

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
КЫРГЫЗСКО-РОССИЙСКИЙ СЛАВЯНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени первого Президента Российской Федерации Б.Н. Ельцина

МЕДИЦИНСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
Кафедра микробиологии и вирусологии

# ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

**Учебно-методическое пособие  
к практическим занятиям**

*Посвящается 30-летию  
Кыргызско-Российского Славянского  
университета имени Б.Н. Ельцина*



Бишкек 2023

УДК 578:579  
ББК 28.3:28.4  
О 28

**Под редакцией**

*Г.К. Садыбакасовой*, д-ра мед. наук, профессора

**Рецензенты:**

*В.С. Тойгомбаева*, д-р мед. наук, профессор Кыргызской государственной  
медицинской академии им. И.К. Ахунбаева,

*А.Ш. Джумагулова*, канд. мед. наук, доцент Кыргызской государственной  
медицинской академии им. И.К. Ахунбаева,

*Е.А. Радченко*, канд. мед. наук, доцент КРСУ им. Б.Н. Ельцина

**Составители:**

*Ф.С. Мустафина, М.А. Сабодаха,  
Г.Р. Бестужева, Г.К. Садыбакасова*

Рекомендовано к изданию кафедрой микробиологии и вирусологии  
и Ученым советом медицинского факультета КРСУ им. Б.Н. Ельцина

О 28 ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ: учебно-  
метод. пособие к практич. занятиям / сост.: Ф.С. Мустафина,  
М.А. Сабодаха, Г.Р. Бестужева, Г.К. Садыбакасова; под ред.  
Г.К. Садыбакасовой. – Бишкек: Изд-во КРСУ, 2023. – 262 с.

ISBN 978-9967-19-978-1

Настоящее издание переработано и дополнено новыми материалами  
в соответствии с современным состоянием методов микробиологических  
исследований и их преподавания в медицинских вузах. Соответствует  
программе 3 ФГОС.

Учебно-методическое пособие представляет собой систематизирован-  
ное изложение основных разделов общей микробиологии (таксономия,  
классификация, морфология, физиология, генетика микроорганизмов,  
учение об инфекционном процессе, иммунитете и др.). Включены матери-  
алы по использованию антимикробных препаратов, методах определения  
антибиотикочувствительности.

Предназначено для студентов медицинских вузов.

УДК 578:579

ББК 28.3:28.4

ISBN 978-9967-19-978-1

© ГОУВПО КРСУ, 2023

# **Раздел I. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

## **УИР (учебно-исследовательская работа) № 1**

### **Тема: МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **План**

1. Задачи медицинской микробиологии.
2. Организация и оборудование микробиологической лаборатории.
3. Правила работы и основы техники безопасности в микробиологической лаборатории.
4. Микроскопические методы исследования, микроскопы.
5. Световой микроскоп и техника микроскопии с иммерсионной системой.
6. Фазово-контрастный микроскоп.
7. Люминесцентный микроскоп.
8. Электронