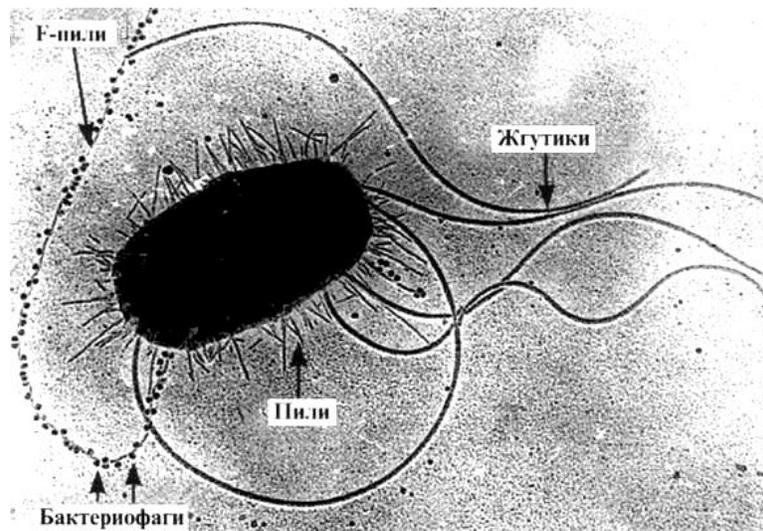


Рис. 26. Жгутики и пили бактерий. Электронная микроскопия. (Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.)

Пили построены из одного вида белка – *пилина*, субъединицы которого организованы в виде полых 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.

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.

ОТДЕЛЬНЫЕ ГРУППЫ ПРОКАРИОТ

Актиномицеты

Актиномицеты (*actinomyces* – от греч. *aktis* – луч, *mykes* – гриб) представляют группу неподвижных бактерий, по уровню организации занимающую промежуточное положение между бактериями и грибами. Имеют вид небольших или длинных несептированных ветвящихся нитей, названных гифами. Скопление гифов называют мицелием. Сходство с грибами чисто внешнее, так как актиномицеты имеют прокариотический тип клетки с наличием клеточной стенки, 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 (культуральная форма) актиномицеты формирует субстратный мицелий, образующийся в результате вставания мицелия в питательную среду и воздушный, растущий на поверхности среды. В пораженных тканях (тканевая форма) 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 спороносцы со спорангиями на концах воздушного мицелия или почкованием, или фрагментацией мицелия. Спороносцы 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. Они участвуют в круговороте веществ в природе. Отдельные виды актиномицетов используются как продуценты антибиотиков, витаминов, липидов, протеаз, аминокислот, стероидов.

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

Актиномицеты относятся к порядку *Actinomycetales*, включающего семейства:

- *Actinomycetaceae*, род *Actinomyces*;
- *Nocardiaceae*, род *Nocardia*;
- *Streptomycetaceae*, род *Streptomyces*;
- *Mycobacteriaceae*, род *Mycobacteria*.

Представители рода *Actinomyces* имеют вид длинных или коротких разветвленных палочек, не образующих воздушного мицелия. *Actinomyces israeli*, *A. bovis*, *A. albus*, *A. violaceus* и др. вызывают у человека актиномикоз и образуют друзы в пораженных тканях.

Нокардии имеют нитевидную форму клеток и образуют на питательных средах воздушный и субстратный мицелий. Размножаются фрагментацией и делением пополам. Патогенные нокардии, например, *N. asteroides* и *N. farcinica*, вызывают нокардиоз.

Актиномицеты рода *Streptomyces* образуют разветвленный мицелий, подразделяется на субстратный и воздушный. Нити мицелия на фрагменты не распадаются, размножение происходит спорами. Основными средами обитания стрептомицетов являются почва и слои морской воды. Представители этого рода продуцируют большое количество антибиотиков, активных против грибков, бактерий и опухолевых клеток. (стрептомицин, нистатин, тетрациклины и др.). Некоторые представители семейства *Streptomycetaceae* вызывают у человека кожные мицетомы.

Семейство *Mycobacteriaceae* отличается рядом особенностей от истинных актиномицет. Обычно это тонкие, искривленные палочки, не образующие мицелия и ветвящиеся в при длительном культивировании. Микобактерии кислотоустойчивы в связи с присутствием в клеточной стенке большого количества липидов (до 40% сухого веса), миколовых кислот и др. Вызывают у человека туберкулез – *M. tuberculosis* и лепру (проказу) – *M. leprae* (рис. 27).

Методы выявления. Актиномицеты окрашивают по Граму и Цилю-Нильсену. Друзу извлекают из патологического материала петлей, помещают в каплю воды на предметное стекло, слегка придавливают покровным, затем вводят под стекло каплю щелочного раствора метиленового синего и микроскопируют с сухим объективом, можно использовать фазовый контраст.

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 – 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. 27. Микобактерии, нокардии и актиномицеты: а – форма колоний, характерная для данного рода; б – разрез через заросшую бактериями, поверхность агара. Показаны типичные формы роста субстратного мицелия (СМ) и воздушного мицелия (ВМ), спорофоры (Спф) и спорангии (Спа), а также лишенные жгутиков и обладающие жгутиками споры (спо) (Шлегель Г., 1972)

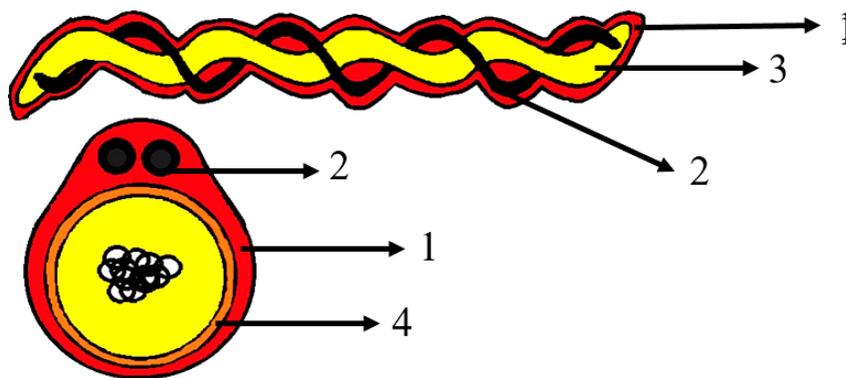


Рис. 28. Строение спирохеты: 1 – клеточная стенка; 2 – аксостиль, состоящий из осевых фибрилл; 3 – протоплазматический цилиндр; 4 – цитоплазматическая мембрана

В протоплазматическом цилиндре содержатся: нуклеоид, рибосомы, мезосомы, включения. Клеточная стенка содержит тонкий слой пептидогликана, эластична и не обладает ригидностью. Эндоспор, капсул и экзожгутиков эти бактерии не образуют, грамотрицательны, 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*.

1. Род *Borrelia* – представители имеют 3–10 неравномерных отлогих завитков, концы заострены, длиной 10–30 мкм. Движение толчкообразное. По Романовскому–Гимзе окрашиваются в сине-фиолетовый цвет. Патогенные виды – *Borrelia burgdorferi*, *B. afselii*, *B. garinii* – вызывают иксодовый клещевой боррелиоз – болезнь Лайма).

2. Род *Treponema* – спирохеты имеют 8–14 туго закрученных, одинаковых по амплитуде завитков, длиной 5–15 мкм. Движение плавное, медленное с вращением вокруг продольной оси. По Романовскому–Гимзе окрашиваются в бледно розовый цвет. Вид *Treponema pallidum* – является возбудителем сифилиса.

3. 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 (рис. 29).

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.

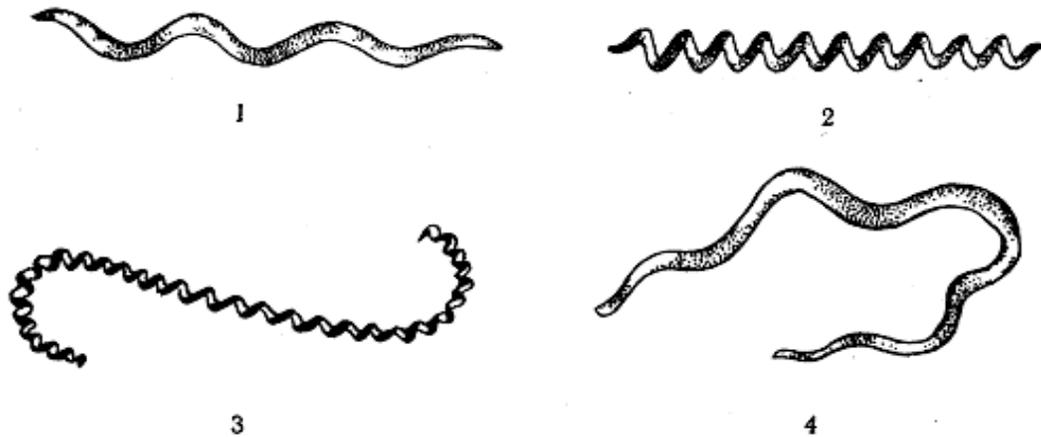


Рис. 29. Морфология спирохет: 1 – спирохета; 2 – трепонема; 3 – лептоспира; 4 – боррелия

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 и составляет 0,45 МД. Главная особенность микоплазм – отсутствие клеточной стенки. 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 к тенерикутам, классу *Mollicutes* («нежная кожа»), порядку *Mycoplasmatales*. Семейство *Mycoplasmataceae* включает в себя 2 рода – *Mycoplasma* и *Ureaplasma*.

Из-за отсутствия клеточной стенки микоплазмы (рис. 30) осмотически чувствительны и имеют разнообразную форму:

- а) мелкие сферические или овоидные клетки размером 0,2 мкм (элементарные тельца) которые фильтруются через бактериальные фильтры;
- б) более крупные шаровидные, размером до 1,5 мкм;
- в) нитевидные, ветвящиеся клетки размером до 150 мкм.

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.

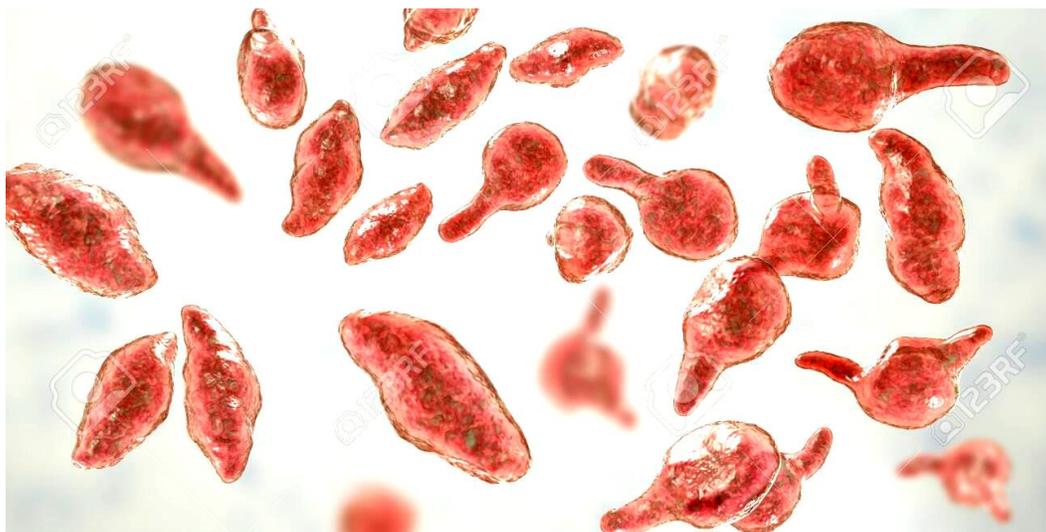


Рис. 30. Морфология микоплазм. Цитируется по «Illustration – Bacteria *Mycoplasma genitalium*, 3D illustration. The causative agent of sexually transmitted infections and infertility», https://www.123rf.com/photo_124508103_stock-illustration-bacteria-mycoplasma-genitalium-3d-illustration-the-causative-agent-of-sexually-transmitted-infection.html

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 растущим в среду центром, напоминающие «яичницу-глазунью» (рис. 31) (темный центр и более светлая ажурная периферия).

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

В патологии человека наибольшую роль играют несколько представителей рода *Mycoplasma*: *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. anthracidis* и рода *Ureaplasma* – *U. parvum* и *U. urealyticum* (названный так из-за уреазной активности). 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.

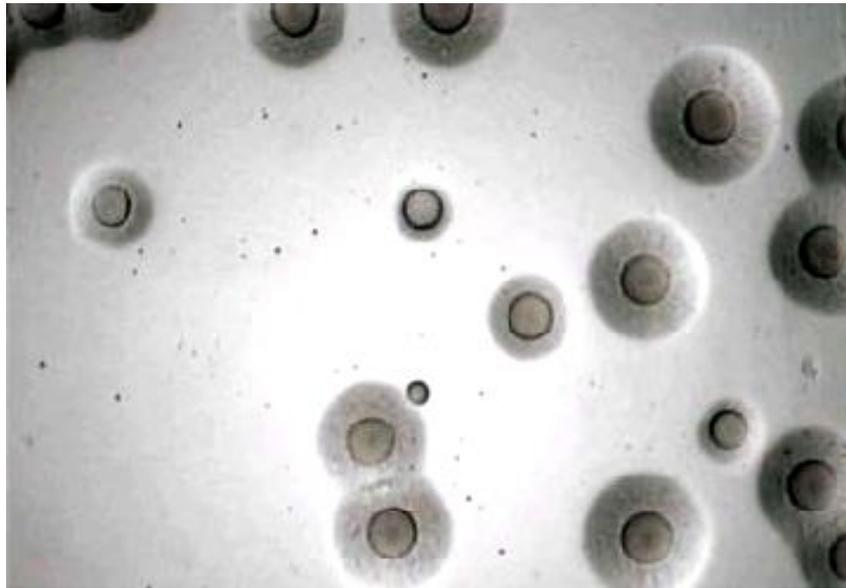


Рис. 31. Колонии *Mycoplasma bovis*. Цитируется по «Development of a Second-Generation Vaccine against Mycoplasmosis: Preparation of a Fraction Candidate from *Mycoplasma bovis* and its Evaluation as a Vaccine; *Global Veterinaria* 16 (2): 137–144, 2016»

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 (до 0,5 мкм);
- 2) палочковидные двухзернистые (1–1,5 мкм);
- 3) бациллярные трех-четырёхзернистые (3–4 мкм);
- 4) нитевидные многозернистые (10–40 мкм).

Зерна (нуклеопротеиды) обнаруживаются при окраске по Романовскому–Гимзе. Все формы взаимобратимы. 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, содержание углеводов невелико.

Жизненный цикл риккетсий зависит от жизнедеятельности клетки-хозяина и складывается из двух стадий: вегетативной и покоящейся (элементарные тельца). Риккетсии, находящиеся в вегетативной стадии (рис. 32) 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.

Риккетсии способны к биосинтезу белка, но не могут самостоятельно получать макроэргические 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 животных и человека, переносчиками служат вши, блохи, клещи. Заболевания называются риккетсиозами. Большинство болезнетворных для человека видов риккетсий входит в состав семейства *Rickettsiaceae*, роды *Rickettsia*, вызывая эпидемический сыпной тиф (*Rickettsia prowazekii*), лихорадку скалистых гор (*Rickettsia rickettsii*), клещевой риккетсиоз (*Rickettsia sibirica*) и другие. Паразитирующие виды ассоциированы с ретикулоэндотелиальными клетками и клетками эндотелия сосудов или эритроцитами.

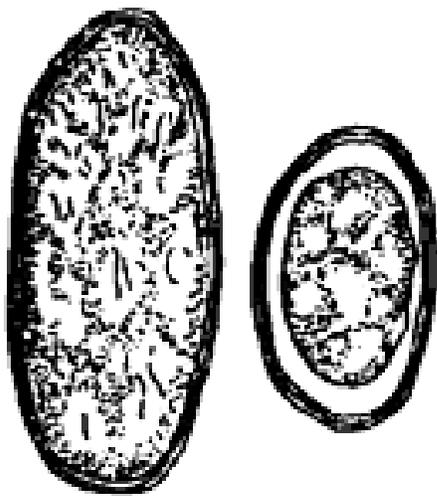


Рис. 32. Продольный срез вегетативной (слева) и покоящейся (справа) форм риккетсий Провацка (схема) [по Здродовскому П.Ф. и Голиневич Е.М., 1972]

Методы выявления. Риккетсии хорошо окрашиваются по Романовскому-Гимзе в сиреневый цвет, по Морозову (методом серебрения) в черный цвет. Специфическим методом выявления риккетсий является окраска по Здродовскому.

Риккетсии окрашиваются в рубиново-красный цвет и легко обнаруживаются на фоне голубой цитоплазмы и синего ядра клеток.

Хламидии

Хламидии – неподвижные, облигатно паразитические, кокковидные бактерии. Размножаются только внутри связанных с мембраной вакуолей в ци-

топлазме клеток человека, млекопитающих, птиц. Членистоногие не служат хозяевами или переносчиками. Размножение происходит в ходе уникального цикла развития. Основными стадиями жизненного цикла хламидий являются:

1. Элементарные тельца – мелкие (0,2–0,5 мкм) электронно-плотные шаровидные структуры, лишенные метаболической активности, имеющие компактный нуклеоид и ригидную клеточную стенку, которые фильтруются через бактериальные фильтры. Они являются инфекционным началом хламидий и обеспечивают выживание хламидий во внеклеточной среде и заражение новых клеток.

2. Ретикулярные тельца – более крупные (0,8–1,5 мкм), сферические образования, имеющие сетчатую структуру с тонкой клеточной стенкой и фибриллярным нуклеоидом. Они образуются из элементарных телец внутри клеток, лишены инфекционности и, подвергаясь делению, обеспечивают репродукцию хламидий. Отсюда другое, исторически первое название ретикулярных телец – «инициальное тело». Ретикулярные тельца являются вегетативной формой хламидий.

3. Промежуточные тельца – промежуточная стадия между элементарными и ретикулярными тельцами.

Жизненный цикл хламидий начинается с того, что элементарные тельца фагоцитируются клеткой-хозяином, а затем в течение нескольких часов реорганизуются, 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. 33).

Хламидии хорошо размножаются в желточном мешке куриного эмбриона при температуре от 33–44 °С, а также в культурах клеток различных позвоночных. Зависимость хламидий от клеток-эукариотов объясняется их неспособностью аккумулировать и использовать энергию, так как они не могут синтезировать АТФ. В этом отношении хламидии похожи на риккетсий, в связи с чем, эти микроорганизмы также называют «энергетическими паразитами».

Своеобразие хламидий проявляется и в строении их клеточной стенки. Она лишена пептидогликана и представляет собой двухслойную мембрану, ригидность которой определяют пептиды, перекрестно сшитые дисульфид-

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 – растения. Примерно 98% всех относимых к грибкам организмов относятся к царству Fungi (настоящие грибы). 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. Перспективно использование грибов для уничтожения отходов, например, бытового мусора. Разведение на мусоре съедобных грибов и кормовых дрожжей является экологически безопасным и эффективным методом, альтернативным широко используемому сжиганию или захоронению. 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 *Mухомycota* (грибы слизевики) и *Еumycota* (истинные грибы). Истинные грибы, клетки которых не имеют перегородок, известны как *низшие* грибки. К ним относят классы *Chrytidiomycetes*, *Hyphochrytidiomycetes*, *Oomycetes*,

Zygomycetes. Представители классов *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* и *Deuteromycetes* – это *высшие* грибки, так как их нитевидные клетки имеют перегородки-септы. Некоторые представители этих классов, вызывающих заболевания у человека.

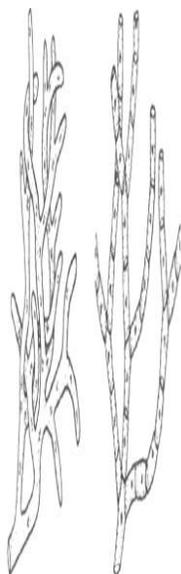
Строение грибной клетки типичное для эукариот. Клетки грибов могут иметь самый различный внешний вид, но все они сходны между собой набором основных клеточных органелл. К ним относятся: клеточное ядро, митохондрии, рибосомы, элементарные мембраны, клеточная стенка, микросомы и подобные им органеллы и 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 (сходные в основном с таковыми у высших растений), лизосомы с протеолитическими ферментами, осуществляющими расщепление белков, сегресомы и хитосомы. Они присущи только грибкам. Сегресомы – вакуолеподобные структуры, ограничивающие поступление в клетку гидрофобных веществ, например, углеводов. Хитосомы представляют собой органеллы, содержащие фермент хитинсинтетазу, необходимый для синтеза хитина. Так же 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. Диаметр гиф варьирует в зависимости от вида грибка и внешних условий от 2 мкм до 100 мкм и более. 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 вырастают внутрь клеток и имеют в центре пору, через которую цитоплазма может перетекать из одной клетки в другую (рис. 35).



*Рис. 35. Строение мицелия у низших и высших грибов
(<https://studopedia.org>)*

Совокупность гифов образует мицелий (грибницу). Он представляет собой переплетенные ветвящиеся гифы, ветвление осуществляется боковыми выростами. Мицелий может быть субстратный (вегетативный), он врастает в питательную среду. Такой мицелий обычно бывает весьма обильным, с большой общей поверхностью, через него осмотическим путем происходит всасывание воды и питательных веществ. Мицелий, растущий на поверхности среды, называют воздушным или репродуктивным, т.к. содержит особые структуры – споры, обеспечивающие размножение грибов. 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. 36).

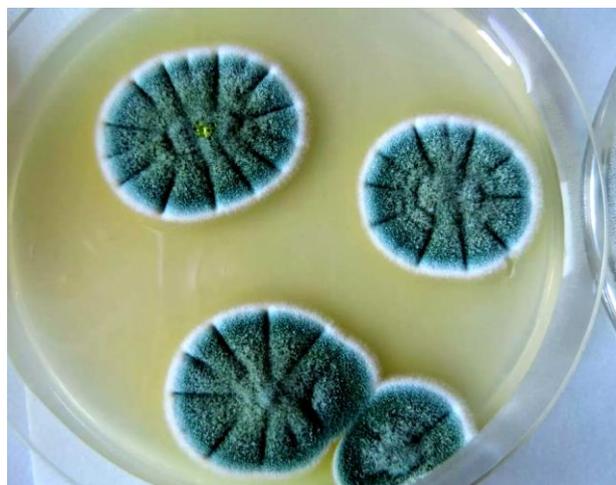


Рис. 36. Колонии плесневых грибов

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 представляет скопление огромного числа клеток разной величины (результат почкования), они похожи на бактериальные – гладкие, пастообразные, вырастают через 24–48 ч (рис. 37).



Рис. 37. Внешний вид бластомицетов и их колоний (<https://bio-x.ru>)

Бластомицеты и гифомицеты совершенно непохожи, но известны грибки, которые в зависимости от условий растут как дрожжи или как плесени. Это явление называется диморфизмом, а такие грибки – диморфными грибами. 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. Так же вегетативное размножение может происходить путем почкования растущей гифы на отдельные клетки, почки могут образовываться на протяжении всей гифы или только на верхушечных гифах. Образуемые таким путем клетки называются оидиями (рис. 38-1). 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. 38-2). Оидии и хламидоспоры образуют высшие грибки.

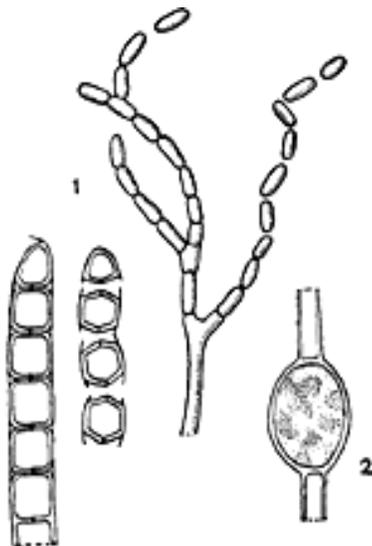


Рис. 38. Вегетативное размножение грибков: 1 – оидии; 2 – хламидоспора
(<https://sites.google.com>)

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 размно-

жение осуществляется с помощью спор, которые распространяются водой, животными, насекомыми, токами воздуха. Образованию бесполой спор не предшествует слияние клеток. Бесполое размножение грибов осуществляется с помощью специальных плодородных гифов воздушного мицелия. У высших грибов на кончике плодородной 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. 39-1) или булавовидно утолщена (*Aspergillus niger*, рис. 39-2). Форма и расположение конидий характерны для различных видов грибов и используются в качестве признака их идентификации. У низших грибов (*Mucor mucedo*, рис. 39-3) споры формируются внутри шаровидных мешочков – спорангиев, внутри которых формируются внутренние споры – эндоспоры. Плодородная гифа, на которой образуются спорангии называется спорангиеносцем.

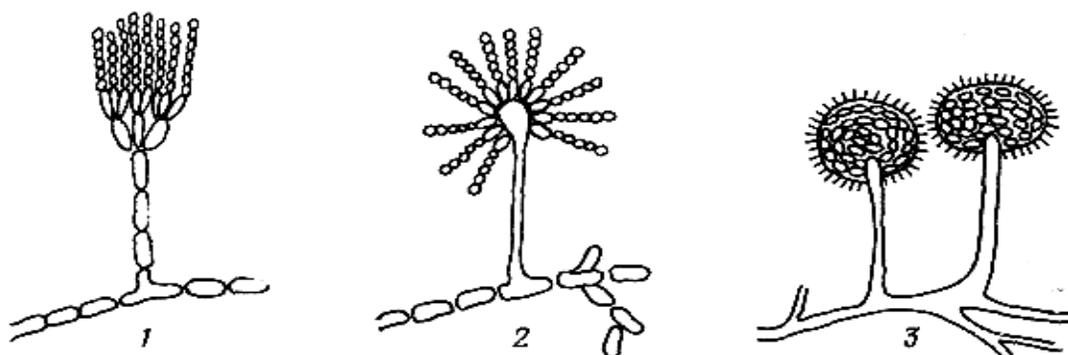


Рис. 39. Плесневые грибки. 1 – *Penicillium*; 2 – *Aspergillus*; 3 – *Mucor* (<https://spravochnick.ru>)

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 кле-

ток, называемых гаметамы, половой процесс протекает в двух фазах. Первой фазой полового процесса является слияние протоплазменного 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 грибков 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. 40).

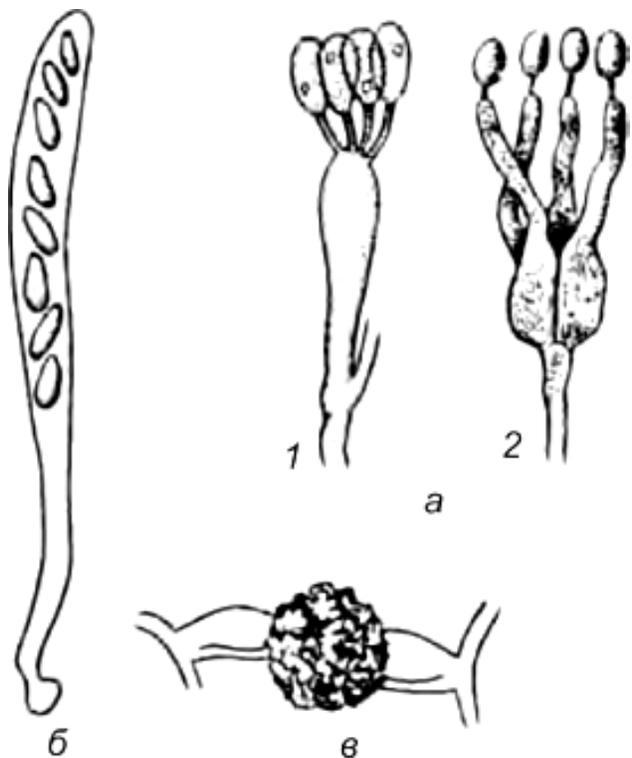


Рис. 40. Органы полового спороношения:
 1 – одноклеточная базидия;
 2 – многоклеточная базидия;
 а – базидии с базидиоспорами;
 б – сумка (аскус) с аскоспорами;
 в – зигоспора (<https://spravochnick.ru>)

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. 41).

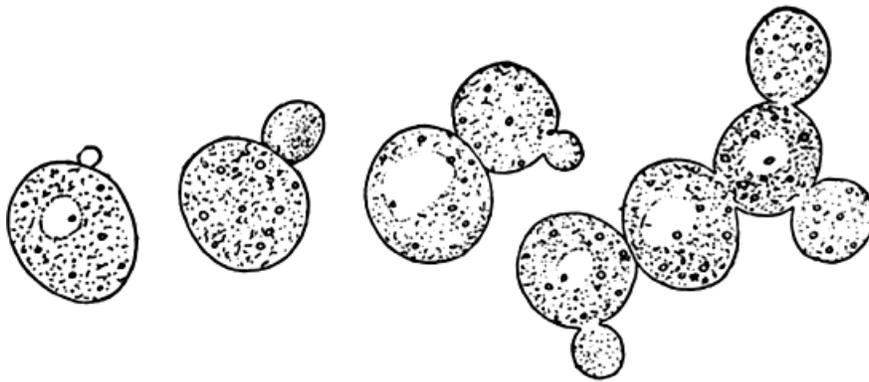


Рис. 41. Почкование дрожжей (<https://studme.org>)

Роль грибов в патологии человека

Многие грибы вредят здоровью людей и животных. Их принято называть паразитическими или патогенными грибами.

Различают три основных типа прямого поражения человека грибами:

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

В настоящее время насчитывается около 500 видов грибов, способных всегда вызывать инфекционные заболевания у человека: одни виды являются причиной системных инфекций, другие – поражают кожу и подкожную клетчатку, некоторые – только кожу. Большое количество грибов относится к патогенным и условно-патогенным возбудителям, вызывающим заболевания только при снижении колонизационной резистентности кожи, слизистых обо-

лочек 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. Представители этого класса характеризуются хорошо развитым неклочным многоядерным мицелием. Зигомицеты развиваются в почве, на пищевых продуктах, в навозе, в растениях и могут паразитировать в организме животных и человека. Бесполое размножение осуществляется неподвижными спорангиоспорами, реже конидиями. Половой процесс – зигогамия (зигоспоры). Медицинское значение имеют грибки рода *Mucor* (*Mucor mucedo*). Мукоровые грибки образуют разветвленный мицелий, напоминающий паутину, обычно стелющийся по субстрату. Он состоит из бесцветных гиф, сильно ветвится и обычно не имеет перегородок. На довольно толстых гифах образуются органы бесполого размножения – спорангиеносцы со спорангиями. Спорангии мукоровых имеют вид темных, хорошо видимых головок, благодаря чему эти грибки получили название головчатых плесеней. При созревании спорангия в нем образуется огромное количество спорангиоспор, которые после освобождения из спорангиев прорастают и дают начало новому мицелию. Головчатая плесень может вызывать у человека мукорозы – поражение легких (псевдотуберкулез), кератиты, отиты, вульвовагиниты, поражение печени, почек и других органов.
- *Класс Ascomycetes* – аскомицеты. Аскомицеты или сумчатые грибки – один из крупнейших классов, включает около 30% всех известных видов грибов. Аскомицеты обитают как сапрофиты в почве, на разнообразных растительных субстратах (древесина, отмершие растения), в морях или пресных водоемах на погруженной в воду древесине. Большинство видов аскомицетов паразитируют на различных организмах – на растениях (водорослях, лишайниках и высших растениях), на животных и человеке, нередко вызывают серьезные заболевания. Сумчатые грибки имеют многоклеточный септированный мицелий. При половом процессе размножаются аскоспорами (споры развиваются в особых сумках – асках). Бесполое размножение осуществляется конидиями. Входящие в этот класс грибы чрезвычайно разнообразны по

строению. Патогенные грибки относятся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*. Представители рода *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*) имеют прямостоящие конидиеносцы, на концах имеется шаровидных вздутий, несущих стеригмы, расположенные радиально на поверхности всего вздутия. При малом увеличении микроскопа верхушка конидиеносца аспергилла, несущая цепочки конидий, внешне очень похожа на наконечник лейки, из отверстий которого льются струйки воды. Поэтому русское название аспергилла — леечный грибок. Однако точный перевод аспергилла будет «косматая голова». «Леечная» плесень у человека вызывает аспергилез – поражения легких, бронхов, роговицы глаз, ушей, мочеполовых и других органов. Род *Penicillium* («кистевик») имеет многоклеточные конидиеносцы, которые разветвляются в верхней части и заканчиваются стеригмами, расположенными в виде кисточек. От стеригм отшнуровываются конидии, одноклеточные, круглые или овальные, в массе часто зеленоватого цвета. Строение кисточки у различных видов пенициллов различно, оно положено в основу систематики рода. Более 30 видов рода *Penicillium* вызывают заболевания у людей, например, такие как *Penicillium glaucum*, *P. minutum*, *P. album* и др. Заболевания называются пенициллезом, поражаются кожа, ногти, уши, верхние дыхательные пути и легкие, а также возникает генерализованная инфекция с образованием внутренних очагов во внутренних органах. К роду *Saccharomyces* относятся дрожжи. Дрожжевые клетки имеют округлую, овальную или вытянутую форму, размером 8–10 мкм, двухконтурную оболочку. В цитоплазме включения в виде гранул гликогена, волютина, липидов. Размножение 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, сходный по строению с мицелием сумчатых грибов. В мицелии всегда присутствуют септы (перегородки), обычно с простыми порами, как у аскомицетов. Они размножаются только бесполом путем – конидиями, а половые (совершенные) стадии у них отсутствуют. Конидии дейтеромицетов разнообразны по строению. Они могут быть одноклеточными или с различным числом перегородок. По форме они шаровидные или эллипсоидные, но у некоторых видов известны нитевидные, звездчатые или спирально закрученные конидии. Окраска конидий светлая или темная, буро-коричневая. Ряд представителей несовершенных грибков являются возбудителями дерматомикозов: фавуса (*Achorion schonleinii*), трихофитии (*Trichophyton violaceum*, *T. mentagrophytes*), микроспории (*Microsporum lanosum*, *M. canis*), эпидермофитии (*Epidermophyton inguinale*).

Так же заболевания вызывают представители рода *Candida*. Они очень широко распространены в природе. Наиболее патогенными и чаще встречае-

мыми 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 фруктах, овощах и других пищевых продуктах, в сточных водах бань, в промывных водах столовых, буфетов, ресторанов и пр. Заражение людей может происходить экзогенно, из окружающей среды и эндогенно – грибками 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. В последнее время патогенные дейтеромицеты нередко вызывают генерализованные поражения. Тяжелые генерализованные микозы с летальным исходом у людей вызывают *Coccidioides immitis* (кокцидиомикоз), *Histoplasma capsulatum* (гистоплазмоз) и *Cryptococcus neoformans* (криптококкоз).

Так как грибки способны синтезировать токсины, то при попадании их в организм человека они оказывают токсическое действие, вызывая мицетизм либо микотоксикоз. Мицетизм – это отравление либо первично ядовитыми грибками при их случайном употреблении в пищу, либо съедобными грибками при нарушении технологий приготовления или хранения. Мицетизм возникает при действии токсических пептидов грибов на пищеварительную, нервную системы или менее специфичным поражением клеток и тканей тела. Микотоксикозы – это отравление ядовитыми веществами токсинообразующих грибков, паразитирующих на растениях (например, злаковые), которые используют для приготовления продуктов питания. Токсины этих грибков, сохраняют свои ядовитые свойства в период хранения урожая, а также при переработке растений. Употребление таких продуктов вызывает отравления у человека.

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 грибков

Для микроскопического исследования готовят как нативные (неокрашенные), так и окрашенные препараты. Нативные препараты готовят по типу «раздавленная 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, Цилю–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 эластичную плотная мембрана – пелликула, которая поддерживает определенную 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 порота (цитопрокт), сократительные вакуоли, микронуклеус.

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, из которых 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. Так, зрелая циста дизентерийной амебы имеет размер 8–14 мкм, округлую форму и четыре ядра, цисты лямблий овальные и четырехядерные, в них виден аксостиль со жгутиками, у балантидия цисты крупные 30×60 мкм, овальные с бобовидным ядром. Простейшие могут размножаться бесполом и половым путем. Размножение некоторых видов бывает весьма сложным, со сменой бесполого и полового циклов.

Простейшие относятся к подцарству *Protozoa* (от греч. *protos* – первый, *zoon* – животное), к царству животных – *Animalia*. Простейшие играют значительную роль в инфекционной патологии человека. 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 они с помощью псевдоподий, с помощью которых так же происходит захват и погружения в цитоплазму питательных веществ. Половой путь размножения у саркодовых отсутствует. При неблагоприятных условиях они образуют цисту. К этому подтипу относятся различные виды амёб. У человека паразитирует дизентерийная амёба (*Entamoeba histolytica*) (рис. 42), вызывающая амёбную дизентерию или амёбиаз.



Рис. 42. *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. 43).

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. 44). Балантидии подвижны, имеют многочисленные реснички, более тонкие и короткие, чем жгутики. Их жизненный цикл состоит из двух фаз – бесполой (размножение поперечным делением) и половой (конъюгация). После конъюгации балантидий инцистируется.

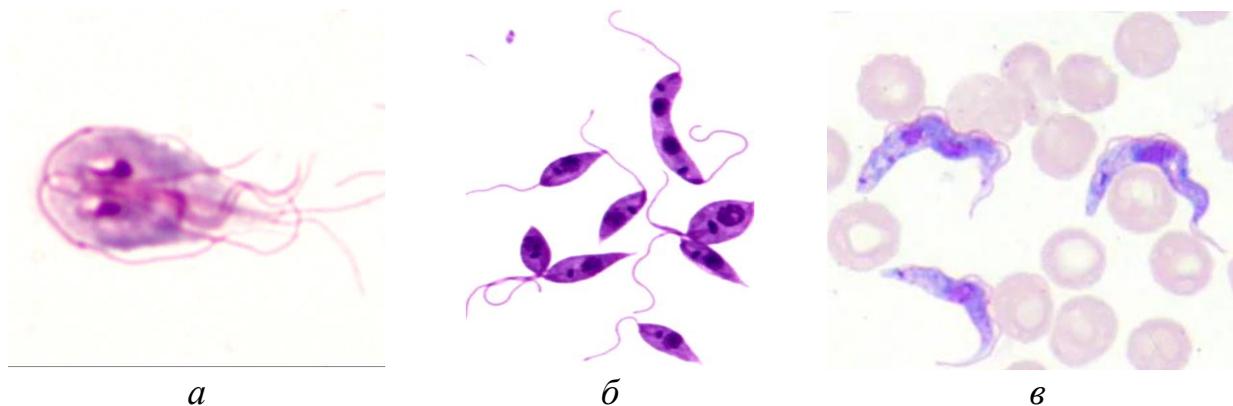


Рис. 43. Морфология жгутиконосцев:
 а – лямблии, б – лейшмании, в – трипаносомы (<https://medicine-live.ru>)

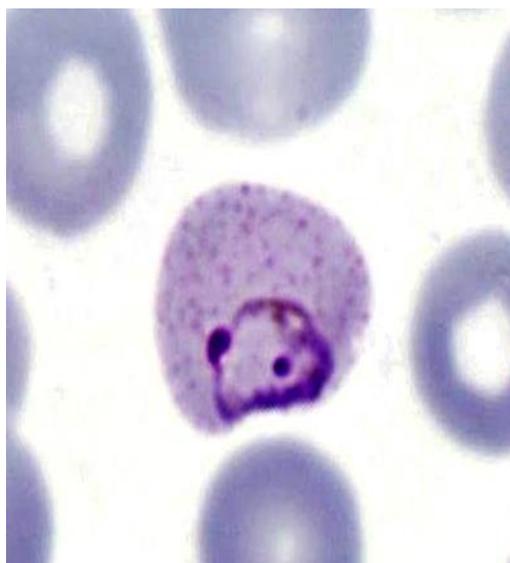


Рис. 44. *Balantidium coli* (<https://medicine-live.ru>)

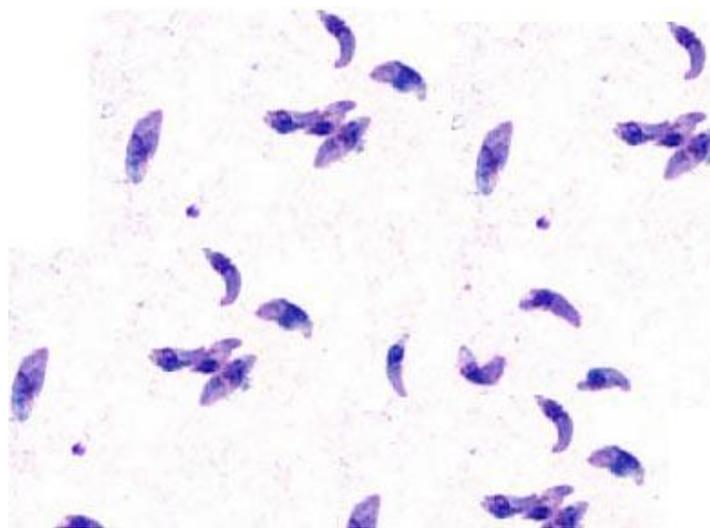
4. *Tun Apicomplexa*, класс *Sporozoa* (споровики). Класс состоит исключительно из паразитических простейших, многие споровики – внутриклеточные паразиты. Органеллы движения у большинства отсутствуют. Для них характерны как исключительно половой путь развития, так и чередование полового и бесполого поколений, обычно связанное с переменой хозяев. К классу относятся малярийные плазмодии (*Plasmodium vivax, malariae, ovale, fallciparum*), вызывающих малярию и токсоплазмы (*Toxoplasma gondii*), вызывающая токсоплазмоз (рис. 45).

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 ($\times 80$) или большое увеличение ($\times 400$) светлопольного или фазово-контрастного микроскопов. При исследовании простейших в окрашенном виде чаще всего используют окраску по Романов-

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



а



б

Рис. 45. Морфология споровиков: а – малярийный плазмодий (стадия шизонта), б – токсоплазмы (<https://medicine-live.ru>)

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Физиология микроорганизмов – это 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.

Микроорганизмы, как и все другие организмы, для существования и воспроизводства себе подобных нуждаются в постоянном обмене веществ с окружающей средой. Включение тех или иных соединений внешней среды в клеточные реакции любого характера обуславливает питание бактерий.

Превращения веществ в клетке (*метаболизм*) представлены противоположными, но взаимосвязанными процессами *катаболизма*, или энергетического метаболизма, и *анаболизма*, или пластического (конструктивного) метаболизма. В ходе ферментативных катаболических реакций происходит выделение энергии, которая аккумулируется в молекулах АТФ. В процессе анаболических реакций эта энергия расходуется на синтез органических соединений.

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 ею.

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. 46 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*. Пер-

меазы на внешней стороне клетки соединяются с субстратом, переносят его в клетку, где комплекс расщепляется с высвобождением субстрата (рис. 46 б). При облегченной диффузии в клетку проникают те молекулы, концентрация которых в цитоплазме ниже, чем в окружающей среде.

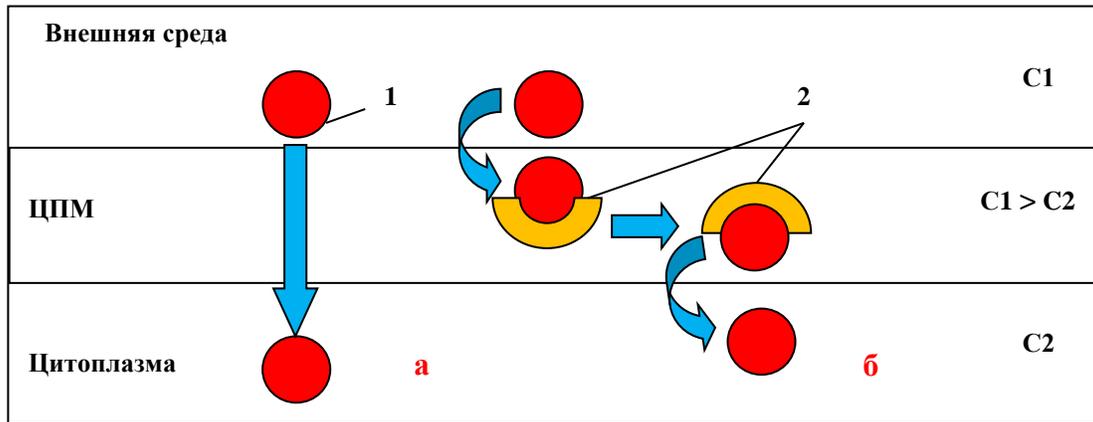


Рис. 46. Простая (а) и облегченная (б) диффузия: ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, С – концентрация веществ/ионов, транспортируемые вещества (1), белки – пермеазы (2)

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. 47 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. 47 б).

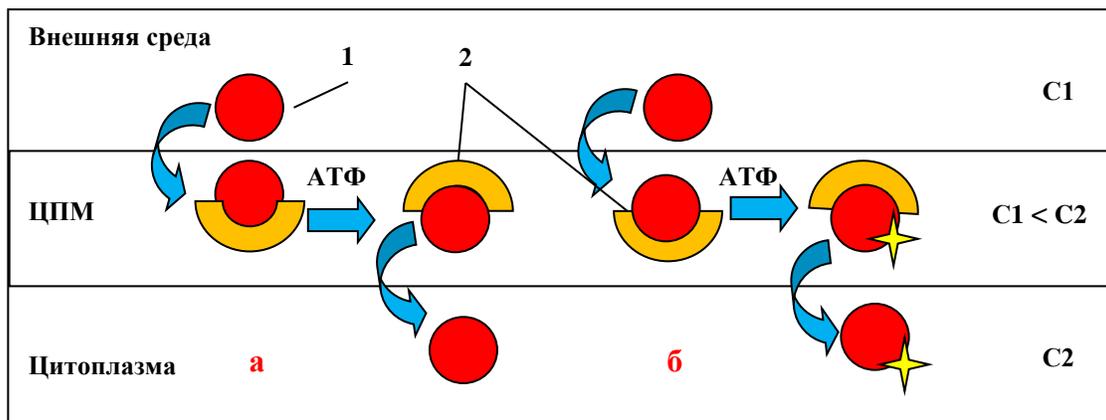


Рис. 47. Активный транспорт (а) и транслокация радикалов (б): ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, С – концентрация веществ/ионов, транспортируемые вещества (1), белки – пермеазы (2)

Бактериальная клетка выделяет продукты метаболизма, ферменты, токсины. Синтезируемые в бактериальных клетках соединения выходят из них тремя путями:

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

Микроорганизмы содержат те же химические вещества, что и клетки всех живых организмов.

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, как главным химическим компонентом, связаны основные процессы жизнедеятельности бактериальной клетки – питание, дыхание, рост и размножение.

Сухой остаток (10–20% массы клетки бактерий) представляет собой смесь органических и минеральных соединений (рис. 48). Органические компоненты химического состава бактерий представляют белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, витамины и др.

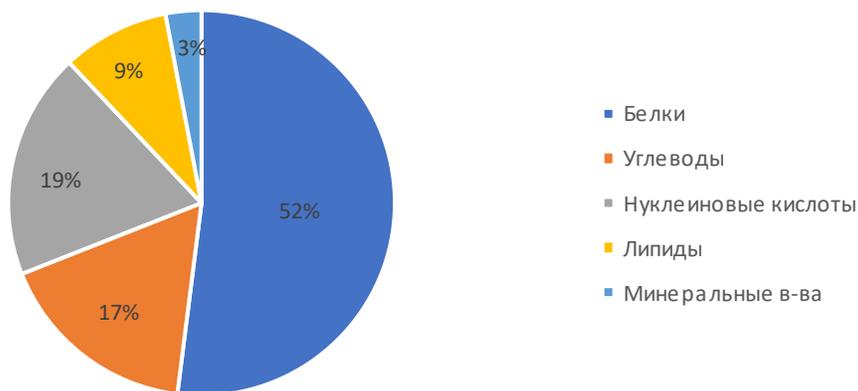


Рис. 48. Химический состав сухого остатка бактериальной клетки

Белки составляют более 50% сухого остатка клетки микроорганизмов. Белки 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, которые бактериальная клетка использует как источник углерода. Сложные белки в зависимости от характера соединений небелковой природы, входящих в состав белков делятся на нуклеопротеины, хромопротеины, липопротеины и др. Сложные белки наиболее важны для жизнедеятельности микроорганизмов.

Нуклеиновые кислоты представлены двумя типами – ДНК и РНК. Нуклеиновые кислоты в микробной клетке выполняют те же функции, что и в клетках животного происхождения. 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. Из них состоят многие структурные компоненты клетки (клеточная оболочка, капсула и другие). Углеводы входят также в состав тейхоевых кислот грамположительных бактерий. 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 в клетке. 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 некоторыми другими металлами и неметаллами. Большинство из них

содержится в виде примесей в макроэлементах или может попадать в питательные среды из стеклянной посуды, воды или воздуха. Некоторые бактерии могут обходиться и без микроэлементов.

Одним из самых необходимым химическим элементом для бактерий является углерод, так как он составляет основу белков, углеводов, жирных кислот и т.д. По источнику углерода бактерии делятся на две большие группы: *автотрофы* и *гетеротрофы* (рис. 49).

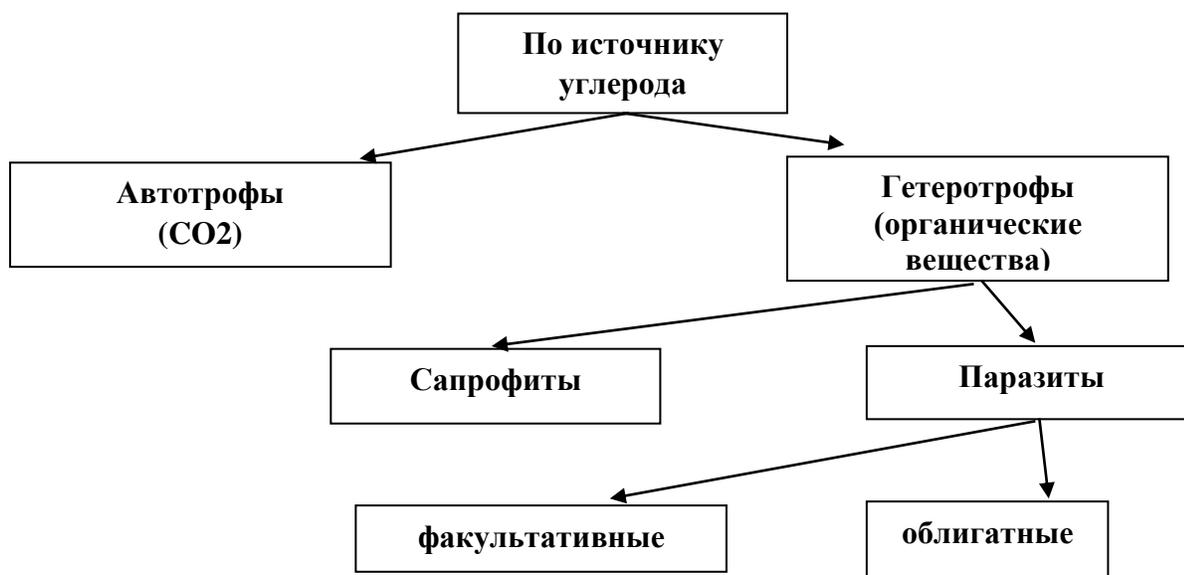


Рис. 49. Классификация бактерий по источнику углерода

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). При культивировании автотрофов необходимо обеспечить клетки углекислотой, так как концентрация CO_2 в воздухе не превышает 0,03%, и ее поступление в среду за счет диффузии недостаточно для роста микроорганизмов. В питательные среды для культивирования автотрофов вносят карбонат кальция (CaCO_3) или бикарбонат натрия (NaHCO_3). Иногда через питательную среду продувают воздух, обогащенный 1–5% CO_2 . *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* (паразитов), способных утилизировать только продукты метаболизма внутри живой клетки. Паразитизм может быть факультативным и абсолютным или облигатным.

Для роста микроорганизмов так же необходим азот, который входит в состав органических соединений или солей в разной степени восстановления.

Это могут быть соли аммония, нитраты или отдельные аминокислоты. Для удовлетворения потребности бактерий в азоте используют также 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. 50).

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.

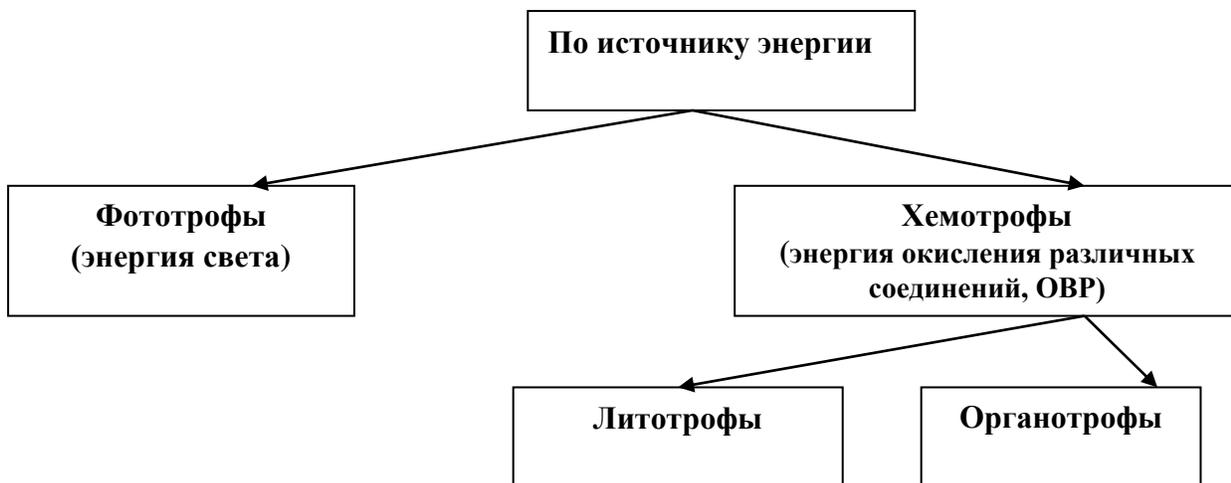


Рис. 50. Классификация бактерий по источнику энергии

Дыхание бактерий

Дыхание бактерий (энергетический метаболизм) – это цепь последовательных окислительно-восстановительных реакций, сопровождающиеся 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. 51):

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, синглетный кислород) губительны для самих же бактерий из-за отсутствия у них ферментов, разрушающих эти токсические продукты (каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы). К строгим анаэробам относятся *клостридии столбняка, ботулизма, газовой гангрены*, некоторые *бактероиды*. Среди множества патогенных бактерий их количество невелико.

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

4. Микроаэрофильные бактерии хорошо растут при сниженном парциальном давлении кислорода, но при повышенном содержании CO_2 (представители рода *Brucella*).

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

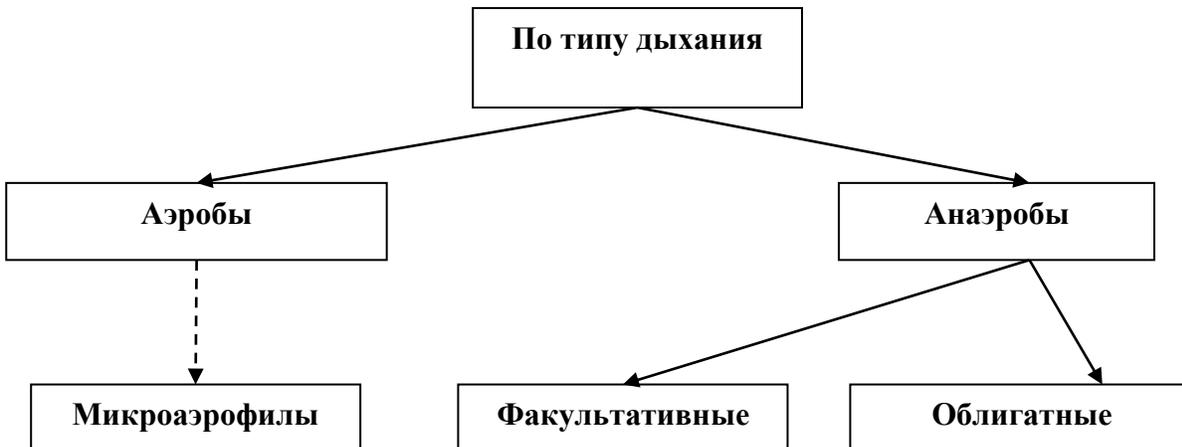


Рис. 51. Разделение бактерий по типу дыхания

В процессе дыхания образуется огромное количество энергии (АТФ), которая используется для синтеза органических веществ, передвижения, поддержания осмотического давления и др. Образование АТФ у аэробов и анаэробов осуществляется разными путями. 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 массы отдельной клетки в результате синтеза клеточного материала. Во время роста размеры клетки увеличиваются. 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. Каждая дочерняя клетка получает копию материнской ДНК. Процесс деления микробной клетки считается законченным, когда цитоплазма дочерних клеток разделена перегородкой или перетяжкой (рис. 52).

Деление бактерий может происходить в различных плоскостях с образованием многообразных сочетаний клеток: цепочки стрептококков, парные соединения (диплококки), тетрады кокков, пачки (сарцина), гроздь (стафилококки). Палочковидные и извитые формы делятся поперечно, только в одной плоскости. У некоторых микроорганизмов размножение происходит путем образования почки, которая по величине меньше исходной клетки.

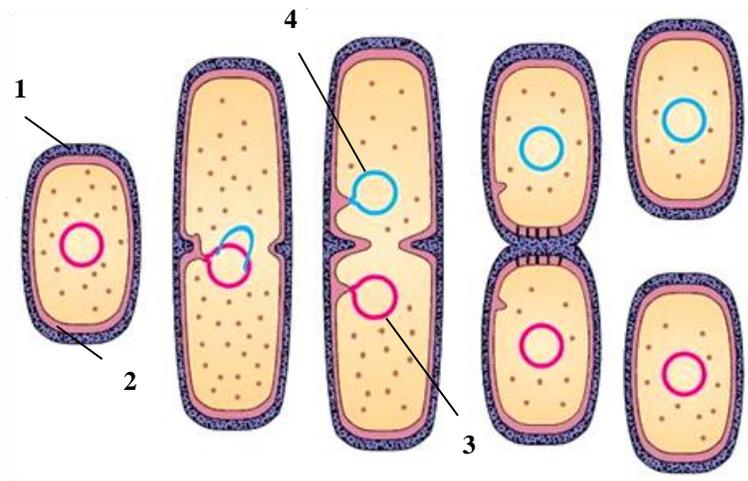


Рис. 52. Схема бинарного деления бактериальной клетки: 1 – клеточная стенка; 2 – цитоплазматическая мембрана; 3, 4 – хромосомы (<https://studfile.net>)

Скорость размножения бактерий велика, что обусловлено интенсивностью их обмена. У большинства бактерий каждая клетка делится в течение 15–30 мин. Есть виды бактерий, которые делятся медленно, 1 раз в 24 ч, например, микобактерии туберкулеза. Для каждого вида бактерий скорость размножения может быть различной и зависит от возраста культуры, питательной среды, температуры, значения рН и многих других факторов

Питательные среды

Для культивирования бактерий в лабораторных или производственных условиях используют среды, которые должны удовлетворять потребности бактерий в питательных веществах, иметь адекватное значение величины рН, изотоничность и быть стерильными, а по возможности, и прозрачными. Специфичность большинства питательных сред определяют соединения углерода и азота, но так как конструктивные и энергетические процессы микроорганизмов разнообразны, неодинаковы и их потребности в питательных веществах.

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. По-

этому 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, мясо-пептонные 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 состав этих сред, наряду с другими солями, входят цитрат натрия и индикатор.

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 мясо-пептонный 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, мясо-пептонные 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. Для уплотнения сред используют, так же, силикогель и каррагенан, получаемый из красных морских водорослей. Пластины геля, пропитанные питательной средой, используют для культивирования бактерий–автотрофов. *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 рН и стерилизуют. Применение сухих питательных сред облегчает работу по приготовлению сложных сред в лабораториях.

По целевому назначению питательные среды делят на несколько групп. *Основные* или *универсальные среды*, например, мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный бульон (МПБ); на них могут расти многие виды неприхотливых (нетребовательных) 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 разных видов 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. Такими веществами могут быть анилиновые красители, желчь, хлористый натрий в концентрации выше 1%. 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. 53). Существуют среды для определения гликолитической активности бактерий, в их состав входят один (среды Гисса) или два (среды Ресселя) сахара. Протеолитическую активность бактерий изучают на МПБ, 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. 54). Хромогенные питательные среды подходят для культивирования, дифференциации и селекции микроорганизмов.

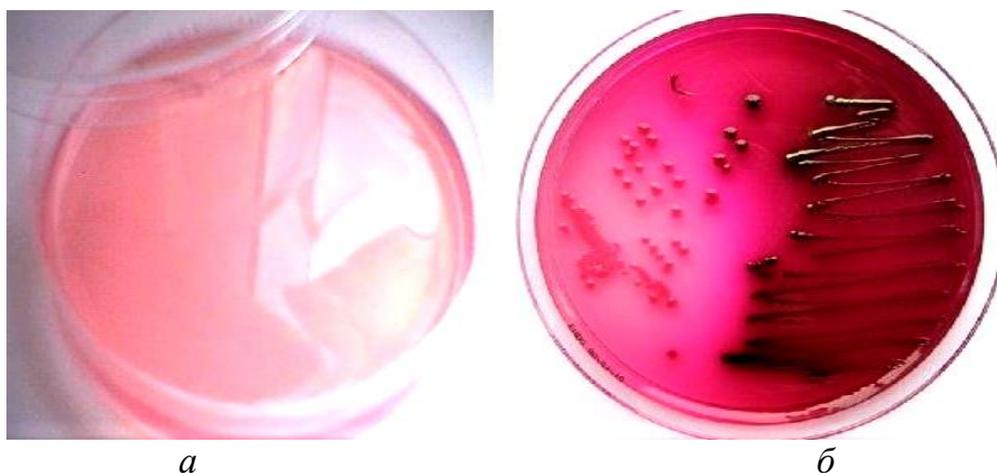
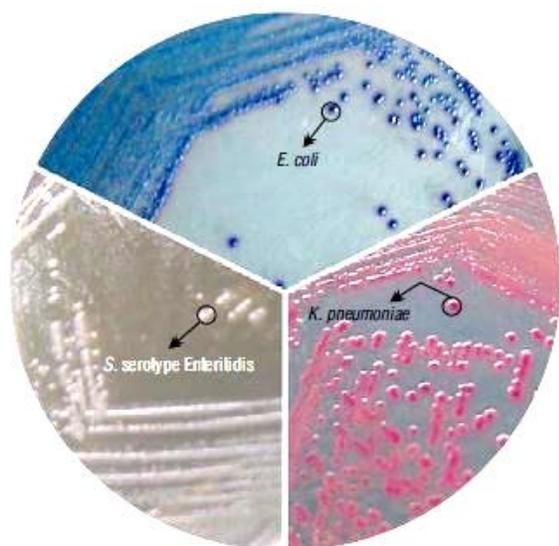


Рис. 53. Дифференциально-диагностическая среда Эндо:
а – среда без посева; б – среда с посевом



M1300 – HiCrome Coliform Agar w/ SLS

Рис. 54. Хромогенные среды.
Среда M 1300 – HiCromt Coliform
Agar w/SLS
(<https://bio-media.ru>)

Способность бактерий к выделению токсинов и ферментов агрессии исследуют на кровяных агарах, желточно-солевом агаре, бессывороточном фосфатном агаре и других подобных средах.

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.

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. Поддержание нейтрального значения рН, особенно важно для кислотопродуцирующих бактерий. В процессе промышленного культивирования бактерий в больших объемах, рН среды регулируется автоматически добавлением растворов бикарбоната натрия или щелочей.

Газовый состав среды также важен для бактерий. Значительная часть из них нуждается в постоянном притоке молекулярного кислорода. Такие микроорганизмы объединены в группу облигатных аэробов. Меньшая часть бактерий – облигатные анаэробы – способны развиваться только в отсутствие кислорода. Однако, большинство бактерий – факультативные анаэробы, они растут как в присутствии кислорода, так и без него. 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 с культурой, а для культивирования анаэробов – создание бескислородных условий. Для этого бактерии засевают уколом в столбик плотной питательной среды, помещают посевы в специальные приборы – анаэростаты, где газовая фаза представлена инертным газом или создан вакуум, а кислород из среды удаляют с помощью кипячения или химических методов (рис. 55). Для выделения чистых культур анаэробов используют специальную среду Китта–Тароцци, а также культивирование в стеклянных трубках по методу Виньяль–Вейона.



Рис. 55. Оборудование для культивирования анаэробных бактерий:
анаэростат I-CUBE (а) и анаэростат GasPak 100 (б)

Рост и размножение микроорганизмов происходит при благоприятной температуре. Поэтому культивирование их осуществляют в специальных

шкафах – термостатах или термостатированных комнатах, где поддерживается оптимальная заданная 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, когда при росте в жидких средах в закрытых сосудах определенного объема микроорганизмы находятся в закрытой системе, называют *периодическими*. Рост бактерий в этом случае имеет закономерное развитие, характеризующееся кривой роста (рис. 56). На этой кривой можно выделить 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. Экспотенциальная (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*.

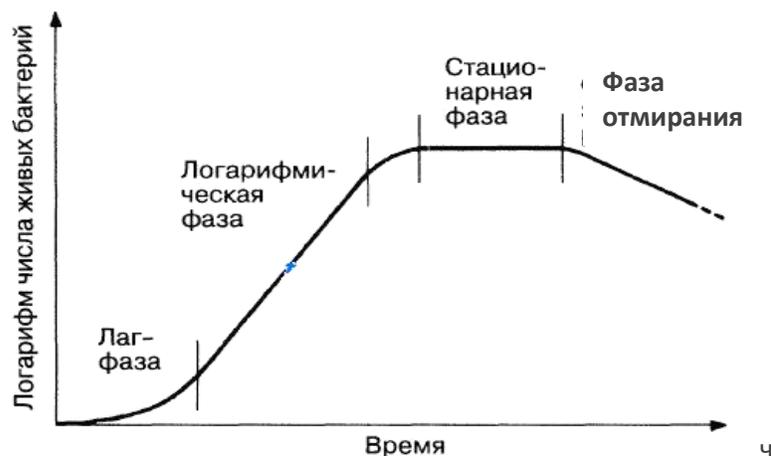


Рис. 56. Кривая роста бактерий в жидкой питательной среде.
Фазы размножения бактерий

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 – *хемотах* и *турбидостах*, где необходимый объем питательной среды поступает автоматически, в зависимости от концентрации бактериальных клеток (рис. 57).

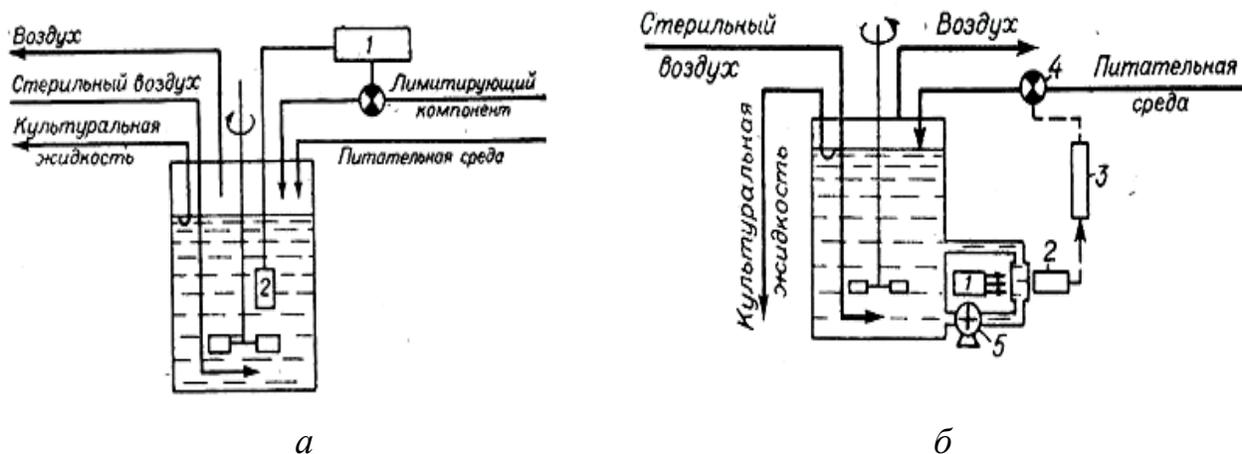


Рис. 57. Принципиальная схема хемотата (а) и турбидостата (б)

Изотоничность питательной среды зависит от содержания неорганических солей. Для большинства бактерий изотоничной считается среда, концентрация натрия хлорида в которой составляет 0,5–0,6%.

Время культивирования бактерий зависит от времени очередного деления клеток данной популяции. Время генерации большинства патогенных бактерий составляют 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 вырастают за 8–10 сут, микобактерии туберкулеза – за 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. 58).

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, кратерообразный и т.д.;
- прозрачность – тусклая, матовая, блестящая, прозрачная, мучнистая;

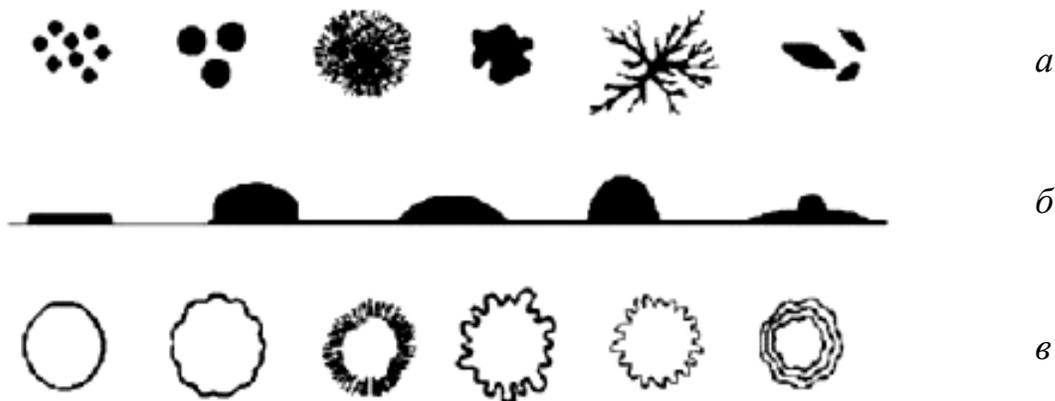


Рис. 58. Характер роста бактерий на плотной питательной среде: форма колонии (а); поверхность (б); характеристика края колоний (в) (<https://lifelib.info>)

- 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. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если микроорганизмы выделяют газ. *Донные колонии* имеют обычно вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну.

Колонии могут изменяться с возрастом, их свойства зависят от состава среды, температуры культивирования.

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.

Рост микроорганизмов на жидких питательных средах учитывают, используя суточные культуры, выращенные в стационарных условиях.

В жидких питательных средах при росте микроорганизмов наблюдается помутнение среды, образование пленки или осадка (рис. 59).

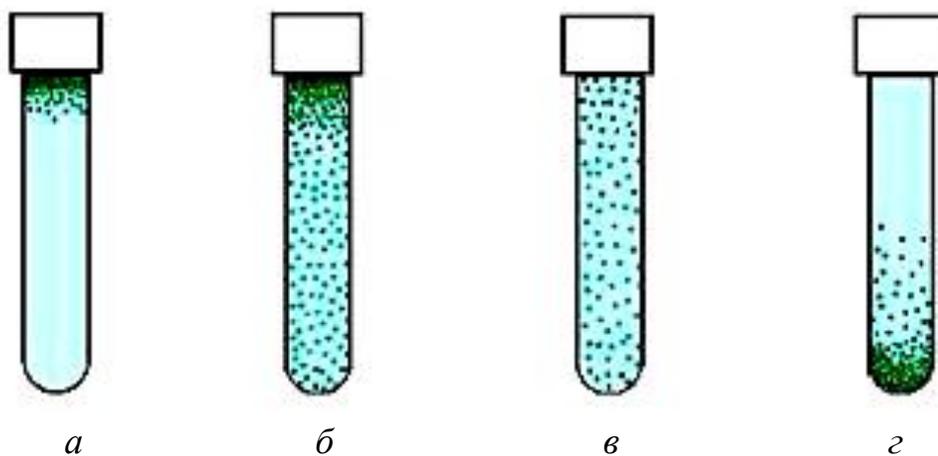


Рис. 59. Характер роста бактерий в МПБ: поверхностный рост (а); диффузное помутнение (б и в); придонный рост (г) (<http://old.gsu.by>)

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 (укусноэтилового, укусноамилового и др.), индола, меркаптана, сероводорода, скатола, аммиака, масляной кислоты.

Способность образовывать пигменты присуща многим видам микроорганизмов. Химическая природа пигментов разнообразна: каротиноиды, антоцианы, меланины. Если пигмент не растворим в воде, окрашивается только культуральный налет, если же он растворим, окрашивается и питательная среда. Считается, что пигменты защищают бактерии от губительного действия солнечных лучей, поэтому в воздухе так много пигментированных бактерий, кроме того, пигменты участвуют в обмене веществ этих микроорганизмов.

В природе существуют, так называемые, фосфоресцирующие 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 осуществляется 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 бактерии*.

Ферменты – это биологические катализаторы белковой природы. Микробная клетка, подобно клеткам высших организмов, оснащена достаточно активным ферментативным аппаратом. Ферменты микроорганизмов облада-

ют 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. Лигаза (синтетаза) – 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 исключительно 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. *Индуцибельные ферменты* синтезируются только в ответ на присутствие в среде необходимого для клетки субстрата-индуктора. Индуцированный синтез ферментов идет, пока в среде присутствует индуктор. При этом ферменты синтезируются заново во всех клетках одновременно. 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 (стери-

чески) 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, связывающиеся с аллостерическим центром, называют аллостерическими эффекторами. Они влияют через аллостерический центр 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. Поскольку практически все реакции в клетке катализируются ферментами, регуляция метаболизма сводится к регуляции интенсивности ферментативных реакций.

У возбудителей инфекционных заболеваний имеются *ферменты патогенности*, они разрушают 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 некоторые другие ферменты. Гиалуронидаза стрептококков, например, расщепляет гиалуроновую кислоту в мембранах клеток соединительных тканей макроорганизма, что способствует распространению возбудителей и их токсинов в организме, обуславливая высокую инвазивность этих бактерий. 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 дифференциально-диагностические среды, в состав которых входят определенные субстраты – сахара или белки.

При исследовании сахаролитической активности бактерий распространены моносубстратные дифференциально-диагностические среды Гисса (пестрый ряд Гисса), лактозосодержащие среды Эндо, Левина, Плоскирева,

дисубстратные среды Ресселя (рис. 60), 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. 61).

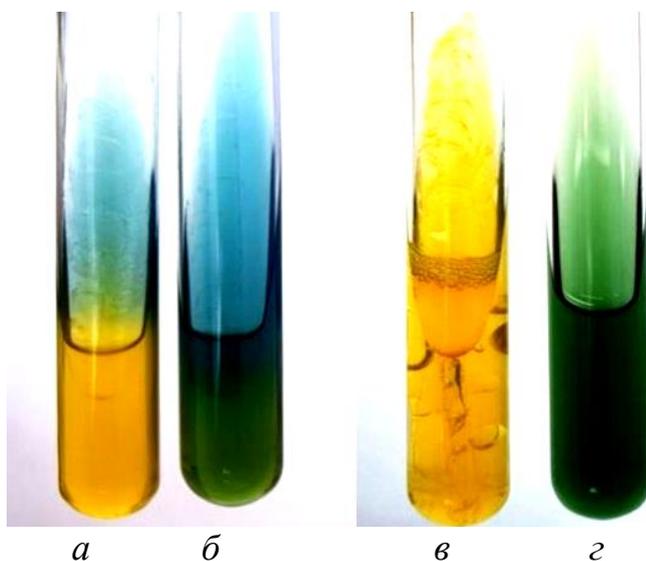


Рис. 60. Идентификация бактерий по гликолитическим свойствам. Среда Ресселя I: *S. flexneri* (а); *A. faecalis* (б); *E. coli* (в); контроль (г)

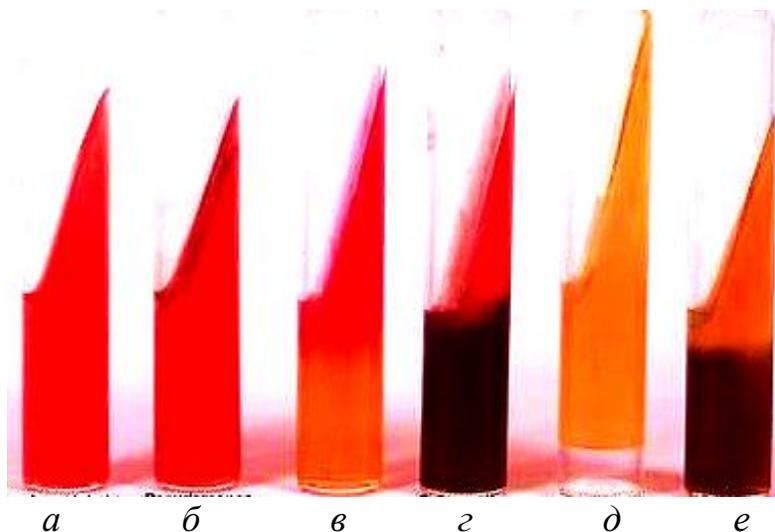


Рис. 61. Идентификация бактерий по гликолитическим и протеолитическим свойствам. Среда Клиглера: контроль (а); *P. aeruginosa* (б); *S. sonnei* (в); *S. typhi* (г); *E. coli* (д); *P. mirabilis* (е)

Протеолитические ферменты бактерий определяются по выделению индола, сероводорода, расщеплению некоторых аминокислот, например, фенилаланина, лизина, цистина. Протеолитические ферменты способны изме-

нять (разжижать) желатин, причем, разные виды бактерий по-разному изменяют «столбик» желатина в пробирке с посевом микроорганизма (рис. 62). Так, при росте холерного вибриона «столбик» желатина принимает форму гвоздя, при росте стафилококка – чулка, при росте синегнойной палочки наблюдается послойное разжижение среды.



Рис. 62. Действие протеолитических ферментов. Разжижение желатина (<http://biologylib.ru>)

В практических 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. 63).



Рис. 63. Тест-система для энтеробактерий – API. Верхний планшет – все тесты положительны, 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 любой 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. 64 А). Петлю стерилизуют и проводят серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым (рис. 64 Б). Затем петлю вновь стерилизуют и штрихи наносят в направлении В (рис. 64), а после очередной стерилизации – в направлении Г (рис. 64). Чашки помещают в термостат и через определенное время учитывают результаты. Обычно на штрихах А и Б вырастает большое число колоний (иногда сплошной рост), тогда как на штрихах В и Г формируются изолированные колонии.

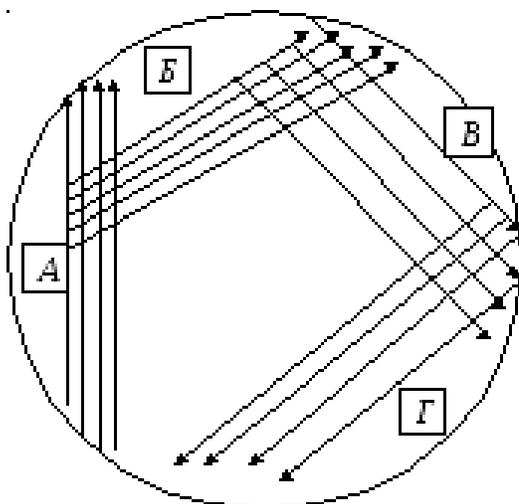


Рис. 64. Схема рассева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

2. Метод Коха («пластинчатые разводки») – последовательное разведение исследуемого материала в расплавленном агаре (температура 48–50 °С), с последующим разливом 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/элективную среду с целью получения изолированных колоний.

II. Изолированные колонии. Изучение «подозрительных» колоний (по культуральным свойствам). Микроскопия окрашенного мазка (определение морфологических 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 – анаэростатов с посевами.

Химические методы предполагают использование в замкнутых сосудах химических веществ – адсобентов кислорода (щелочной раствор пирагаллола, гидросульфит натрия), редуцентов кислорода (тиогликат натрия, аскорбиновая кислота, цистин и др.). Анаэробные условия можно создать при помощи газогенерирующих систем в анаэростатах: 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 рассеивают штрихом по поверхности плотной питательной среды, помещают в анаэробные условия (например, анаэростат) 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.

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. *capsa* – футляр). Капсид вместе с заключенной в нем нуклеиновой кислотой называют *нуклеокапсидом*. Морфологическими субъединицами капсида, видимыми в электронный микроскоп, являются капсомеры – белковые субъединицы, состоящие из одной или нескольких молекул белка. Существуют три типа строения капсидов, основанных на расположении морфологических субъединиц (рис. 65):

- 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. Икосаэдр имеет 20 граней (каждая представляет равносторонний треугольник), 12 вершин. 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 определенную форму, которую можно наблюдать в электронном микроскопе. Когда капсомеры расположены в виде многогранника они при-

дают вирусу сферическую форму. Поэтому вирусы с кубическим типом симметрии в электронном микроскопе имеют округлую форму. Спиральный тип симметрии наблюдают у крупных вирусов. Капсомеры придают 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.

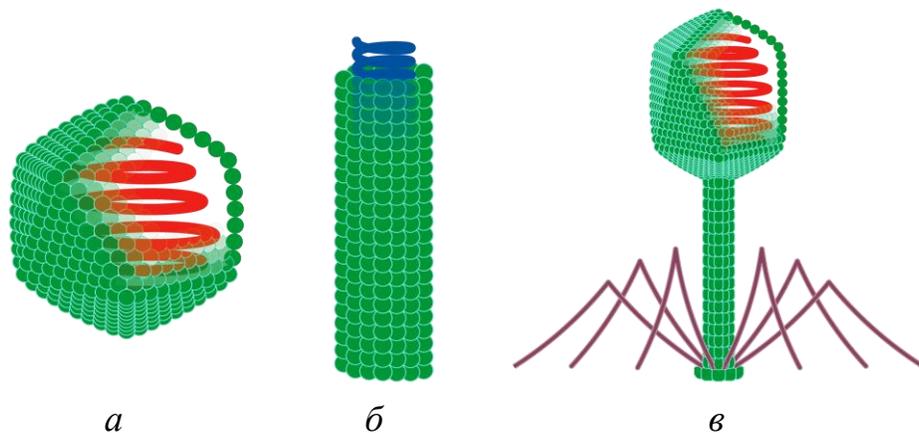


Рис. 65. Типы строения вирусных капсидов: икосаэдрический (а), спиральный (б) и смешанный (в). Цитруется по «Введение в вирусы» (<https://ru.khanacademy.org/science/biology/biology-of-viruses/virus-biology/a/intro-to-viruses?modal=1>)

По строению вирусы принято подразделять на простые и сложные. *Просто устроенные* вирусы (голые), такие как пикорна-, парвовирусы состоят из нуклеокапсида, *сложноустроенные* вирусы (одетые) имеют еще дополнительную внешнюю оболочку – *суперкапсид* или пеплос (производное мембранных структур клетки-хозяина). Форма таких вирионов приближается к сферической. Суперкапсидные белки формируют морфологические субъединицы (пепломеры), которые в электронном микроскопе выглядят в виде шипов (тогавирус, коронавирусы, ортомиксовирус и др.) (рис. 66).

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

По химическому составу и потенциальной патогенности вирусы называют инфекционными нуклеопротеидами. 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. Наиболее простой вирусный геном кодирует 3–4 белка, наиболее сложный – более 50 полипептидов.

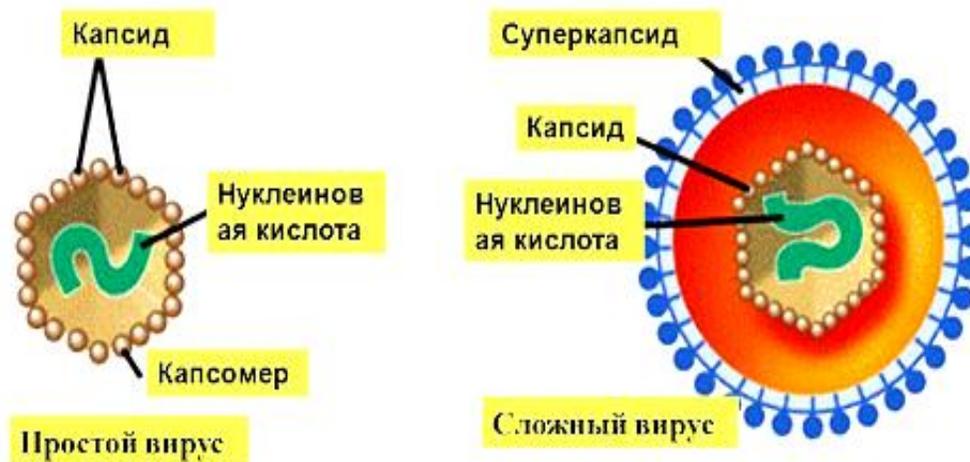


Рис. 66. Строение простых и сложных вирусов (<https://studopedia.org>)

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 (плюс-нить РНК, +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 (минус-нить РНК, –РНК). Минус-нить РНК этих вирусов выполняет только наследственную функцию, не обладает матричной активностью, поэтому до начала трансляции на ней должна быть синтезирована положительная 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. Нуклеиновые кислоты некоторых вирусов (вирусы герпеса и др.) могут находиться в цитоплазме инфицированных клеток, напоминая плазмиды.

Вирусные белки принято разделять на две группы: структурные и неструктурные (функциональные). Структурными белками (VP) являются все те белки, которые формируют вириона, количество их у разных вирусов различно, зависит от степени организации и размеров вируса. Их подразделяют на (рис. 67):

Капсидные белки:

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

Суперкапсидные белки:

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

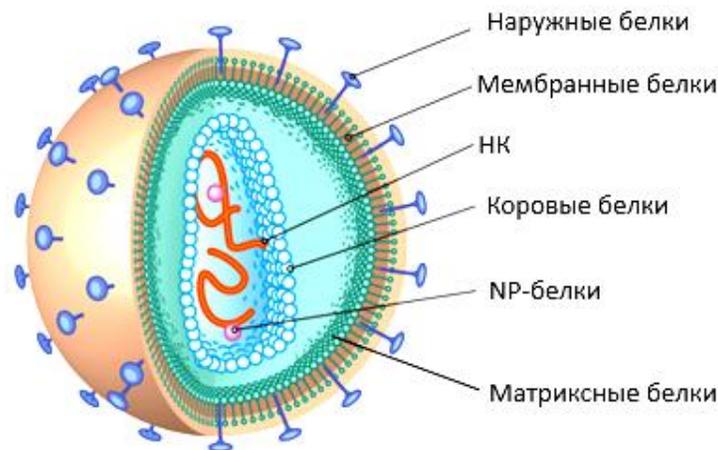


Рис. 67. Структурные белки вирусов

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. Большинство липидсодержащих вирусов чувствительно к эфиру и детергентам

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). Данный комитет входит в состав Отделения вирусологии Международного союза микробиологических обществ. МКТВ устанавливает принципы и правила для классификации существующих вирусов и для признания новых вирусных таксонов. Сведения о современной таксономии вирусов излагаются в периодических Докладах и релизах 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 состоит более чем из одного слова, и 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, вызывают заболевания у человека. Количество патогенных вирусов постоянно возрастает.

Согласно классификации, базовой таксономической единицей в вирусологии является вид, хотя он определен не у всех известных вирусов. При идентификации вирусов существенное значение имеет их внутривидовая дифференциация на варианты. Ведущими среди них являются генетические варианты (*генотипы* вируса) и серологические (антигенные) варианты или вирусные *серотипы*. Для задач медицинской вирусологии такое подразделение особенно необходимо, так как разные варианты вируса многократно отличаются по своей патогенности. *Серотип* вируса определяется в реакциях со специфическими антителами – реакции нейтрализации (РН), иммуноферментном анализе (ИФА), реакции иммунной флюоресценции (РИФ), реакции торможения гемагглютинации (РТГА). *Генотип* (геногруппа) вируса устанавливается методами молекулярной гибридизации (МГ), полимеразной цепной реакции (ПЦР), методами определения последовательности (секвенирования)

нуклеиновых кислот. Международный комитет по таксономии не устанавливает и не проводит внутривидовое разделение вирусов на варианты. Такое деление является задачей рабочих групп специалистов-вирусологов.

Кроме обычных вирусов, известны и, так называемые, неканонические вирусы: *прионы* и *вириоды*. *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.). *Вириоды* – 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 цитоцидный 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 существовании.

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. 68), различающихся у разных вирусов:

- 1) адсорбция вирионов на клетке;
- 2) проникновение вирусов в клетку;
- 3) депротенинизация 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. Число клеточных рецепторов может достигать до 10^4 – 10^5 молекул на мембране одной клетки. Взаимодействие обеспечивается в первую очередь комплементарностью между вирусным и клеточным рецептором, а также силами неспецифического межмолекулярного взаимодействия (разностью зарядов, водородными или гидрофобными связями). Первоначально ад-

сорбция 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 (греч. *trōpos* – поворот, направление), то есть способность избирательно поражать определенные клетки. Вирусы, репродуцирующиеся в клетках печени, называются гепатотропными, в клетках нервной системы – нейротропными и т.д.

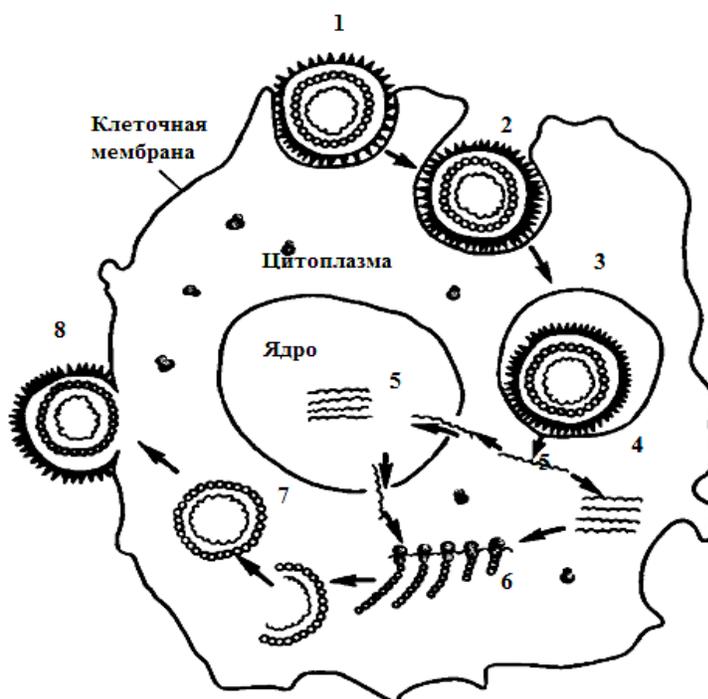


Рис. 68. Репродукция вирусов в клетке: адсорбция вируса на клетке (1), проникновение вируса в клетку эндоцитозом (2), депротенизация (3), репликация вирусной нуклеиновой кислоты (4), синтез вирусных белков на клеточных рибосомах (6), сборка вирионов (7), выход вируса из клетки почкованием (8) (<https://students-library.com>)

Проникновение вируса в клетку происходит либо путем виропексиса (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), тогавирусы. 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 вирусспецифических 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 суперкапсиды. Второй тип – почкование, присущ вирусам, имеющим суперкапсид. Сначала синтезированный нуклеокапсид транспортируется к клеточным мембранам, в которые уже встроены вирусспецифические 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 *виrogenия*. *Виrogenия* 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 непосред-

ственно в молекулярную нуклеиновую кислоту (*гепаднавирусы, 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 только благодаря присутствию в составе вирионов ретровирусов специального фермента – *обратной транскриптазы* (ревертазы). Встроенная в состав хромосомы клетки вирусная ДНК называется *провирусом*. 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 накожное, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное и внутримозговое заражение.

При первичном заражении животные могут не заболеть, поэтому через 5–7 дней внешне здоровых животных умервщляют, а из их органов готовят суспензии, которыми заражают следующие партии животных. Эти 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 и большинство известных вирусов обладают способностью размножаться в курином эмбрионе. Культивирование вируса в курином эмбрионе широко используется при промышленном культивировании. 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 и поэтому заражение развивающегося куриного эмбриона осуществляют внесением его на хорионаллантоисную оболочку, в аллантоисную и амниотическую полости, желточный мешок, тело эмбриона (рис. 69).

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.). Большое распространение получили культуры клеток из эмбриональных и злокачественно перерожденных тканей, обладающих более активной по

сравнению с нормальными клетками взрослого организма способностью к росту и размножению.



Рис. 69. 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 применяются в биотехнологии с целью получения большого количества вирусной биомассы в промышленных биореакторах для приготовления вакцин или вирусных диагностикумов;
- 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 неизменный 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 других болезней);

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 (получены от пациентки, умершей в 1956 г.), *Hep-2* из клеток карциномы гортани, *RD* из клеток рабдомиосаркомы и др. Широко используются перевиваемые клеточные линии животного происхождения (клетки почек золотистого сирийского хомячка – *BHK*, клетки почек африканских зеленых мартышек – *Vero* и многие другие). Дополнительным источником перевиваемых клеточных линий могут стать клетки первичных культур, которые подверглись трансформации в условиях *in vitro*.

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. После этого они останавливают свое размножение (контактное торможение). 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 при размножении в клетке вирусов. Основой всех питательных сред является сбалансированный буферный солевой раствор (например, раствор Хенкса с рН 6,8–7,2). В него добавляют факторы роста (аминокислоты, витамины) и антибиотики для предупреждения бактериальной или грибковой контаминации. Широко используются стандартные синтетические среды, такие как среда 199, среда Игла, Дульбекко и др.

Для выращивания вирусов можно использовать культуры клеток любого типа. Доза заражения зависит от цели и назначения опыта. Клеточные культуры используют для выделения новых малоизученных вирусов, когда обычным методом (заражение животных, куриных эмбрионов) невозможно установить вирусную природу возбудителя. 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. Включения различаются по величине, форме, численности. 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. Они видны невооруженным глазом как светлые пятна на фоне прижизненно окрашенных нейтральным красным клеток. Одна бляшка соответствует потомству одного вириона. Негативные колонии разных вирусов отличаются по размеру, форме. Бляшкообразование используют для дифференциации, селекции вирусов, а также для определения их концентрации в исследуемом материале. Титр вируса, установленный этим методом, выражают числом бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл.

4. «Цветная» проба (проба Солка). Если вирусы не размножаются в культуре клеток, то живые клетки в процессе своего метаболизма выделяют кислые продукты, что ведет к изменению рН среды и цвета индикатора фенолового красного на желтый. При продукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается, клетки гибнут, и среда сохраняет свой первоначальный (красный) цвет. Таким образом, красный цвет среды указывает на наличие вируса и прекращение жизнедеятельности клеток.

5. Гемадсорбция – способность культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты определенных видов животных и птиц. Гемадсорбция проявляется скоплением в виде гроздей эритроцитов, адсорбированных на инфицированных вирусом клетках.

6. 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. Их выявляют в воде, почве, выделениях человека и животных, пищевых продуктах и т.д. Устойчивость фагов позволяет им длительное время сохраняться на объектах окружающей среды. При инфекциях бактериофаги выделяются из организма с испражнениями, мочой, слюной одновременно с бактериальными возбудителями заболеваний и являются важными эпидемиологическими маркерами инфекции. Считается, что бактериофаги представляют собой наиболее многочисленную и филогенетически древнюю группу вирусов. Рассчитанное количество фаговых частиц на Земле (10^{30} – 10^{31}) превышает общее число любых других организмов, включая бактерии. Фаги играют одну из основных ролей в поддержании баланса в биосфере планеты, регулируя численность микробных клеток. Бактериофаги обеспечивают перенос генов между бактериями, что приводит к ускоренной эволюции бактериальной популяции и селекции приспособленных микроорганизмов. В них видят способ борьбы с устойчивыми к антибиотикам бактериями, с одной стороны, с другой – с ними приходится бороться там, где используют бактерии в качестве продуцентов полезных продуктов, включая молочнокислые.

Бактериофаги относятся к 19 семействам. Представители 9 из них инфицируют бактерий, 9 – архебактерий, представители еще 1 семейства – и тех, и других. 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.

При изучении морфологии с помощью электронной микроскопии большинство фаговых частиц напоминают по форме сперматозоид или головастик. 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. 70).

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%.

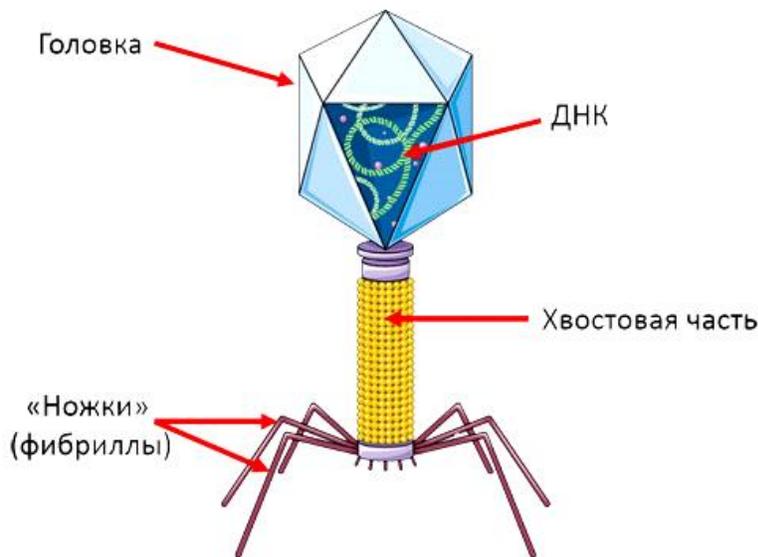


Рис. 70. Строение бактериофага (<https://nikafarm.ru>)

Хорошо изучены Т-фаги кишечной палочки (англ. *type* – типовые), включающие 7 представителей (Т1-Т7). 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*) и лизогенной конверсией бактериальной клетки.

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 фибрилы базальной пластинки), которые взаимодействуют с рецепторами оболочки бактериальной клетки (липополисахарид, тейхоевые кислоты, белки). Отдельные фаги адсорбируются на пилях бактерий. Прочность связывания зависит от рН среды, температуры, ионной силы. 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. Дополнительной причиной конверсии может быть активация молчащих бактериальных генов, если гены профага выступают в роли промоторов. Лизогенная конверсия характерна для многих видов бактерий. Она сопровождается выраженным изменением их культуральных, биохимических, антигенных или других свойств. В клинических ситуациях особую важность приобретает появление в результате трансдукции антибиотикоустойчивых или высоковирулентных штаммов бактерий. В частности, передача *tox*-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. Идентификацию выполняют при помощи фагов, специфичных к отдельным видам (бактериофаги шигелл Флекснера, Зонне) или вариантам бактерий (бактериофаги к биоварам холерного вибриона). С помощью типоспецифических фагов проводят фаготипирование, т.е. устанавливают принадлежность неизвестной выделенной культуры бактерии к определенному фаготипу. Фаготип является важным эпидемиологическим маркером выделенного штамма возбудителя, так как один и тот же вид бактерий может содержать десятки фаготипов. 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).

Фаги применяют для лечения и профилактики инфекционных болезней. 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 генной инженерии, с их помощью в бактерии встраивают гены человека, синтезирующие гормоны, цитокины, антитела или другие субстанции. Так же для изучения функции белковых молекул и создания библиотек генов и кодируемых ими белков, например, с применением технологии «фагового дисплея».

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). Оптимальные условия способствуют росту и размножению микроорганизмов, что можно активно 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. Термофильные микроорганизмы, заселяющие, например, 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. Однако, чувствительность к повышенной температуре колеблется у бактерий в зависимости от условий культивирования, состава питательной среды, длительности экспозиции температурного влияния и других факторов. При температуре ниже оптимальной на 5–10 °С бактерии не погибают, однако, их размножение задерживается в связи с замедлением обмена веществ. Для сохранения вегетативных форм бактерий при пониженной температуре применяют вещества с высокой вязкостью, которые предохраняют цитоплазму бактериальной клетки от разрушения кристаллами льда. Такие вещества называют *криопротекторами*. К ним относятся желатина, раствор альбумина, глицерин, 40% раствор сахарозы. Криопротекторы используют для длительного хранения культур бактерий при минусовых температурах, а также при лиофильном высушивании микроорганизмов.

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

Наиболее чувствительны к высушиванию патогенные микроорганизмы (возбудители гонореи, менингита, холеры, брюшного тифа, дизентерии и др.). Более устойчивыми являются микроорганизмы, защищенные слизью мокроты. Высушивание под вакуумом из замороженного состояния – *лиофилизацию* – используют для продления жизнеспособности, консервирования микроорганизмов при приготовлении иммунобиологических препаратов. Лиофильное высушивание предусматривает переход вещества из замороженного состояния в сухое, минуя жидкую фазу. Лиофилизированные культуры микроорганизмов в течение нескольких лет сохраняются и не меняют своих первоначальных свойств.

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)*. Осмотическое давление в клетке регулирует цитоплазматическая мембрана. При высоком осмотическом давлении окружающей среды происходит *плазмолиз*. Плазмолиз явление обратимое и, если понизить осмотическое давление окружающей среды микроорганизмы раствора, вода поступает внутрь клетки и возникает явление противоположное плазмолизу – *плазмолитиз*.

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. Часть облученных клеток популяции способна к восстановлению, *репарации* ДНК. Репарация облученных молекул ДНК происходит при фотореактивации клеток, для этого необходимо воздействовать на клетки повторно лучами более длинноволновой области (520–550 нм) или провести «темновую реактивацию».

Радиоактивное излучение также губительным образом действует на микроорганизмы. В то же время были обнаружены бактерии, устойчивые к действию ионизирующих излучений. Например, *Micrococcus radiodurans* была выделена из ядерного реактора.

Устойчивость к излучению определяют морфологическое и физиологическое состояние микроорганизма, экспозиция, доза облучения. Бактерии более чувствительны к ионизирующему облучению, чем вирусы. Механизм действия ионизирующей радиации так же связан с изменением нуклеиновых кислот клетки. 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. Ультразвук способствует разрыву клеточных стенок и мембран, повреждению флагеллина у подвижных форм микроорганизмов. Влияние ультразвука основано на механическом разрушении микроорганизмов в результате возникновения высокого давления внутри клетки или на появлении гидроксильных радикалов и атомарного кислорода в водной среде цитоплазмы. 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. Могут служить источниками питания; не оказывать какого-либо влияния; стимулировать или подавлять рост. Проявления различного влияния химических веществ зависит так же времени контакта и от индивидуальных свойств микроба. Химические вещества, способные оказывать бактерицидное действие используют для *дезинфекции*, то есть для уничтожения возбудителей инфекционных заболеваний в окружающей среде.

Дезинфекция с помощью химических веществ в качестве составляющей входит в совокупность мер, направленных на уничтожение микроорганизмов не только в окружающей среде, но и в макроорганизме, например, в ране и является основой *асептики* и *антисептики*. Дезинфектанты и антисептики дают неспецифический микробицидный эффект.

По химическому составу противомикробные антисептические вещества можно разделить на несколько групп:

- Галогены – препараты йода и хлора, они нарушают ферментативные структуры бактериальной клетки, угнетают гидролитическую и дегидрогеназную активность бактерий, инактивируют такие ферменты, как амилазы и протеазы.

- Перекись водорода, перманганат калия – как и галогены, обладают окислительным действием.

- Кислоты и их соли, щелочи, спирты и альдегиды повреждают поверхностные структуры бактериальной клетки, клеточную стенку и мембраны, нарушая их избирательную проницаемость и другие функции.

- Соединения тяжелых металлов обладают антиферментным механизмом действия на бактериальную клетку, например, они связывают SH-группы белковых молекул, при этом изменяется структура дыхательных ферментов, и разобщаются процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях.

- Красители – обладают денатурирующим и литическим эффектом.

К антисептическим химическим веществам относятся группы производных 8-оксихинолина (хинозол, нитроксалин, хинолон) и нитрофурана (фурацилин, фуразолидон), которые также нарушают биосинтетические и ферментативные процессы в бактериальной клетке.

К наиболее распространенным дезинфицирующим средствам относятся хлорсодержащие, фенольные, перекисные и аммониевые соединения.

АНТИМИКРОБНАЯ ТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности клетки или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, актиномицетам, грибам, простейшим) 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 или 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 пенициллина) и химическим путем добавляют к нему различные радикалы. Таким образом антибиотику придают определенные свойства. Антибиотики, полученные комбинированным способом, называются полусинтетическими (метициллин, оксациллин). К полусинтетическим антибиотикам более длительное время чувствительны устойчивые к природным антибиотикам микроорганизмы. Кроме того, комбинированный способ наиболее экономически выгодный метод производства антибиотиков: из одного природного антибиотика, стоимость получения которого очень высока, можно создать примерно 100 полусинтетических препаратов с разными свойствами.

Классификация антибиотиков

Существует несколько подходов к классификации антибиотиков, рассмотрим основные.

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, колиформин).

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, рифмицины, 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, гризифульвин).

5. Антибиотики, вырабатываемые грибами, относящимися к классам базидиомицетов и аскомицетов (например, хетомицин).

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 цефалоспорина.

Биосинтетические пенициллины, полусинтетические пенициллины, полусинтетические цефалоспорины.

Ванкомицин, ристомицин.

Линкомицин.

Новобиоцин.

Макролиды.

2. Противобактериальные антибиотики широкого спектра действия.

Тетрациклины биосинтетические, полусинтетические тетрациклины (доксциклин).

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 строению

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. Нитрамидазолы (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 бак-

терий (исключением являются антибиотики, обладающие *мембранотропным* эффектом – тиротрицин и полимиксины). Поэтому антибиотики, прежде всего, действуют на патогенные микроорганизмы и только при длительном применении – на нормальную микрофлору. 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). Пептидогликан является уникальным и жизненно необходимым для бактериальной клетки, что делает его идеальной мишенью для антибиотиков. Исключениями являются *микоплазмы* и *хламидии* (у микоплазма генетически отсутствует клеточная стенка, у хламидий в клеточной стенке отсутствует пептидогликановый слой), которые в принципе нечувствительны к антибиотикам, блокирующим синтез клеточной стенки.

Синтез пептидогликана включает три этапа: 1) образование гликопептидных субъединиц и их транспорт в цитоплазматическую мембрану; 2) объединение субъединиц в гликопептидные цепи; 3) сшивание пептидогликановых цепей межпептидными связями ферментами – *транспептидазами*. Они известны как пенициллин связывающие белки (ПСБ), так как служат мишенью для бета-лактамовых антибиотиков. Антипептидогликановые антибиотики действуют бактерицидно, но они лишь запускают процесс: завершение обеспечивают собственные ферменты бактерий – *аутолизины*.

2. Антибиотики, подавляющие синтез белка или антирибосомальные антибиотики (аминогликозиды – стрептомицин, неомицин, канамицин и др.; макролиды – эритромицин, олеандомицин; тетрациклины; линкозамиды; хлорамфеникол и др.). По ряду признаков рибосомы прокариот отличаются от рибосом эукариотических клеток. В этом 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 аминоксил-транспортной РНК. Аминогликозиды же убивают бактерии, вызывая образование функционально непригодных 70S рибосом, а также извращает считывание информации с матричной РНК. Макролиды, хлорамфеникол, линкомицин соединяются с 50S субъединицей вблизи сайта, фиксирующего аминоксил-тРНК, что обрывает элонгацию пептидных цепей. Этот эффект бактериостатичен. Фузидин инактивирует фермент (транслоказу, или фактор

элонгации G), который обеспечивает передвижение рибосомы по мРНК, создавая условия для включения в пептидную цепь очередной аминокислоты.

3. Антибиотики, нарушающие функции мембран (полимиксины, грамицидины, нистатин, леворин, амфотерицин В, трихомицин, кандицидины, аскозин, альбомицин, 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 (грамицидины, колицины, тироцидин и др.).

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

Побочное действие антибиотиков

Антибиотики обладают побочным действием, оказывая неблагоприятное влияние на макроорганизм, на микроорганизмы, изменяют 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 нормальной микрофлоры. 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 анти-

бактериальными антибиотиками назначать противогрибковые препараты; в-третьих, для восстановления нормальной микрофлоры можно применять пробиотики и пребиотики.

3. Отрицательное воздействие на иммунитет. При введении антибиотиков возможны *аллергические реакции*. Их возникновение зависит от свойств самого препарата (наиболее сильными аллергенами являются пенициллины и цефалоспорины), от способа его введения (аллергические реакции развиваются чаще при повторном введении антибиотика) и индивидуальной чувствительности больного к антибиотику. Многие антибиотики обладают *иммунодепрессивным действием*. Например, левомицетин угнетает антителообразование, 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. Микроорганизмы с измененными свойствами трудно обнаружить.
2. Формирование антибиотикорезистентности.
Еще один нежелательный эффект антибиотиков – инактивация других лекарственных средств. Например, эритромицин стимулирует выработку ферментов печени, которые разрушают многие лекарственные средства.

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 мишени, на которую этот антибиотик влияет, – пептидогликана. Природная устойчивость к аминогликозидам анаэробов объясняется тем, что транспорт этих антибиотиков через цитоплазматическую мембрану связан с системами переноса электронов, которые у анаэробов отсутствуют. По этой же причине факультативные анаэробы в условиях анаэробноза, становятся значительно более устойчивыми к аминогликозидам, чем в аэробных условиях. При совместном воздействии на микробную клетку аминогликозидов и β -лактамов последние нарушают структуру цитоплазматической мембраны бактерий и облегчают транспорт аминогликозидов. В результате этого между β -лактамами и аминогликозидами проявляется выраженный синергизм.

Природная резистентность является постоянным видовым признаком и легко прогнозируется.

Приобретенная резистентность связана с приобретением генов резистентности (*r-генов*), переносимых транспозонами (подвижными или «прыгающими» генами) и плазмидами (такая плазида называется R-плазмидой). Возникновение 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 *полirezистентных штаммов*.

Одним из резервуаров r-генов служит нормальная микрофлора, изобилующая многочисленными видами бактерий. Здесь складываются благоприятные условия для обмена транспозонами 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 активного 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 устойчивость среди стафилококков и пневмококков. Устойчивость стафилококков обусловлено появлением у микроорганизмов дополнительного ПСБ (ПСБ2а). Маркером наличия ПСБ2а является устойчивость к метициллину или оксациллину. Независимо от результатов оценки *in vitro* при инфекциях, вызванных MRSA (метициллин резистентными стафилококками), все β -лактамы следует считать клинически неэффективными и не использовать в терапии. Ведущим механизмом устойчивости к хинолонам/фторхинолонам является модификация мишеней – двух бактериальных ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, опосредующих конформационные изменения в молекуле бактериальной ДНК, необходимые для ее нормальной репликации. Основной мишенью действия макролидов, кетолидов и линкозамидов является 50S субъединица бактериальной рибосомы. Метилирование мишени действия макролидов обуславливает высокий уровень устойчивости к этим антибиотикам.
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 молеку-

лы 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. Как правило, инфекционные болезни лечатся с помощью одного антибиотика (моноантибиотикотерапия). При заболеваниях с длительным течением (например, подостром септическом эндокардите, туберкулезе) для предупреждения формирования антибиотикорезистентности применяют комбинацию химиотерапевтических 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 микро-разведений.

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 часов учитывают результат путем измерения диаметра зоны задержки роста микроорганизма вокруг диска в миллиметрах (рис. 72).

мальной (рис.73). В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской E-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

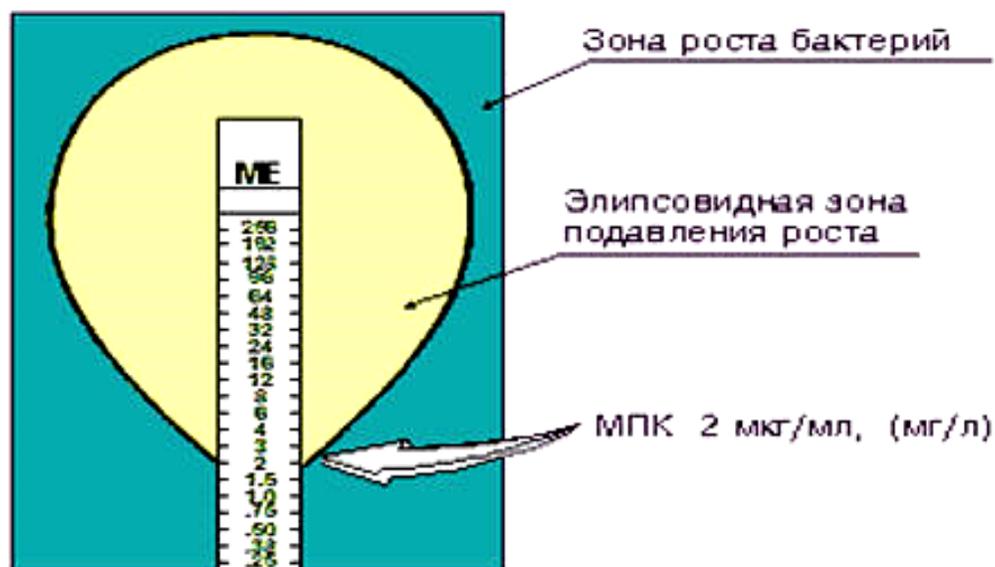


Рис. 73. Схема E-теста

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. Прямые методы являются разнонаправленными исследований, что практически сложно осуществимо. Ситуацию значительно усугубляет возрастание роли условно-патогенных микроорганизмов, способных вызвать эпидемические вспышки заболеваний.

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. Используя этот критерий, обычно исходят из предположения, что чем больше объект загрязнён органическими веществами, тем выше *ОМЧ* и тем вероятнее присутствие патогенов.

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;

б) индикация, идентификация и количественный учет 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 зеленящие 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* – количество СПМ, обнаруженное в определенном объеме или количестве исследуемого объекта. Индекс – величина, обратная титру. Зная один показатель, можно вычислить другой.

Микрофлора почвы

Почва состоит из минеральных и органических соединений. Она – продукт жизнедеятельности микроорганизмов, осуществляющих процесс её формирования, самоочищения, круговорота азота, углерода, серы и железа в

природе. Микроорганизмы почвы фиксируют азот из воздуха, образуют гумус почвы и высвобождают питательные вещества для растений, выполняют санитарную функцию 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, под влиянием которых в нем протекают бурные биохимические процессы. По мере увеличения глубины количество микробов постепенно уменьшается, но их обнаруживают даже на значительной глубине. Независимо от глубины наиболее густо всегда заселена околокорневая зона растений. Качественный состав околокорневой микрофлоры зависит от вида растений, но во всех случаях преобладает грибная флора. 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 можно разделить на три группы. К первой группе относятся патогенные микробы, для которых почва является постоянным местом обитания. Это актиномицеты, грибы, вызывающие микозы. Вторая группа представлена споровыми микроорганизмами, для которых почва является вторичным резервуаром, где они сохраняются длительное время (десятилетия). 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). Опасность передачи через почву заболеваний, вызванных этими возбудителями, невелика и зависит от интенсивности обсеменения микробами.

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.

В полный санитарно-бактериологический анализ входят дополнительно: определение актиномицетов, грибов, сальмонелл, шигелл, возбудителей столбняка, ботулизма, бруцеллеза, сибирской язвы.

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 1:10 центрифугируют, затем 5–10 мл суспензии 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 грамтрицательными 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 посеы 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 высев 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 засеять по 2–3 параллельные чашки. Термофильные бактерии выращивают при температуре около 60 °С. Результат учитыва-

ют 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, рН, 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. Утилизация органических отходов связана с деятельностью постоянно обитающих в воде микроорганизмов, т.е. составляющих аутохтонную (постоянную) микрофлору. В пресных водоемах находятся различные бактерии: палочковидные (псевдомонады, аэромонады и др.), кокковидные (микрококки), извитые и нитевидные (актиномицеты). На дне водоемов, в иле увеличивается количество анаэробов. При загрязнении воды органическими веществами появляется большое количество непостоянных (аллохтонных) представителей микрофлоры воды, которые исчезают в процессе самоочищения воды. Вода – фактор передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний. Вместе с загрязненными ливневыми, тальными 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 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.

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 оксидазному 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 *S. 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.

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

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, окруженных водно-солевой оболочкой. Диаметр частиц около 0,1 мм и более. Частицы оседают довольно быстро: длительность пребывания в воздухе составляет несколько секунд, а скорость перемещения – в среднем 30 см/с.

Мелкоядерная 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. Основной источник загрязнения воздуха патогенными видами – бактерионосители. Уровень микробного загрязнения зависит главным образом от плотности заселения, активности движения людей, санитарного состояния помещения, в том числе пылевой 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.). 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 споробразующих палочек, а показателем повышенной влажности – плесневых грибов.

Таблица 6

Нормативные показатели воздуха жилых помещений

Степень загрязнённости	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

Методы отбора проб воздуха можно разделить на *седиментационные* и *аспирационные*.

Седиментационный метод – наиболее старый метод, широко распространён 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 обсеменённости 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 грибков). 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-1Б
(<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 на наличие α- и β-гемолитических стрептококков производят с помощью аппарата 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.

НОРМАЛЬНАЯ 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. Так же, 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, мочевого пузыря, 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 определя-

ется 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 микробактерии, 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. Во время 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 двенадцатиперстной и верхних отделах тонкой кишки микроорганизмов встречается мало, несмотря на то что кислая среда желудка сменяется щелочной. Это объясняется неблагоприятным воздействием на микроорганизмы присутствующих 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 °С 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 сли-

зистую 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, вейлонеллами, 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 так же 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 рН 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 молочнокислых 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 за-

болеваний. 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 микроорганизмы 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 синбиотики. **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, бактероидов.

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

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 включающим 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 ре-

гуляторные 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-плаزمида 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 выявляются 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 спирали 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.

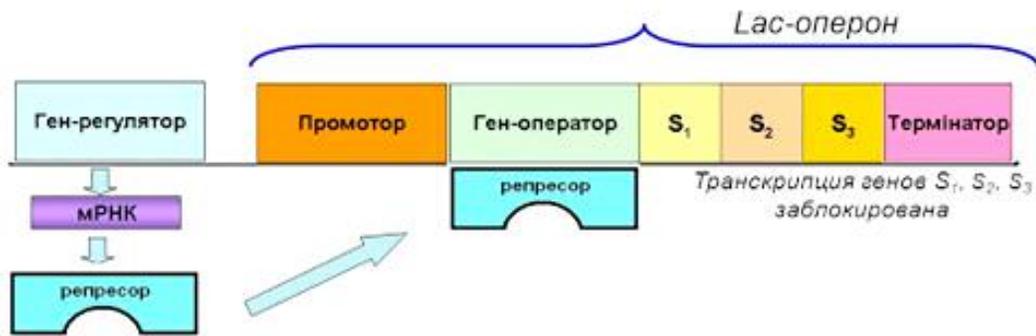


Рис. 75. Строение *Lac*-оперона *E. coli*. *Lac*-оперон контролирует синтез ферментов катаболизма лактозы (β -галактозидазы). При отсутствии в среде лактозы *Lac*-оперон находится в состоянии репрессии (активный белок-репрессор связывается с геном-оператором и блокирует транскрипцию структурных генов 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 прокариот, 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 плазмиды кодируют половые пили, образующие конъюгационную трубочку меж-

ду 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 двунилевой структуры. Переданная в реципиентную клетку и достроенная до двунилевой 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 10⁶ 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).

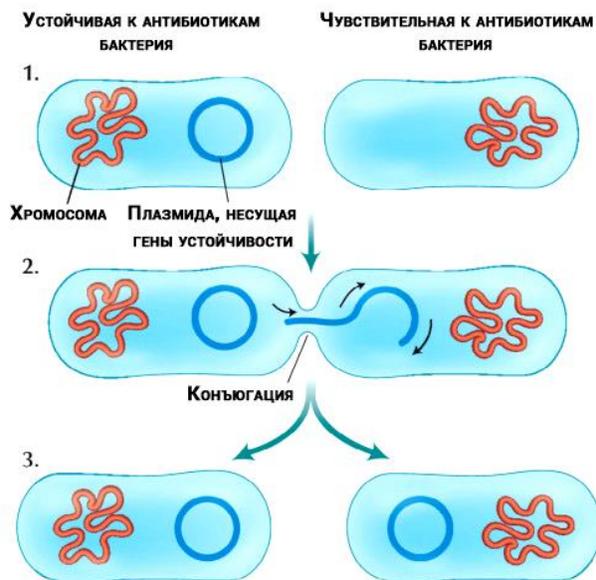


Рис. 76. Схема конъюгации на примере передачи плазмиды резистентности к антибиотикам

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.

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.

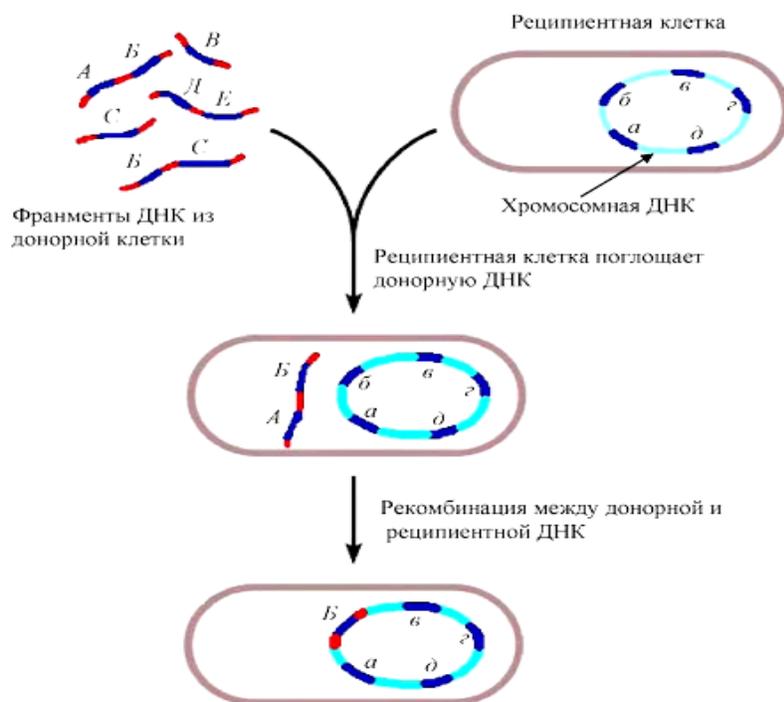


Рис. 77. Схема трансформации бактерий

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 бактерио-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.

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⁺*.



Рис. 78. Схема неспецифической (А) и специфической (Б) трансдукции

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. Ве-

роятность 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 (*интрагенные* 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* (*абберации*). 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 поврежденной 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-пуридин 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).

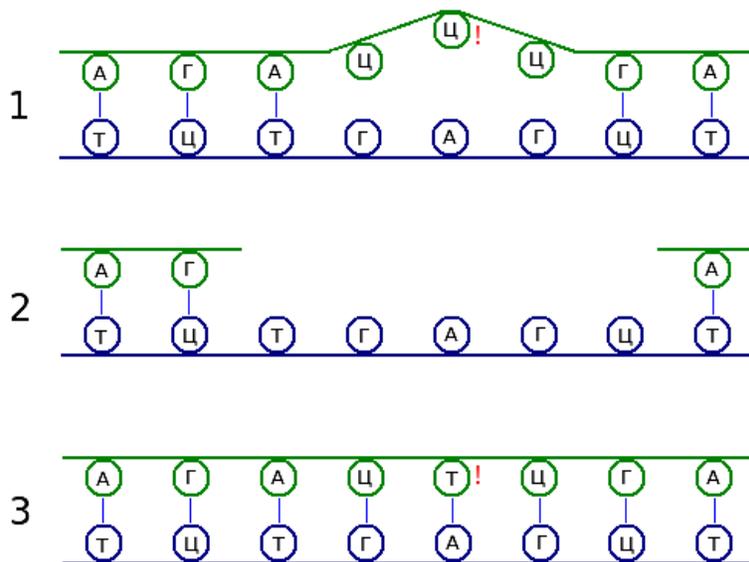


Рис. 79. Схема эксцизионной репарации.

1 – расхождение цепей из-за некомплемментарной пары нуклеотидов, 2 – вырезается участок поврежденной ДНК, 3 – брешь застраивается полимеразой

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 ре-синтезе нуклеотидной цепи на базе неповрежденной матрицы, она также является практически безошибочной.

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 приспособливаться 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 со-

ставляют парвовирусы, имеющие однонитевую ДНК), несегментированный и проявляет инфекционные свойства. У вирусов, принадлежащих к родам *Rovirus* и *Herpesvirus* 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 (представители 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 однонитевую +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, интегрирующийся 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 вероят-

но 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* (локализующиеся 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.

Метод молекулярной гибридизации основан на способности ДНК и РНК специфически соединяться (*гибридизироваться*) с комплементарными олигонуклеотидными фрагментами, искусственно синтезированными и мечеными ферментом, флюорохромом или изотопом. Эти фрагменты называются *зондами*.

Для проведения молекулярной гибридизации молекулу исследуемой ДНК расплетают, одну нить закрепляют на специальном фильтре, который помещают в раствор, содержащий меченый зонд. Создаются условия, благоприятные образованию двойных спиралей. При наличии комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют между собой двойную спираль. После окончания гибридизации и отмывания несвязавшихся продуктов проводится детекция образовавшегося комплекса при помощи соответствующей метки.

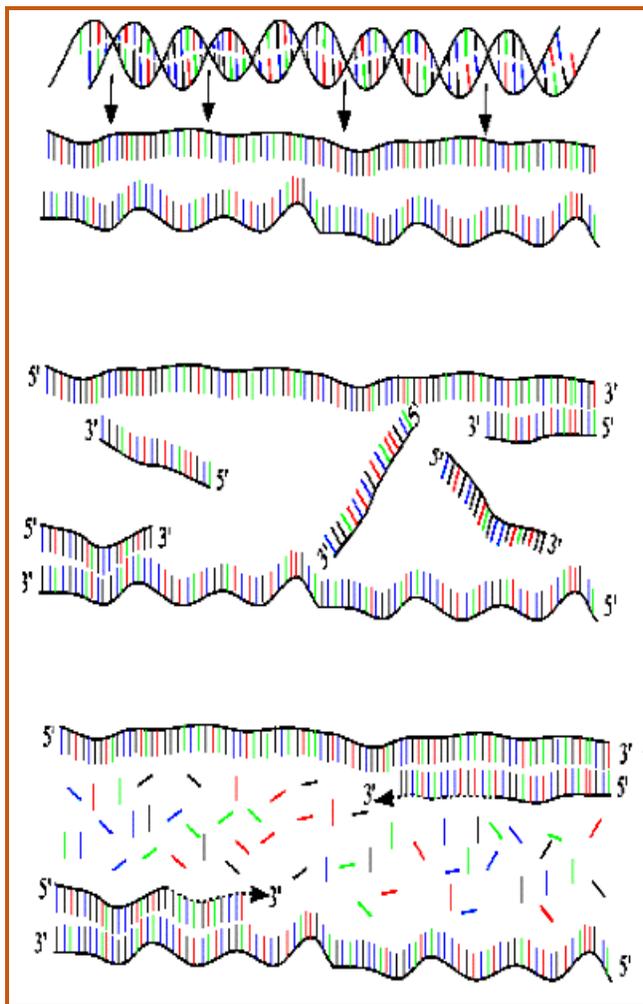
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) основана на многократном увеличении числа копий (*амплификации*) определенного участка ДНК, катализируемом ферментом ДНК-полимеразой. ПЦР – это очень чувствительный метод, теоретически для получения результата достаточно наличие в материале одной молекулы ДНК.

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 *Thermotus 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.

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.



1. Денатурация

2. Отжиг праймеров

3. Синтез цепи ДНК

Рис. 80. Схема полимеразной цепной реакции

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 – 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 напряженно-

сти 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 *антропонозами*.

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, контактно-минационный. 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. Для ряда заболеваний (лептоспироз, грипп) продромальный период не типичен. Отсутствие продромального периода может свидетельствовать о более 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 гра-

матрицательных 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 внутреннюю 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 нейраминную 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 взаимосоординации 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 клетки 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.

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 является 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*. Это первая линия защиты организма от микроорганизмов, представляющая собой совокупность преиммунных биологических реакций.
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. 81).

Приобретенный активный иммунитет возникает после контакта макроорганизма с антигенами возбудителей, и когда иммунная система активно участвует в формировании иммунного ответа. Продолжительность активно приобретенных типов иммунитета значительна.

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).

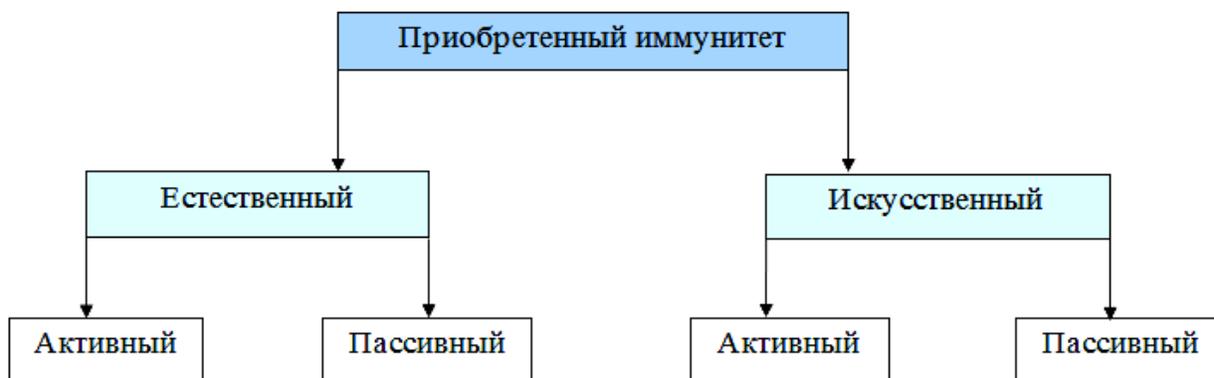


Рис. 81. Типы приобретенного иммунитета

Приобретенный пассивный иммунитет формируется антителами естественным или искусственным путём попадают в макроорганизм, при этом иммунная система не участвует в его формировании.

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. Его напряженность – относительная и, в большинстве случаев, он утрачивается в различные сроки.

Приобретенный противои инфекционный 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 противои инфекционный 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.

Восприимчивость макроорганизма зависит от места заражения (входные ворота), через которые проникают возбудители. 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. Защитные реакции макроорганизма, мобилизуемые при развитии инфекционного процесса, обеспечивают химическое постоянство внутренней среды организма, его генетического и антигенного состава (гомеостаз) и являются частным

вариантом адаптивной реакции организма на действие любого повреждающего фактора.

Сопrotивляемость организма зависит от непроницаемости нормальных 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 других, 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 микробицидные 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.

Гисто-гематические барьеры препятствуют проникновению возбудителей из крови в головной мозг, репродуктивную систему и глаза. Кроме того, мембрана каждой клетки является барьером и препятствует проникновению микроорганизмов.

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. Снача-

ла нарушается обмен жидкости, что ведет к нарушению циркуляции в капиллярах. Одно из серьезных изменений – повышение проницаемости капилляров.

Итогом воспалительной реакции является локализация микроорганизмов или отграничение 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.

Фагоцитоз (от греч. phagos – пожираю, cytos – клетка) – общебиологическое неспецифическое явление, которое может быть отнесено филогенетически к высокому уровню распознаваемости чужеродности. Фагоцитирующие клетки мезенхимы приобрели в процессе эволюции определенную специализацию и стали поглощать широкий спектр посторонних частиц, таких, как микроорганизмы, макромолекулярные комплексы антиген-антитело, клетки и их органеллы, вирусы, коллоидальные растворы красок и др. Важнейшее свойство фагоцитов состоит в их способности распознавать «не свое», что ставит, эту реакцию на переходную ступень между резистентностью и специфическим иммунитетом.

Фагоцитами являются полиморфно-ядерные клетки (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и мононуклеарные 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 кислород независимые механизмы*.

К кислород зависимым 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), синте-

зируемая миелопероксидазой из H_2O_2 . Все вторичные АФК обладают выраженной бактерицидной активностью. Они секретируются в фагосому, где происходит расщепление поглощенного объекта, например, анаэробных микроорганизмов.

Кислород независимые механизмы реализуются в фаголизосоме при участии лизосомальных ферментов – лизоцим, лактоферрин, гидролазы. Микробицидной активностью обладает молочная кислота, образующаяся в результате гликолиза и понижающая внутривакуольный рН 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 (НК-клетки) представляют собой большие гранулосодержащие лимфоциты. Данные клетки способны спонтанно убивать опухолевые и инфицированные вирусом клетки. Также 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, лейкины, 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 °С 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, маннансвязывающий 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. 82):

- 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 C1 комплемента, который имея в своем составе активную протеазу расщепляет компоненты C2 и C4 с образованием C3-конвертазы. Конвертаза активирует компонент C5, после чего происходит формирование мембраноатакующего комплекса (МАК). Мембраноатакующий комплекс встраивается в клеточную стенку микроорганизма, образуется «пора», нарушается осмотическое давление внутри клетки, и она погибает.

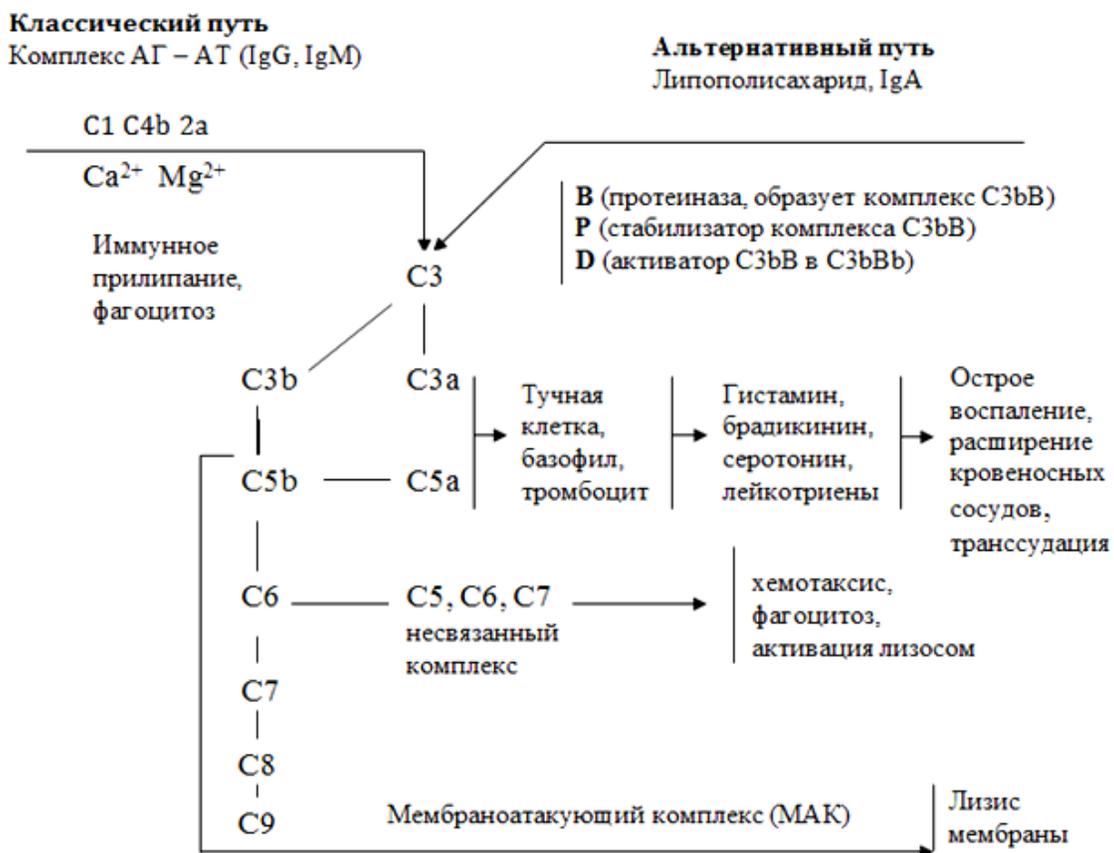


Рис. 82. Пути активации и физиологические функции компонентов комплемента

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. 83). 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.

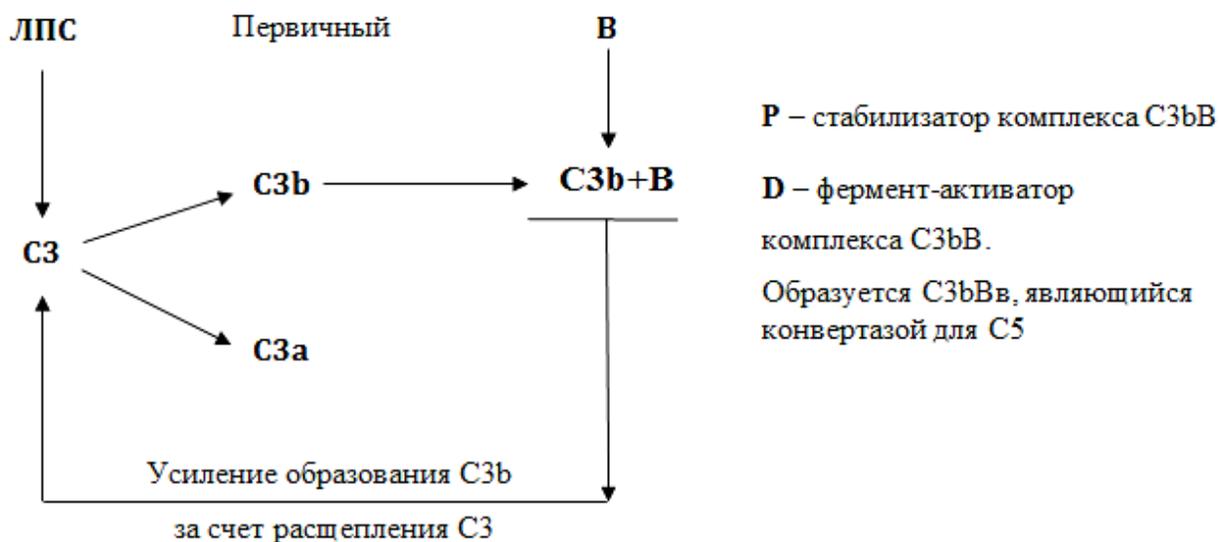


Рис. 83. Роль пропердина в альтернативном пути активации комплемента

Содержание и уровень комплемента в крови можно использовать как тест, характеризующий состояние естественной резистентности макроорганизма: высокое содержание комплемента в крови считается благоприятным признаком; снижение уровня комплемента является отрицательным прогностическим показателем.

Лизоцим – протеолитический фермент мурамидаза (от лат. murus – стенка). По химической структуре лизоцим относится к полипептидам, содержа-

щим в молекуле около 130–160 аминокислотных остатков. Он растворим в слабокислой среде, устойчив к непродолжительному кипячению, к трипсину.

Лизоцим (мурамидаза) способен расщеплять основное вещество клеточной стенки бактерии муреин путем разрушения связи между первым углеродным атомом *n*-ацетилмурамовой кислоты и четвертым углеродным атомом *n*-ацетилглюкозамина, входящего в состав клеточной стенки бактерий. В результате этого изменяется ее проницаемость.

Лизоцим синтезируется фагоцитами и является мощным защитным фактором слизистой оболочки полости рта, глаза, содержится в слезах, слюне, крови, материнском молоке, тканях различных внутренних органов. Высокая концентрация лизоцима выявляется в околоплодных оболочках и водах плода.

Лизоцим выполняет в организме важные биологические функции: бактерицидное действие, стимулирующее воздействие на фагоцитоз и образование антител, способность нейтрализовать некоторые микробные токсины, а также противовоспалительное действие.

Цитокины являются медиаторами межклеточных взаимодействий и продуцируются различными клетками иммунной системы. Цитокины имеют белковую природу, а их действие происходит через рецепторы на поверхности 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. Вза-

имодействует 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. Возможные механизмы анти-вирусного действия интерферонов представлены на рисунке 84.



Рис. 84. Механизм антивирусного действия интерферона. (А.Г. Букринская, 1986)

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 коротковременно — 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. Они продуцируются макрофагами.

Хемокины привлекают в очаг воспаления лейкоциты, моноциты и лимфоциты. К хемокинам относят ИЛ-8, МИФ-макрофагингибирующий фактор 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, но 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. Биосинтез этих молекул заканчивается построением химически однотипных молекул независимо от того, в животной, растительной или микробной клетке он осуществляется, т.е. эти вещества специфичностью не обладают, специфичность проявляется на более высоком уровне организации биологических макромолекул. Так, аминокислоты, соединенные в полимерную цепь, приобретают антигенность, если в эту цепь входит более 8 аминокислот.

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 гаптenu, 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 виру-

сов наиболее результативно внутрикожное и подкожное введение их. Оба пути значительно эффективнее внутримышечного или внутривенного. Энтеральный путь поступления для многих антигенов малоэффективен. Передозировка медленно выводящихся антигенов может вызвать иммунологический паралич. Введение антигена в эмбрион приводит к возникновению толерантности после рождения животного. 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. Сохранение антигена в организме зависит при прочих равных условиях от размеров и химической структуры его молекул. Наиболее длительное пребывание его в организме (несколько сот дней) наблюдается при соединении антигена с веществом, имеющим длительный период полураспада. 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 ком-

плекс многочисленных антигенов. При ее 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 очередь 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. 85), каждый из которых может быть представлен вариантами одного и того же гена (аллелями).

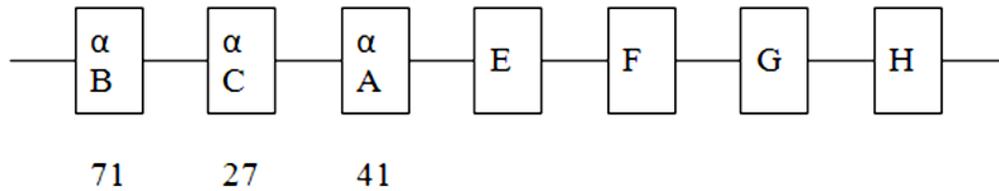


Рис. 85. Локусы (гены) класса I главного комплекса гистосовместимости

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 86.

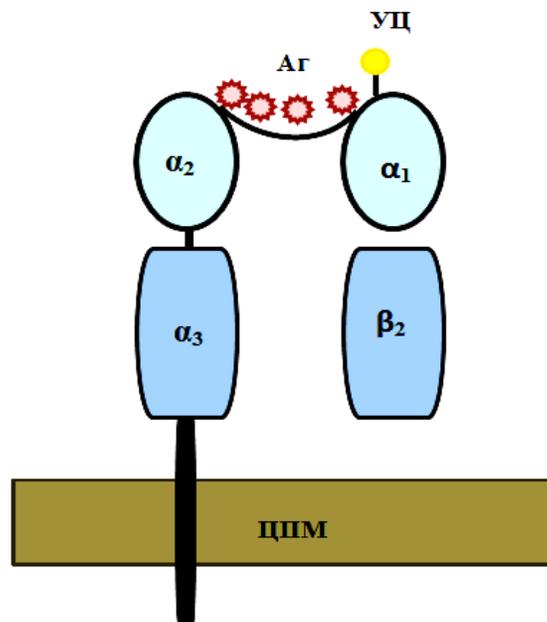


Рис. 86. Структура молекулы HLA I класса. ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; α_1 , α_2 , α_3 – три внеклеточных домена тяжелой цепи; β_2 – микроглобулин; УЦ – углеводная цепочка; Аг – антиген

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. 87). 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 88.

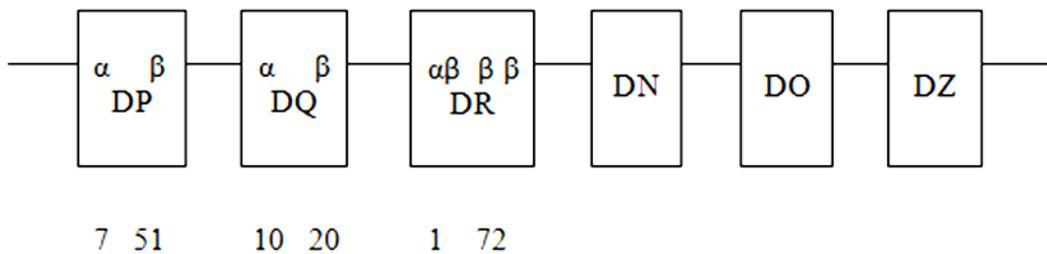


Рис. 87. Локусы (гены) класса II главного комплекса гистосовместимости

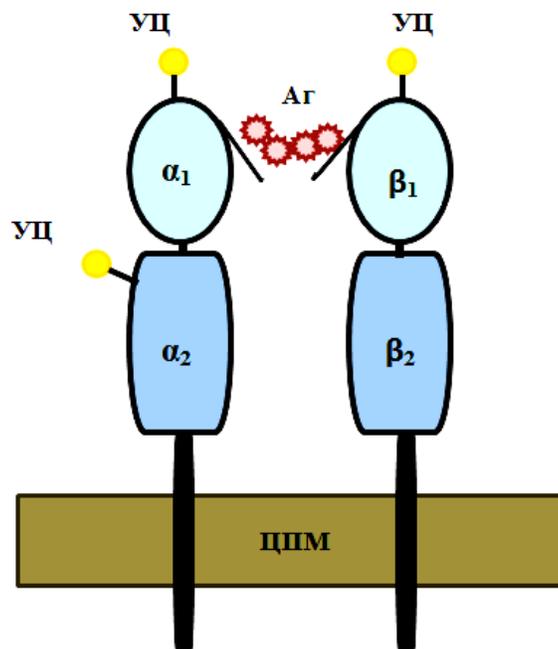


Рис. 88. Структура молекулы ГКГС II класса. ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 – внеклеточные домены; УЦ – углеводная цепочка; Аг – антиген

Рецептор HLA II класса представляет собой гликопротеид, состоящий из двух цепей. Цепь А представлена переменным внеклеточным доменом α_1

(34 кД), константным внеклеточным доменом α_2 (34 кД), гидрофобным трансмембранным и гидрофильным цитоплазматическими доменами. Домены α_1 и α_2 имеют по одной короткой углеводной цепочке. Цепь В имеет переменный внеклеточный β_1 (28 кД) с одной углеводной цепочкой, константный внеклеточный β_2 (28 кД), гидрофобный трансмембранный и гидрофильный цитоплазматический. Щель между α_1 и β_1 представляет собой активный центр рецептора. Антигены HLA класса II имеются только на макрофагах, В-лимфоцитах и некоторых активированных Т-лимфоцитах.

Класс III локусов ГКГС содержит гены, контролирующие синтез некоторых 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. 89).

Оба типа цепей, соединенных между собой, обладают антигенностью. У тяжелых цепей она специфична для каждого класса иммуноглобулинов и соответственно классам H-цепи обозначаются μ (мю), γ (гамма), α (альфа), ϵ (эпсилон), δ (дельта). Легкие цепи в антигенном отношении делятся на две разновидности – κ (каппа) и λ (лямбда), одинаковые для, разных классов. Антигенные различия тяжелых цепей используют для получения антисывороток, позволяющих выявить наличие в исследуемом материале иммуноглобулинов того или иного класса.

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 (CH_1 , CH_2 , CH_3). Переменные участки легких и тяжелых цепей формируют активные центры антител (VL–VH). Участок CL– CH_1 определяет небольшие различия в последовательности расположения аминокислот у индивидуумов одного и того же вида (аллоантигенные различия молекул *IgM*). Область CH_2 – CH_2 участвует в фиксации и активации комплемента, а область CH_3 – CH_3 – в фиксации антитела к клеткам (лимфоцитам, макрофагам, тучным клеткам). Данный тип строения молекулы характерен и для всех остальных классов иммуноглобулинов, различия заключаются в до-

полнительной организации этой основной единицы. Так, Н-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 8.

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.

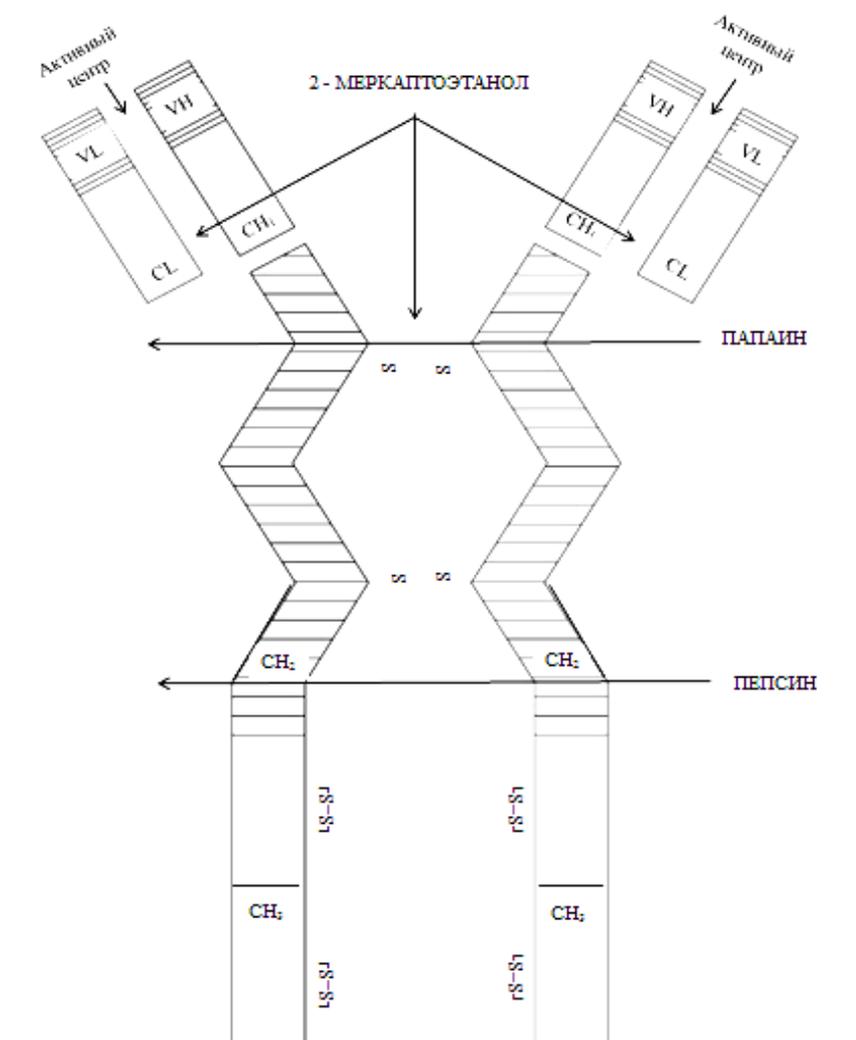


Рис. 89. Структура молекулы IgG с указанием мест расщепления на фрагменты 2-меркаптанолом, папаином и пепсином

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	–	+	–	–	–

Основная масса антител образуется в клетках плазмоцитарного 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. 90).

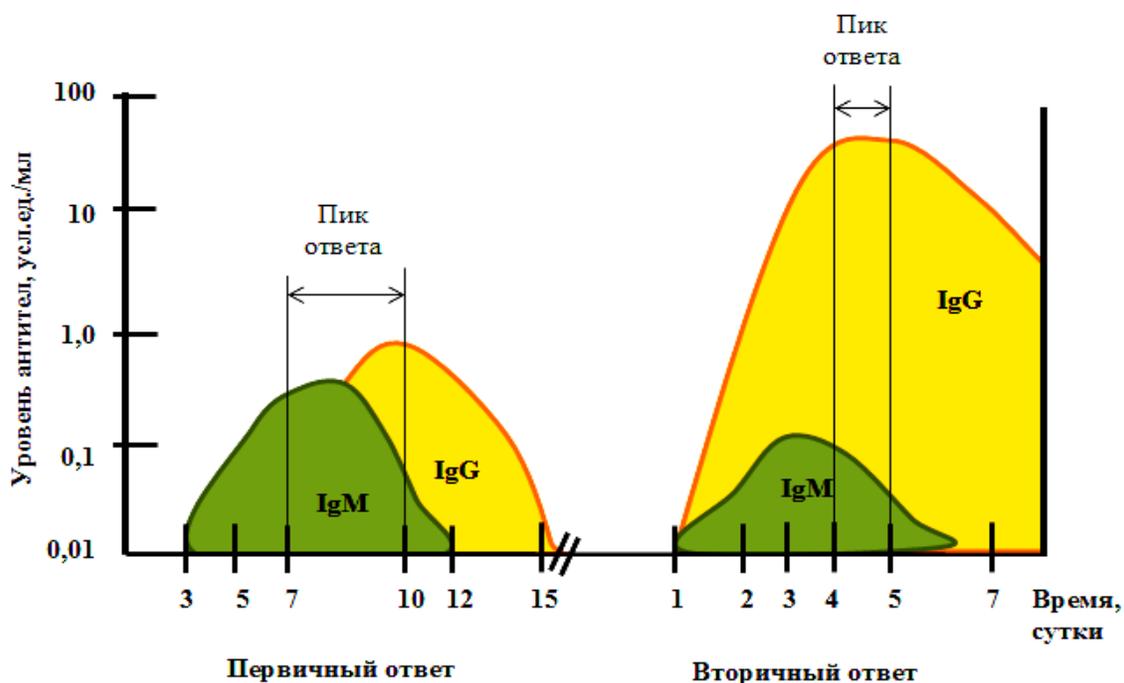


Рис. 90. Первичный и вторичный иммунный ответ

Генетический контроль биосинтеза антител

Типичная молекула иммуноглобулина состоит из 2H и 2L цепей (обе κ – 70% или обе λ – 30%). 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 вариабельной части антитела;
- 3) C – гены константной части;
- 4) J – гены соединительной области полипептида;
- 5) D – гены дополнительной вариабельности.

Функциональная организация генов, контролирующих синтез различных цепей, представлена на рисунке 91 (цифрами указано число вариантов).

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).

сом. Эпитопы транспортируются молекулами HLA-I на поверхность макрофага и презентуются другим иммунокомпетентным клеткам для последующей продукции антител (рис. 93).

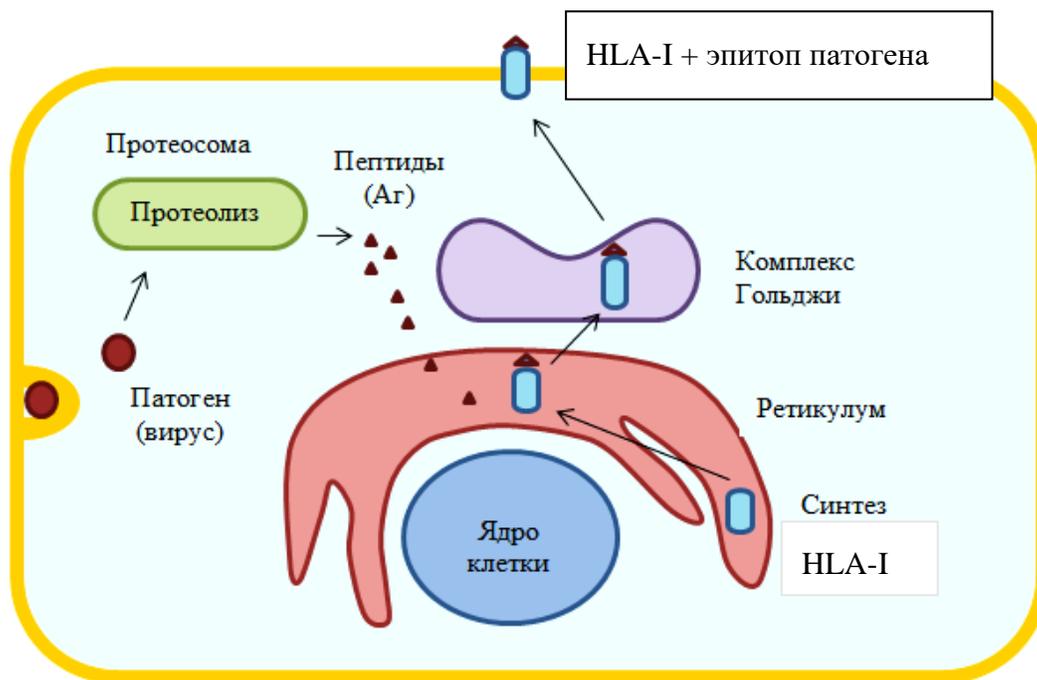


Рис. 92. Презентация антигена соматическими клетками

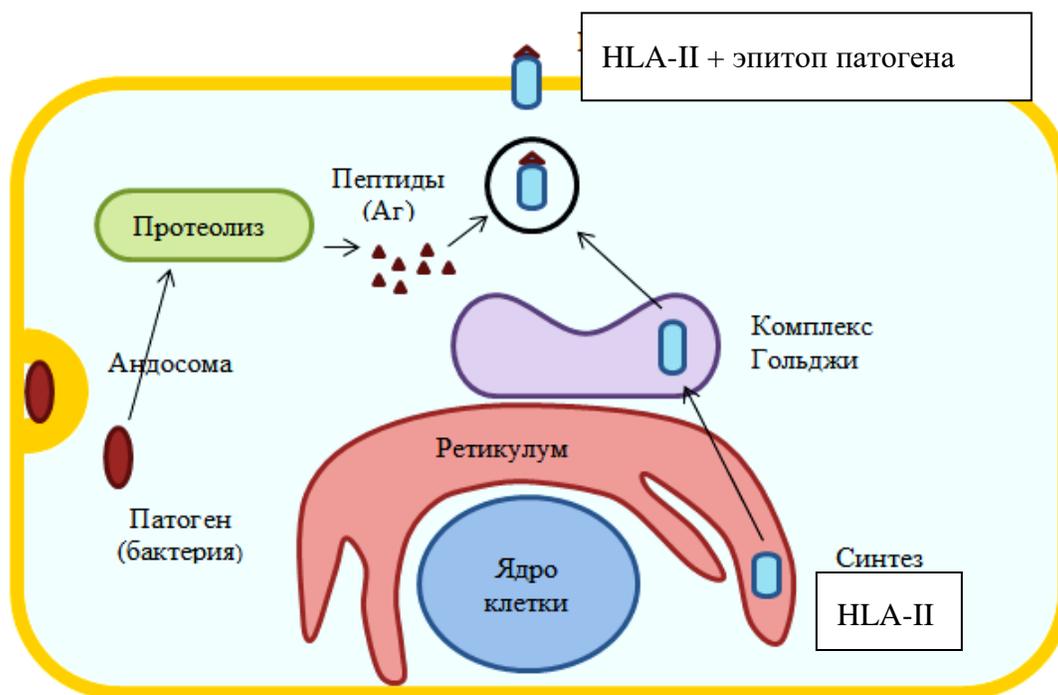


Рис. 93. Презентация антигена макрофагами

T-клеточный рецептор. Состоит из двух цепей (рис. 94) α -цепь представлена 4 доменами: переменный внеклеточный домен, константный внеклеточный домен, гидрофобный внутримембранный и гидрофильный цитоплазматический (Мм – 50 кDa). β -цепь имеет аналогичные домены (Мм – 45 кDa).

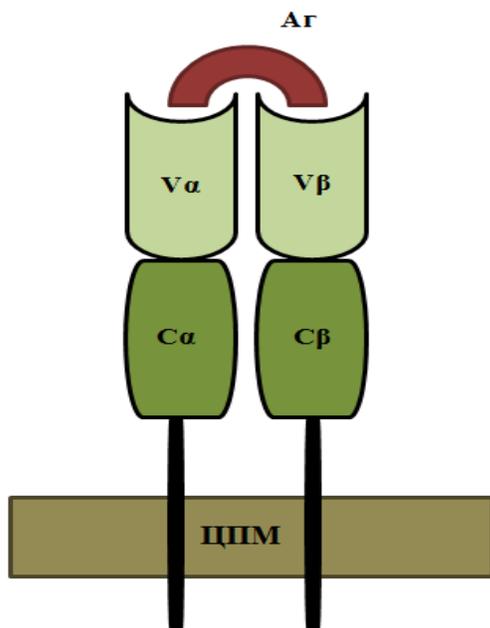


Рис. 94. Строение T-клеточного рецептора (TCR): ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; $V\alpha$ – переменный участок α -цепи; $V\beta$ – переменный участок β -цепи; $C\alpha$ – константный участок α -цепи; $C\beta$ – константный участок β -цепи; Ag – антиген

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 T-лимфоцитах, B-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, гранулоцитах и др. Функция некоторых корецепторов сводится к распознаванию «своей» антигенпредставляющей клетки. Например, T-лимфоцит, имеющий CD4 (T-хелпер), или CD8 (цитолитический T-лимфоцит), распознают «свою» антигенпредставляющую клетку через «узнавание» антигенов HLAII или HLAI. Дополнительно T-цитолитический лимфоцит (Tc) проводит это «узнавание» и через CD28 корецептор Tc 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 B-лимфоцитов) приводит к образованию комплекса, обладающего свойством мощного индуктора пролиферации B-лимфоцитов. Роль многих корецепторов изучена еще недостаточно.

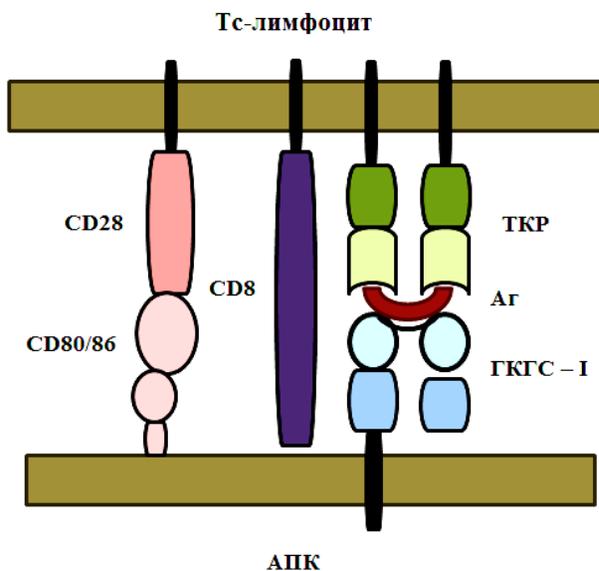


Рис. 95. Корецепторы межклеточных взаимодействий Тс-лимфоцита

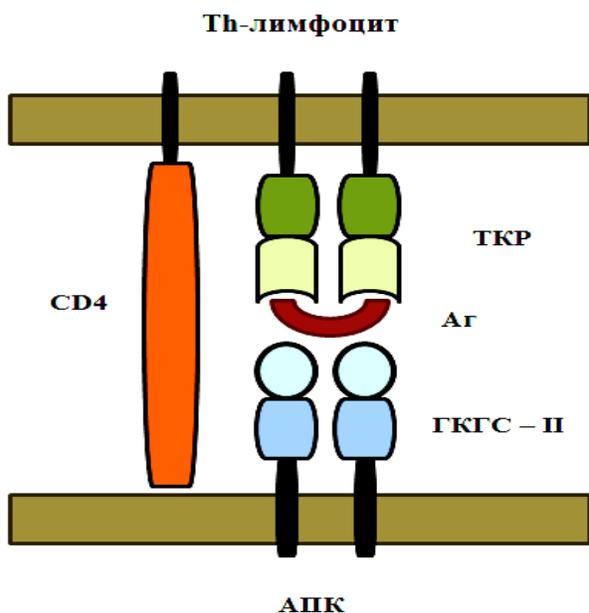


Рис. 96. Корецепторы межклеточных взаимодействий Т-хелпера

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 Th1 и 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 детерминанта. 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 противои инфекционной 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 презентует 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 предрасположенные 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-лимфоцитов. 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–C_{1,4,2,3В}» фиксируется на рецепторах макрофагов к C_{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 является 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 С₃ также ведет к снижению активности фагоцитов. И, наконец, наиболее часто микозы у человека возникают при низкой продукции Т-лимфоцитов (Т_с, Т_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 (Т_с, Т_h). Полноценный постинфекционный иммунитет формируется очень редко.

Противовирусный иммунитет

Особенности противовирусного иммунитета обусловлены своеобразием анатомического строения вирусов, сравнительно небольшим набором антигенов их 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);
- с) 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 (Тс).

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 освобожденные 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. Освобожденные вирионы подвергаются воздействию антител.

3. Антителоопосредованный цитолиз клеток-мишеней макрофагами и гранулоцитами при выделении ими в момент контакта с пораженной клеткой гранзимов и цитолизинов. 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 цитолизинов, 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.

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 рН 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, содержат строго 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 элек-

тролитной 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).

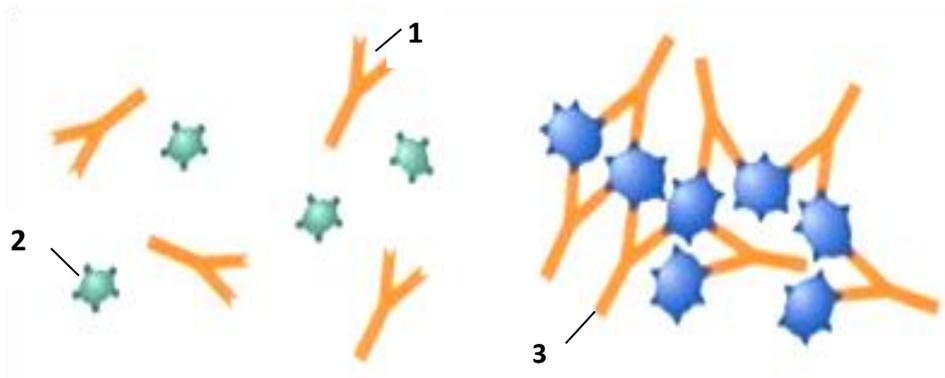


Рис. 97. Реакция агглютинации: 1 – микробная клетка; 2 – антиген, 3 – антитела

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.

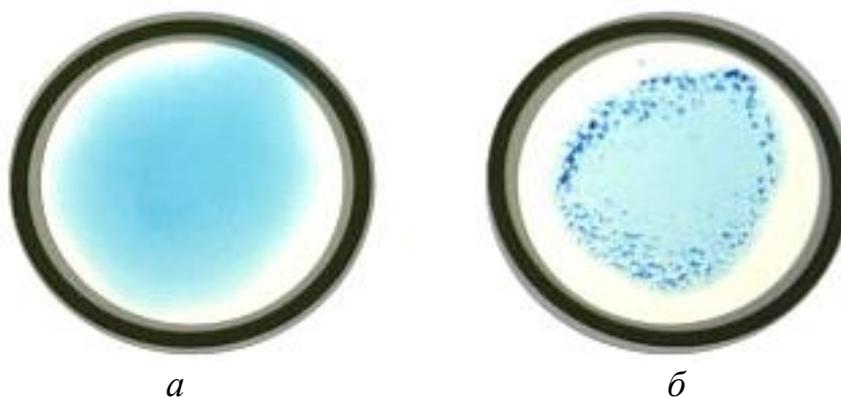


Рис. 98. Реакция агглютинации на стекле: отрицательная реакция (а); положительная реакция (б)

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 четкая агглютинация (рис. 99). Постановка РА должна сопровождаться контролем сыворотки и антигена. Учет пробирочной реакции агглютинации проводят через 18–20 ч.

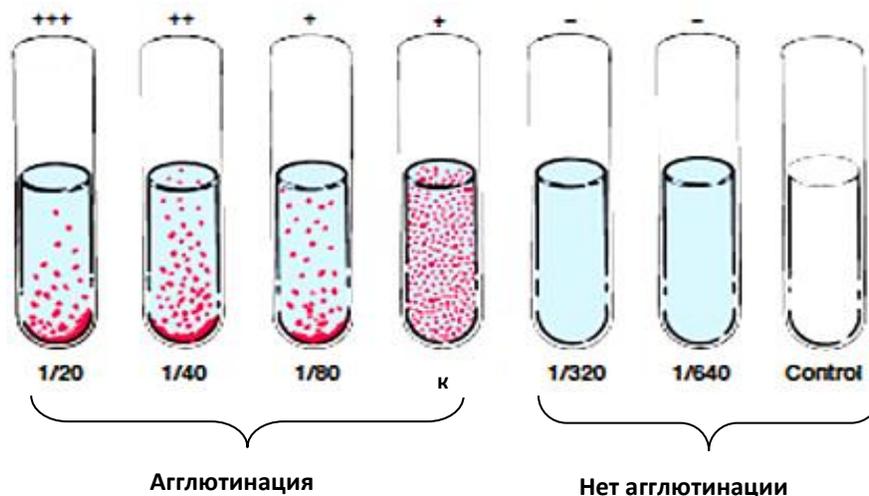


Рис. 99. Развернутая реакция агглютинации в пробирках

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Непрямые (опосредованные) реакции агглютинации основаны на взаимодействии специфических антител с мелкодисперсными антигенами, которые адсорбированы на корпускулярных носителях (эритроцитах, шариках латекса, клеток стафилококков). В зависимости от корпускулярного носителя различают следующие реакции:

- реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)
- реакция латекс агглютинация (Латекс-агглютинация)
- реакция коагглютинации (РКоА)

РНГА применяют в двух вариантах: с известными антигенами для обнаружения антител или с известными антителами для выявления антигенов. Эта реакция специфична и применяется для диагностики заболеваний, вызванных бактериями и риккетсиями. Для постановки РНГА используют эритроцитарные диагностикумы, приготовленные путем адсорбции на эритроцитах антигенов или антител в зависимости от цели исследования (рис. 100). Реакцию ставят в специальных полистироловых пластинах с лунками.

В положительных случаях осадок имеет вид тонкой пленки с фестончатыми кружевными краями из склеивающихся эритроцитов, покрывающих дно лунки («зонтик»). За титр принимают максимальное разведение исследуемого материала, вызывавшее агглютинацию эритроцитов (рис. 101).

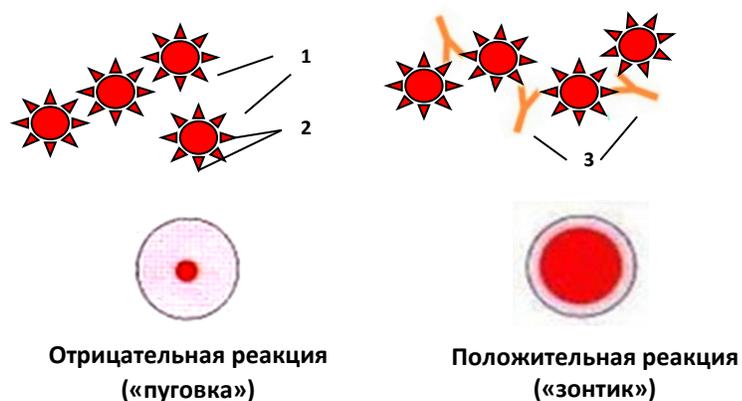


Рис.100. Реакция непрямо́й (пассивной) гемагглютинации:
1 – эритроциты; 2 – конъюгированный антиген; 3 – антитела к антигену

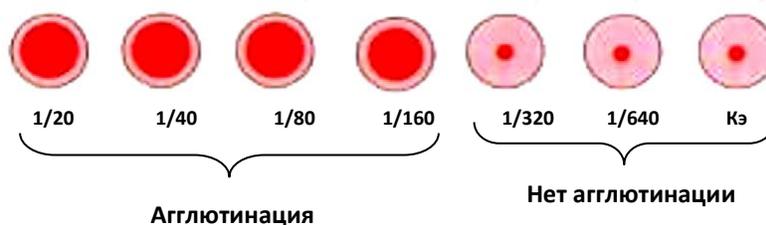


Рис. 101. Реакция непрямо́й (пассивной) гемагглютинации: разведение сыворотки
(1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640)

Наличие в сыворотке больного «нормальных» (перекрёстно реагирующих) антител обуславливает ложноположительные результаты в реакции агглютинации (РНГА, РКоА, латекс-агглютинации). Для предотвращения этого было введено понятие *диагностического титра*. Диагностический титр антител – это пограничное разведение сыворотки, при котором агглютинацию в большей степени уже обуславливают специфические антитела. Величина диагностического титра зависит от возбудителя и вида серологической реакции. Так, для сыпного тифа диагностический титр реакции агглютинации составляет 1:100, для брюшного тифа 1:200, а для непрямо́й гемагглютинации при брюшном тифе 1:40. Основанием для того считать реакцию положительной, является превышение диагностического титра при постановке реакции не менее чем в 2–4 раза.

Ложноположительная реакция в диагностическом титре (и выше) может получиться в случае, если человек уже болел тем инфекционным заболеванием, диагностика которого проводится на данный момент. Чтобы исключить такой результат серологические реакции ставятся с *парными сыворотками*. Для ее осуществления сыворотку больного исследуют дважды

с интервалом от 7 до 14 дней. При текущем заболевании титр реакции будет нарастать, в случае перенесенного заболевания титр останется неизменным. При исследовании парных сывороток диагностически значимым считается нарастание титра не менее чем в 4 раза.

Непрямая реакция Кумбса

Реакция Кумбса используется для выявления так называемых неполных (одновалентных) антител. Они специфически взаимодействуют с антигенами, но не вызывают их агглютинации. Такие антитела обнаруживаются, например, при некоторых инфекционных заболеваниях (при бруцеллёзе), при резус-конфликтных ситуациях. Реакция ставится в два этапа. На первом этапе к сыворотке больного добавляют антигены (бруцеллезный диагностикум или резус-положительные эритроциты). На втором этапе добавляют тест-систему – антиглобулиновую сыворотку, что вызывает агглютинацию антигенов (рис. 102).

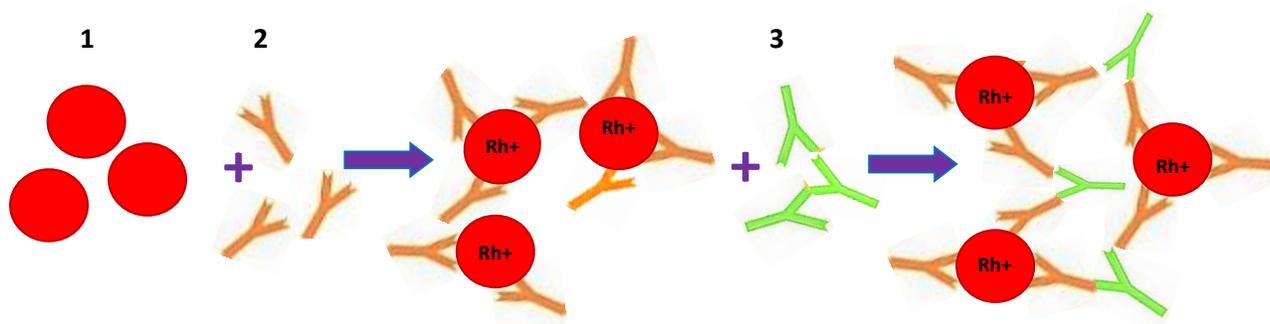


Рис. 102. Реакция Кумбса: эритроциты (1); анти-Rh-антитела (2); кроличьи антитела против Ig человека (3)

Реакция преципитации (РП)

Феномен преципитации (от лат. *praecipito* – осаждать) заключается во взаимодействии мелкодисперсных антигенов (преципитиногенов) с соответствующими антителами (преципитинами) и образованием преципитата (рис.103). 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.

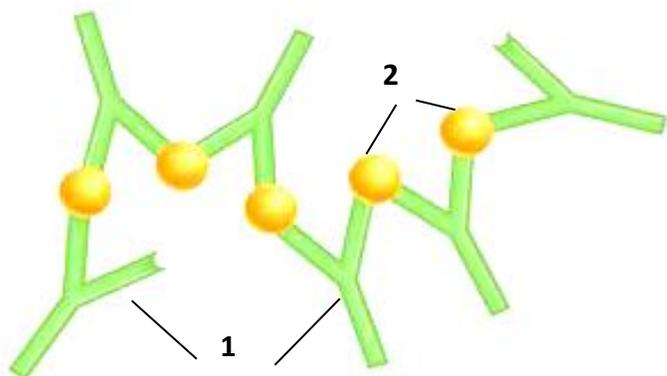


Рис. 103. Реакция преципитации:
1 – антитело; 2 – антиген

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. 104).

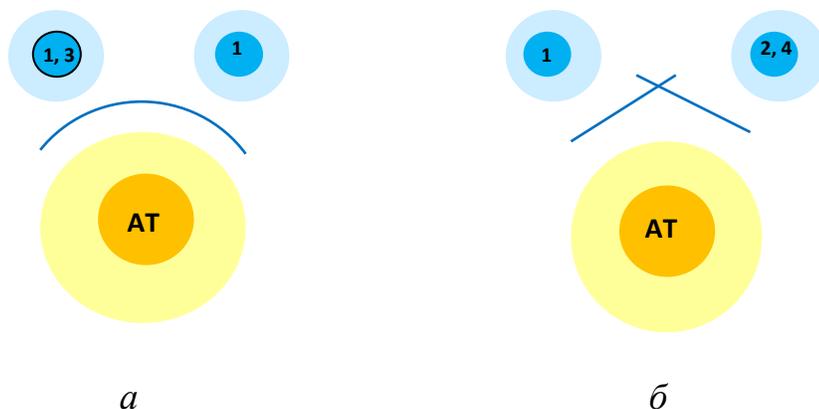


Рис.104. Реакция преципитации в геле по Оухтерлони.

У идентичных антигенов линии преципитата сливаются (а);
у неидентичных антигенов линии преципитата пересекаются (б)

Реакцию Оухтерлони можно использовать для определения токсичности бактерий, титра антител, активности стандартных диагностикумов или иммунных специфических сывороток.

Радиальная иммунодиффузия по Манчини. Радиальная иммунодиффузия по Манчини позволяет использовать моноспецифические антисыворотки и эталон с известным содержанием антигена. Тест-антиген и разведения растворов, исследуемых на наличие данного антигена, помещают в лунки, вырезанные рядами в пластине геля, куда предварительно внесена соответствующая моноспецифическая антисыворотка. Антиген диффундирует в гель и, соединившись со специфическими антителами, формирует кольца преципитации, диаметры которых зависят от концентрации антигена в лунках. Полученные результаты используют для построения калибровочной кривой, выражающей зависимость диаметров преципитантов от концентрации антигена в исследуемых растворах (рис. 105).

Принцип радиальной диффузии положен в основу метода, применяемого для изучения токсигенности бактериальных культур и отбора из бактериальной популяции клонов с высокой степенью токсичности. В этом случае исследуемые культуры засевают в чашки с агаром, содержащим антитоксическую сыворотку. Вокруг отдельных колоний образуются кольца преципитации, диаметр которых прямо пропорционален степени токсичности штамма.

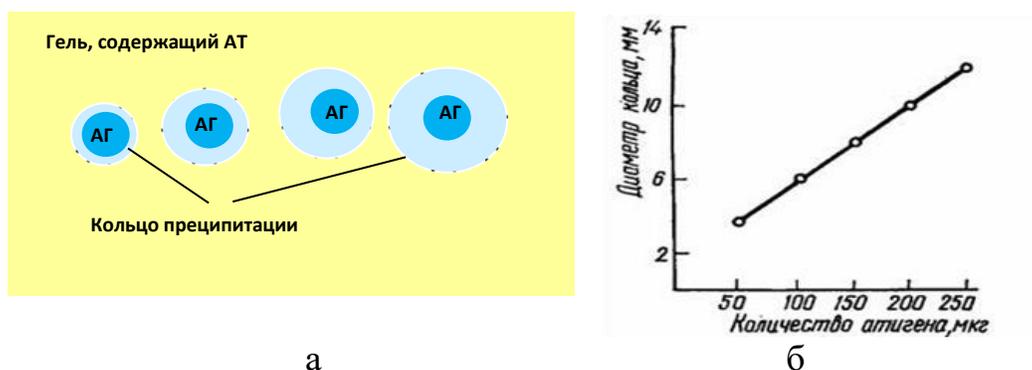


Рис. 105. Простая радиальная иммунодиффузия: кольца преципитации (а); калибровочная кривая (б)

Реакция иммуноэлектрофореза (ИЭФ). В основе реакции лежит принцип преципитации. ИЭФ, как правило, используется для исследования антигенной структуры микроорганизмов. Реакцию проводят в два этапа. Вначале проводят электрофоретическое разделение антигена в забуференном агаровом геле. Антигенный комплекс помещают в лунку, которая находится в центре геля, залитого на стеклянную пластинку. Затем через гель пропускают электрический ток, в результате происходит перемещение антигенов на неодинаковые расстояния соответственно своей электрофоретической подвижности (рис. 106-I). После этого в канавку, которая расположена по краю пластинки, вносят специфическую иммунную сыворотку и помещают во влажную камеру (рис. 106-II). Антигены и антитела диффундируют в геле

навстречу друг другу. В месте их соприкосновения образуются дугообразные линии преципитации (рис. 106-III).

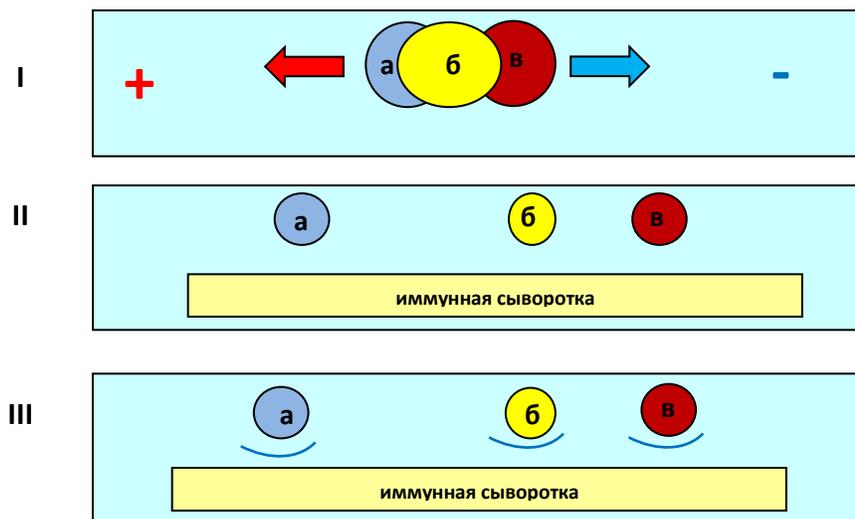


Рис. 106. Реакция иммуноэлектрофореза (ИЭФ) с различными антигенами (а, б, в)

С помощью ИЭФ анализируются состав и количество белков сыворотки крови, спинномозговой жидкости, микробных протеинов.

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. 107).

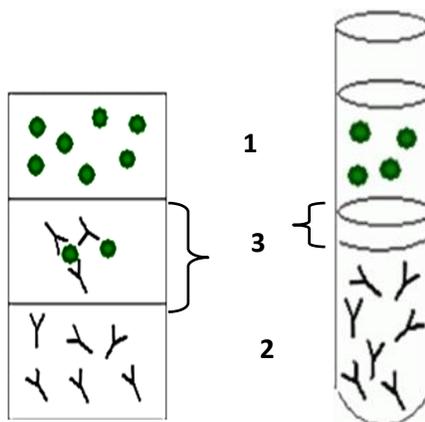


Рис. 107. Реакция кольцепреципитации: антигены (1); антитела иммунной сыворотки (2); преципитат (3)

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. 108). 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.

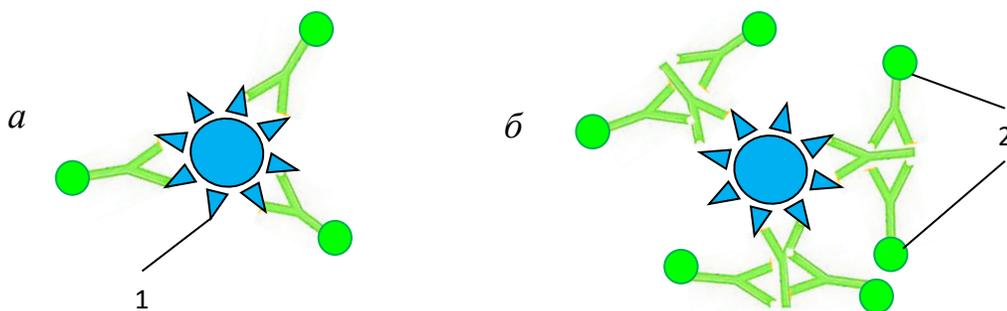


Рис. 108. Реакция иммунофлюоресценции – прямая РИФ (а); непрямая РИФ (б): 1 – бактерия, 2 – флуорохром

Преимущество непрямой 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 меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат и хромоген.

Например, субстратом для пероксидазы является перекись водорода, а хромогеном – тетраметилбензидин, ортофенилендиамин или 5-аминосалициловая кислота. Субстрат расщепляется ферментом, а его продукты деградации вызывают химическую модификацию хромогена. При этом хромоген меняет свой цвет – интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся 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. 109 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 за тем – смесь растворов субстрата для фермента и хромогена (рис. 109 Б).

ИФА применяют для диагностики заболеваний, вызванных вирусными и бактериальными возбудителями.

Иммуноблоттинг (ИБ)

Иммуноблоттинг 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. 108).

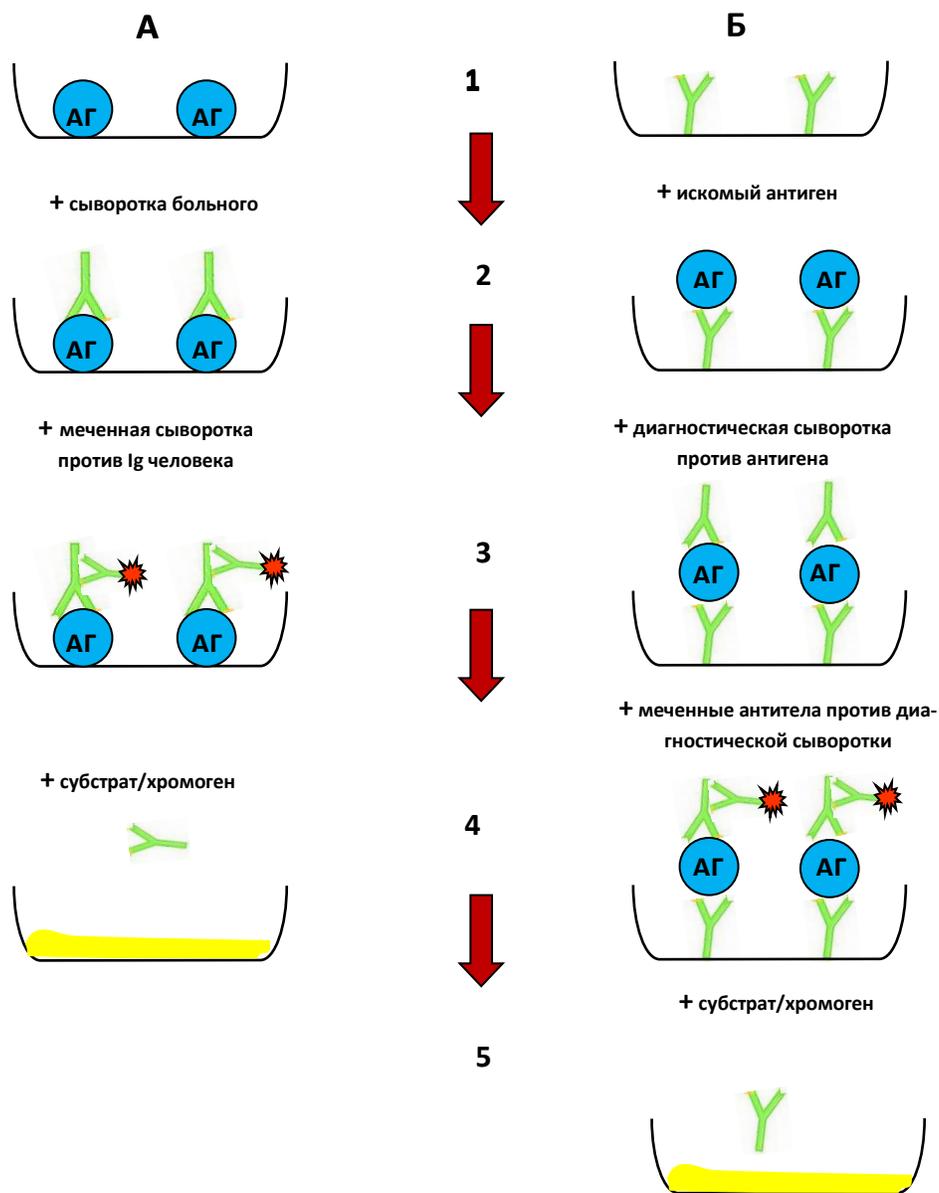


Рис. 109. ИФА: этапы (1-5) определения антител в сыворотке больного (А); антигена в исследуемом материале (Б)

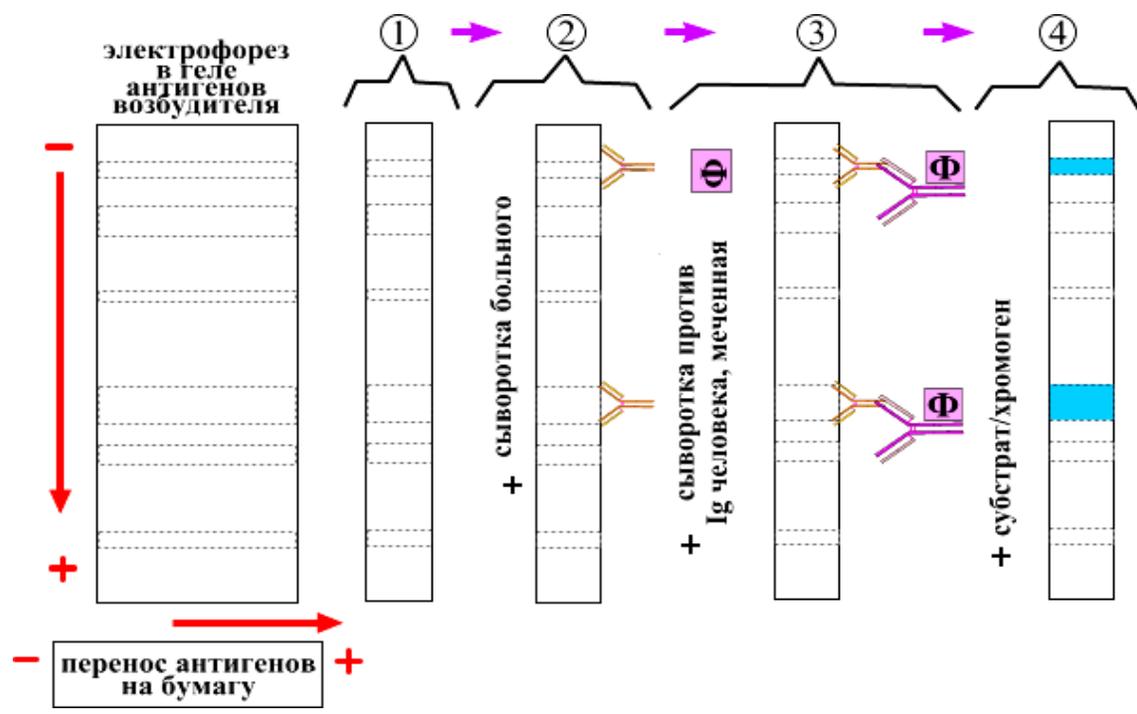


Рис. 110. Иммуноблотинг: этапы (1-4) выявления антител к антигенам возбудителя в сыровотке больного

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). *Гиперчувствительность немедленного типа* обусловлена антителами IgE, IgG, IgM. Развивается в течение нескольких минут, часов. Десенсibilизация возможна. *Гиперчувствительность замедленного типа* обусловлена макрофагами и Th1-лимфоцитами, которые отвечают за стимуляцию клеточного ответа. Развивается в течение 6–8 ч. Десенсibilизация невозможна.

По механизму выделяют следующие типы аллергических реакций (классификация по P. 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 кровообразования, 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, реактивный)

Механизм развития аллергической реакции I типа опосредован АТ-реагинами, 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. 111). Ответ на аллерген развивается стремительно, в течение 5–10 мин.

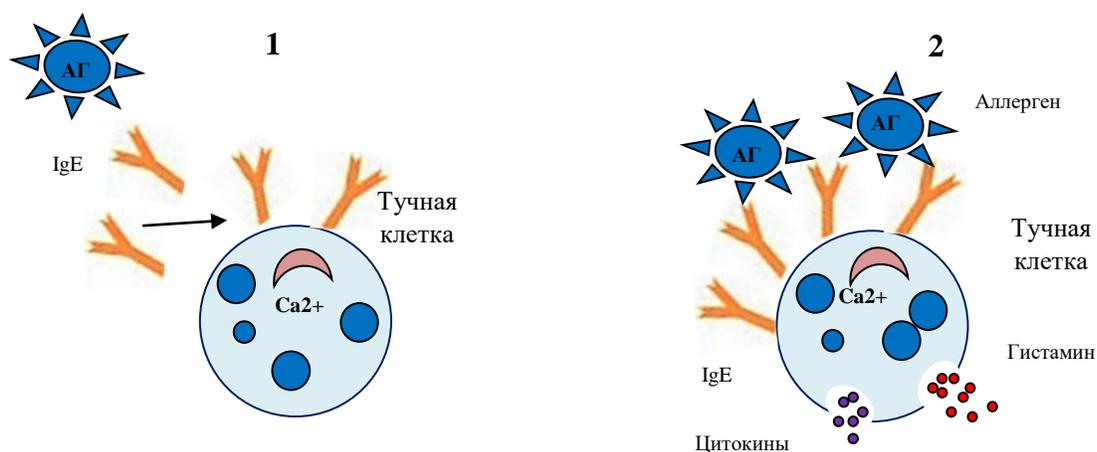


Рис. 111. I тип гиперчувствительности: первичное (1) и повторное проникновение антигена (2)

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. 112).



Рис. 112. 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. 113).

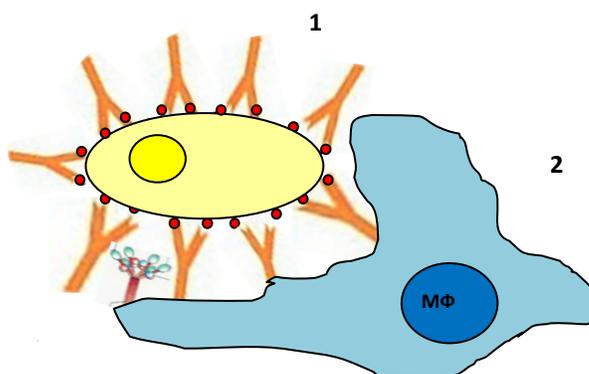


Рис. 113. Иммунный фагоцитоз: опсонизация (1); фагоцит/макрофаг (2)

Антителозависимая клеточная цитотоксичность. Опсонизированные антителами клетки-мишени взаимодействуют с НК-клетками через Fc-фраг-

мент антител. После этого НК «высвобождают» перфорины и гранзимы, с помощью которых происходит лизис клетки-мишени (рис. 114).

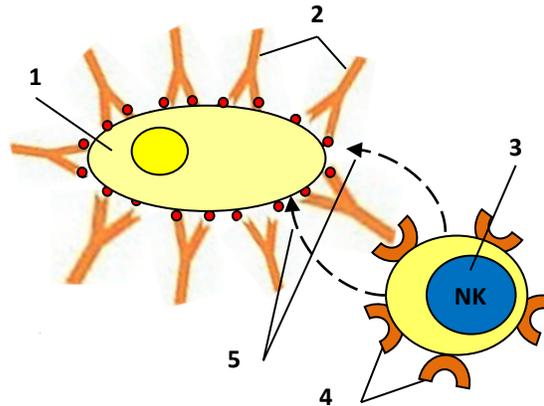


Рис. 114. Антителозависимая клеточная цитотоксичность: клетка-мишень (1); антитела (2); NK-клетка (3); Fc-рецептор (4); перфорины и гранзимы (5)

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 гипертериозидизм.

Лабораторная диагностика включает: определение циркулирующих противотканевых антител, определение при помощи РИФ наличия антител и комплемента 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. 115). В условиях значительного избытка антигенов такие иммунные агрегаты обладают токсическим действием. Активация комплемента (C3a, C3b, C5a) в местах отложения комплексов приводит к появлению анафилоксинов, 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

тельные цитокины, включая ФНО- α и хемокины. На поздних стадиях в процесс вовлекаются макрофаги.

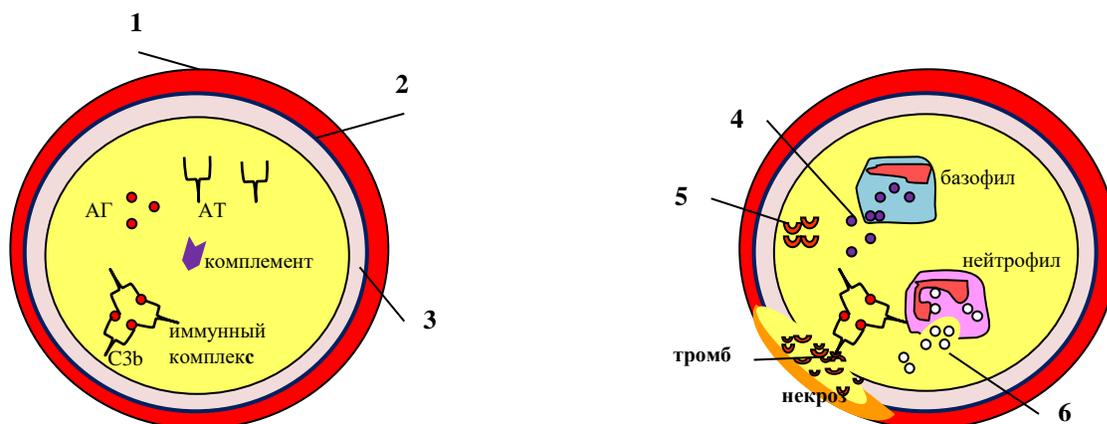


Рис. 115. Гиперчувствительность III типа (отложение иммунных комплексов в стенках кровеносных сосудов): стенка сосуда (1); базальная мембрана (2); эндотелий (3); вазоактивные амины (4); агрегированные тромбоциты (5); ферменты (6)

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. 116).

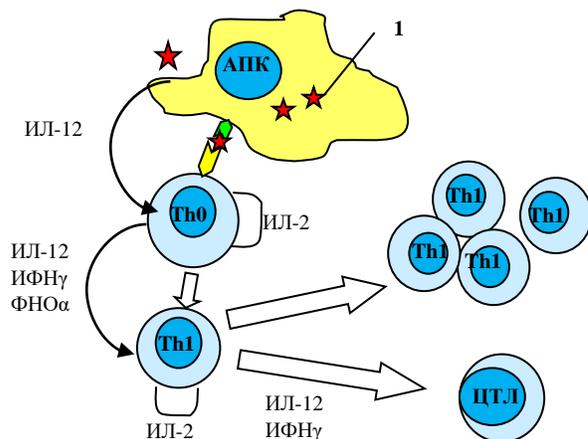


Рис. 116. IV тип аллергических реакций – ГЗТ.
Первая стадия сенсibilизации: проникновение аллергена (1), клеточный иммунный ответ, образование Т-лимфоцитов-эффекторов ГЗТ

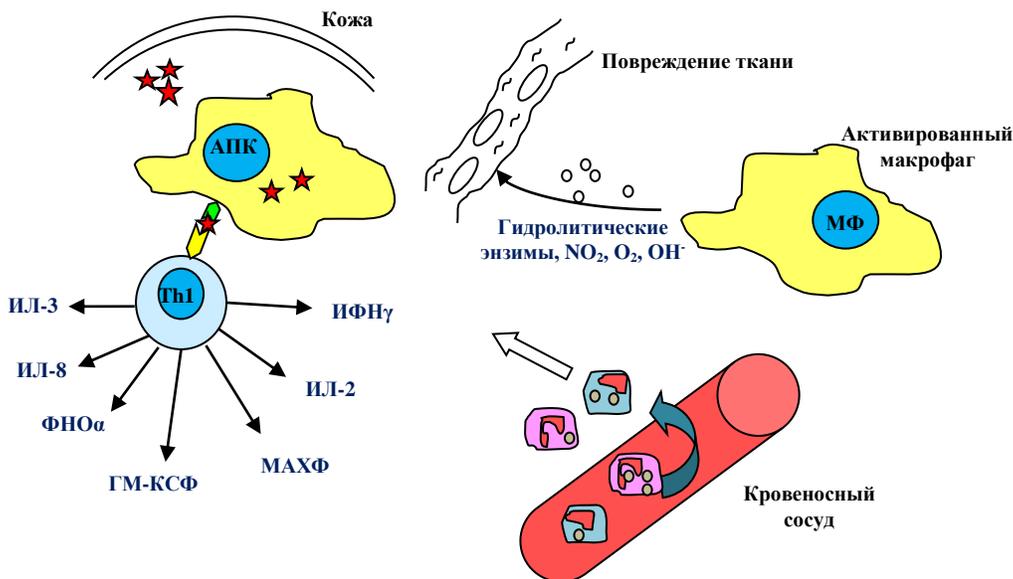


Рис. 117. Вторая стадия развития реакции ГЗТ: проникновение аллергена, усиленная продукция Т-эффекторами цитокинов, скопление и пролиферация клеток, повышение проницаемости сосудов, воспаление

Повторный контакт сенсибилизированных 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. 117).

Клинические проявления. Известны три типа аллергии IV типа. Это *туберкулиновая*, а также *контактная* и *гранулематозная* (табл. 9).

Таблица 9

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 индурация (уплотнение)
Гранулематозная	21–28 сут	Макрофаги, эпителиоидные клетки, гигантские клетки; фиброз	Уплотнение (образование гранулем) 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.

ИММУНОПРОФИЛАКТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Иммунотерапия – введение с лечебными целями иммунобиологических препаратов, содержащих антитела (специфические сыворотки и иммуноглобулины), формирующих в организме искусственный пассивный иммунитет, так как вводятся готовые антитела, интерфероны, цитокины и некоторые другие иммуномодуляторы.

Иммунопрофилактика – введение иммунобиологических препаратов, содержащих либо антигены, либо антитела, и способные создать в инфицированном организме искусственный иммунитет.

Кроме сывороток, иммуноглобулинов, вакцин, интерферонов существуют другие иммунобиологические препараты (ИБП), применяемые для диагностики и лечения инфекционных заболеваний, это, во-первых, диагностикумы и диагностические сыворотки, которые используются в серологических реакциях с целью серологической идентификации микроорганизмов и(или) определения наличия и количества антител в сыворотке крови человека. Во-вторых, это бактериофаги, которые могут быть диагностическими, лечебными и профилактическими благодаря специфичности. В-третьих, это пробиотики, препараты, содержащие микроорганизмы нормальной микрофлоры человека и восстанавливающие состав ее при дисбиозах, а также действующие на патогенные микроорганизмы, так как они обладают антимикробной (антибиотической) активностью. В-четвертых, это аллергены – препараты для выявления сенсibilизации организма инфекционными и неинфекционными антигенами.

Отличительной чертой всех перечисленных препаратов, кроме пробиотиков и иммуномодуляторов, является их специфичность, что отличает иммунобиологические препараты от других лекарственных средств.

По составу все иммунобиологические препараты можно подразделить на две группы:

Препараты, содержащие антигены:

- вакцины;
- анатоксины;
- 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 была названа так 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 относятся к сложным иммунобиологическим препаратам. В их состав, кроме активного начала – антигена, входят его стабилизаторы, вещества, активирующие действие антигена, адьюванты, а также консерванты. В качестве действующего начала в вакцинах используют:

- живые ослабленные возбудители;
- инактивированные тем или иным способом цельные возбудители;
- отдельные антигенные компоненты возбудителей, так называемые протективные (защитные) антигены;
- вторичные, продуцируемые микробной клеткой метаболиты, играющие патогенетическую роль в инфекционном процессе и иммунитете, например, токсины и их обезвреженные дериваты – анатоксины;
- полученные генно-инженерным способом или химическим синтезом молекулярные антигены – аналоги природных антигенов бактерий и вирусов.

Живые ослабленные (аттенуированные) вакцины содержат измененные формы возбудителей инфекционных заболеваний (вакцинные штаммы, которые потеряли вирулентные свойства, но сохранили способность индуци-

ровать выработку иммунитета). Снижение вирулентности осуществляется следующими основными методами:

- а) культивирование бактерий на средах с измененным составом или температурой (вакцины против туберкулеза, сибирской язвы, чумы, туляремии);
- б) пассаж микроорганизма в организме невосприимчивых или мало восприимчивых животных (антирабическая вакцина);
- в) создание в лабораторных условиях штаммов – рекомбинантов.

Кроме этих методов используется выявление и селекция штаммов возбудителей, потерявших в естественных условиях вирулентность для человека. Живые вакцины вызывают субклиническое заболевание и обеспечивают эффективную защиту. В тоже время они могут стать причиной тяжелых персистентных инфекций, вызывать поражение генетического аппарата клеток. Поэтому при иммунизации людей с иммунодефицитными состояниями необходима максимальная осторожность.

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 коровьей оспы и вакцина БЦЖ для профилактики туберкулеза у людей, полученная из аттенуированного штамма микобактерий бычьего туберкулеза.

Живые вакцины, не обладающие патогенностью, но сохранившие специфическую антигенность 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 инактивированных. Так, после однократного введения коревой, краснушной и паротитной вакцин, продолжительность иммунитета достигает 20 лет, вакцины желтой лихорадки – 10, туляремийной – 5 лет.

Живые вакцины получают путем культивирования вакцинного штамма в производственных условиях на питательных средах и субстратах, обеспечивающих культивируют на жидких или плотных искусственных питательных средах, 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 инактивации в процессе сушки и хранения вакцины. Исключением является живая полиомиелитная вакцина, выпускаемая в жидком виде.

В качестве стабилизаторов используют человеческий альбумин, сахарозу с желатиной или другие неантигенные и безвредные вещества. Вакцину контролируют по основным показателям: содержанию (концентрации) живых бактерий или вирусов вакцинного штамма, остаточной влажности, безвредности, аллергенности, иммуногенности и др.

Убитые корпускулярные вакцины (инактивированные) получают из свежесвыделенных вирулентных и иммуногенных штаммов возбудителей, инактивированных температурой либо с помощью химических веществ. В зависимости от применяемого химического вещества различают формоловые, спиртовые, ацетоновые, мертиолятные, хлороформенные вакцины. Убитые вакцины безопаснее живых, но менее эффективны и требуют повторного введения (ревакцинаций). В настоящее время применяются убитые вакцины против коклюша, холеры, лептоспирозов, клещевого энцефалита и др. Убитые вакцины могут быть профилактическими (их большинство) и лечебными (гонококковая, бруцеллезная). Их применяют для стимуляции специфического иммунитета при хронических, вялотекущих формах инфекционного процесса. Убитые вакцины получают путем культивирования вакцинного штамма в производственных условиях на питательных средах или субстратах, обеспечивающих достаточное накопление вакцинного штамма. Чистую культуру вакцинного штамма инактивируют одним из способов (чаще всего 0,4% формальдегидом при 37–40 °С в течение 4 недель), очищают от балластных компонентов, дозируют по числу бактерий или вирусов и в большинстве случаев подвергают лиофильной сушке.

Убитые субъединичные (субклеточные, субвирионные) вакцины содержат антигены, извлеченные из микроорганизмов с помощью химических веществ или ультразвука. Они включают в себя различные антигенные компоненты бактерий (антигены клеточной стенки, Vi-антигены, H-антигены, рибосомальные антигены) и вирусов (поверхностные антигены). Использование очищенных антигенов позволяет повышать иммуногенность препаратов и снижать их недостатки: сенсбилизацию 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.

В состав вакцин на основе протективных антигенов вводят консервант (мертиолят в концентрации 1:10 000) и адьюванты. Вакцины из протективных

антигенов разработаны против многих бактериальных и вирусных инфекций (брюшнотифозная, дизентерийная, гриппозная, бруцеллезная и др.).

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 °С в течение 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 формалином. Обезвреженный токсин, который называют анатоксином (или токсоедом), подвергают очистке от балластных веществ питательной среды, компонентов микробных клеток и концентрации. К очищенному анатоксину для усиления его иммуногенных свойств добавляют адъювант.

Анатоксины контролируют по основным показателям: остаточной токсичности, концентрации, стерильности, безвредности, аллергенности, иммуногенности и др. Анатоксины выпускают в виде моно- и ассоциированных препаратов. В практике применяются анатоксины против столбняка, дифтерии, ботулизма, стафилококковой инфекции. Важной особенностью анатоксинов является то, что они обеспечивают сохранение в организме привитого стойкой иммунологической памяти. Поэтому при повторном их введении людям, полноценно привитым 10 и более лет назад, происходит быстрое образование антитоксина в высоких титрах. Именно это свойство обуславливает оправданность их применения при постэкспозиционной профилактике дифтерии в очаге и столбняка в случае экстренной профилактики.

Иммуногенность инактивированной вакцины определяется размером молекулы, химическим составом и физическим состоянием вводимого антигена. Чем крупнее и сложнее молекула, тем выше иммуногенность. Растворимые белки являются более слабыми иммуногенами, чем нерастворимые антигены. 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 *адьювантов* для вакцин массового применения во всем мире разрешены лишь соли алюминия и масляный адьювант. Соединения алюминия сорбируют антиген, длительно удерживают его вблизи от места инъекции, что обеспечивает лучшее взаимодействие с представляющими антиген клетками. Минеральные адьюванты стимулируют, в основном, Th2 иммунный ответ.

В отечественных вакцинах Гриппол (против гриппа) и Геп-А-ин ВАК-ПОЛ (против гепатита А) используется полиоксидоний, который позволяют индуцировать Т-независимый ответ, что обеспечивает высокий уровень ответа на вакцинацию, даже у лиц с генетически predetermined низким иммунным ответом.

Механизм действия адьювантов 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.

Адьюванты повышают иммуногенность вакцин в десятки раз и более, особенно молекулярных белковых антигенов, например, анатоксинов, которые без адьювантов 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. Эффектив-

ность 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 встроены 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 послужило основанием для создания единых комплексных, так называемых ассоциированных вакцин для одновременной иммунизации против нескольких инфекций. 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. Если известна химическая структура природного специфического протективного антигена можно получить вакцины методом химического синтеза. В настоящее время возможно химически синтезировать короткие пептиды, в том числе антигенные детерминанты, которые могут служить основой для конструирования вакцинных и диагностических препаратов, а также полусинтетических вакцин. Полусинтетические вакцины представляют собой сложный комплекс, состоящий из ан-

тигена или его детерминанты, носителя в виде высокомолекулярного полимера и адьюванта. В настоящее время такая вакцина получены и применяется – ЭпиВакКорона для профилактики коронавирусной инфекции.

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.

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.

При разработке своих национальных требований к вакцинам все страны руководствуются рекомендациями ВОЗ. Экспертный Комитет по биологической стандартизации ВОЗ рассматривает, одобряет и публикует рекомендации практически по всем видам вакцин. В рекомендациях отражены все этапы производства и контроля вакцин, начиная с сертификации вакцинного штамма и клеточных культур, на основе которых готовятся вакцины, и кончая контролем конечного продукта.

Общие требования 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.).

Требованиями к специфической безопасности вакцин является полнота инактивации токсинов, бактерий, вирусов, отсутствие остаточной вирулентности (или реверсии вирулентности) и контаминации, наличие генетической стабильности и генетической гомогенности вакцинного штамма.

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.

Вакцины могут быть жидкими, сорбированными, сухими, таблетированными, в виде драже и капсул. Большинство вакцин вводят в организм парентерально, т.е. инъекционным способом: подкожно, внутримышечно, внутривенно, орально.

Схема применения 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 граунд-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 инфекциям, 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. После внутримышечного и подкожного введений состояние невосприимчивости наступает по мере всасывания препарата из места инъекции, концентрация антител в крови достигает максимума через 12–24 ч после инъекции. В случае внутривенного введения сывороток иммунитет формируется практически сразу после инъекции.

Производство лечебно-профилактических препаратов представляет собой сложный процесс с длительной технологией. 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, мулов, в связи с тем, что от них можно получать большие количества крови. Наиболее часто используют лошадей как вид жи-

вотных, 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 от форменных элементов крови и дефибринируется раствором хлористого кальция. Полученную сыворотку разливают в бутылки и консервируют.

Для уменьшения побочных реакций, а также повышения эффективности сывороточных препаратов является их очистка и концентрация, т.е. выделение иммунологически активных фракций сывороточных белков. В зависимости от специфичности антител (антитоксические, антибактериальные или антивирусные) для очистки сывороток применяются разные методы.

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.

Из собранной донорской крови (не менее 1000 чел.) готовят препараты. 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. Гетерологичные 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, удлиняется инкубационный период, 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 реакции. 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. Анафилактические реакции могут развиваться в течение нескольких минут после введения аллергена, реже через несколько часов.

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

- 2) N-ацетилглюкозамин и тейхоевые кислоты
 - 3) N-ацетилмурамовая кислота и тейхоевые кислоты
 - 4) 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 ЦЕЛЮ ВЫЯВЛЕНИЯ
- 1) включений
 - 2) спор
 - 3) кислотоустойчивых бактерий
 - 4) капсулы
10. КИСЛОУСТОЙЧИВЫЕ БАКТЕРИИ ПО МЕТОДУ ЦИЛАНЬСОНА ОКРАШИВАЮТСЯ В ЦВЕТ
- 1) фиолетовый
 - 2) голубой
 - 3) красный
 - 4) синий
11. В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ 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) канидии
16. В ПОРАЖЕННЫХ ТКАНЯХ АКТИНОМИЦЕТФ 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, –
- 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 Цейсслера
 - 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) цитоплазматическая мембрана
 - 2) клеточная стенка
 - 3) жгутиков
 - 4) включений
46. ПЛАЗМИДА, КОНТРОЛИРУЮЩАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ, 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 МОДЕЛЬЮ 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-титр
 - 3) перфрингенс-титр
 - 4) все вышеперечисленные показатели
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) антиглобулиновые антитела
 - 4) антигены и антитела
71. НА СТРИПАХ ПЕРЕД ПОСТАНОВКОЙ ИММУНОБЛОТИНГА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ НАХОДЯТСЯ
- 1) антигены возбудителя
 - 2) специфические антитела
 - 3) антиглобулины
 - 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) атиген
 - 2) атителя
 - 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, ИНФ γ
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) инактивированный
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

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		
24.	2	57.	2		
25.	2	58.	3		
26.	1	59.	2		
27.	1	60.	3		
28.	3	61.	3		
29.	1	62.	1		
30.	4	63.	1		
31.	4	64.	1		
32.	3	65.	3		
33.	2	66.	1		

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Медицинская микробиология. Частный курс : учебное пособие : для студентов ; под ред. Е. П. Красноженова, М. Р. Карповой, Ю. Н. Одинцова. – Томск : Печатная мануфактура, 2012. – 254 с. – ISBN 978-5-94476-264-1 – Текст: непосредственный.
2. Медицинская микробиология. Частный курс : учебное пособие для студентов, обучающихся по направлениям подготовки (специальностям) высшего профессионального образования группы «Здравоохранение» / Е. П. Красноженов [и др.] ; под ред.: Е. П. Красноженова, М. Р. Карповой, Ю. Н. Одинцова. – Томск : б. и., 2011. - 388 с. - ISBN 978-5-94476-264-1. – Текст : электронный // ЭБС «Электронная библиотека СибГМУ» : [сайт]. – URL: http://irbis64.medlib.tomsk.ru/cgi-bin/irbis64r_14/cgiirbis_64.exe?LNG=&C21COM=2&I21DBN=BOOK&P21DBN=BOOK&Z21ID=1818620389454064138532&Image_file_name=ft1276.pdf&IMAGE_FILE_DOWNLOAD=1 (дата обращения: 07.03.2020). – Режим доступа: для зарегистрированных пользователей.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник для студентов медицинских вузов / А. А. Воробьев [и др.] ; под ред. А. А. Воробьева. – 2-е изд., испр. и доп. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2012. – 704 с. – ISBN 978-5-8948-1895-5. – Текст : непосредственный.
4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник для студентов медицинских вузов ; под ред. А. А. Воробьева. – Москва : МИА, 2015. – 704 с. – ISBN: 978-5-8948-18955. – Текст : электронный // ЭБС «Медицинская библиотека MEDLIB.RU» : [сайт]. – URL: <http://ezproxy.ssmu.ru:2048/login?url=https://www.medlib.ru/library/signin?bookID=2744> (дата обращения 04.03.2020). – Режим доступа: по подписке.
5. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология : учебное пособие для студентов медицинских вузов / О. К. Поздеев ; ред. В. И. Покровский. - 4-е изд., стер. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 768 с. – ISBN 978-5-9704-1530-6. – Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента»: [сайт]. URL: <http://ezproxy.ssmu.ru:2048/login?url=http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970415306.html> (дата обращения 04.03.2020). – Режим доступа: по подписке.
6. Практикум по общей микробиологии: учебное пособие для студентов ; ред. М. Р. Карпова. – Томск : СибГМУ, 2016. – 213 с. – Текст: непосредственный.
7. Практикум по общей микробиологии : учебное пособие для студентов / Л. С. Муштоватова [и др.] ; ред. М. Р. Карпова ; рец. М. В. Чубик. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2016. — 213 с. м

Текст : электронный // ЭБС «Электронная библиотека СибГМУ» : [сайт]. – URL: http://irbis64.medlib.tomsk.ru/cgi-bin/irbis64r_14/cgiirbis_64.exe?LNG=&C21COM=2&I21DBN=BOOK&P21DBN=BOOK&Z21ID=188615983312AC19A8A151916E138&Image_file_name=ft1277.pdf&IMAGE_FILE_DOWNLOAD=1 (дата обращения: 07.03.2020). – Режим доступа: для зарегистрированных пользователей.

8. Практикум по частной микробиологии : учебное пособие / под ред. М. Р. Карповой. – Томск : Издательство СибГМУ, 2020. – 200 с. Текст : электронный // ЭБС «Электронная библиотека СибГМУ» : [сайт]. – URL: http://irbis64.medlib.tomsk.ru/cgi-bin/irbis64r_14/cgiirbis_64.exe?LNG=&C21COM=2&I21DBN=BOOK&P21DBN=BOOK&Z21ID=188615983312AC19A8A151916E138&Image_file_name=ft1698.pdf&IMAGE_FILE_DOWNLOAD=1 (дата обращения: 07.03.2020). – Режим доступа: для зарегистрированных пользователей.

Учебное издание

Ольга Петровна Бочкарева, Мария Ростиславовна Карпова,
Людмила Степановна Муштоватова, Ирина Феликсовна Зверева,
Инна Владимировна Луцаева, Светлана Викторовна Кондратьева,
Александра Валерьевна Грицута, Дарья Сергеевна Вайс

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ. ОБЩИЙ КУРС

Под редакцией О.П. Бочкаревой

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 28.02.2022

Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. л. 16,1. Авт. л. 12,2.

Тираж 100 экз. Заказ № 4

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru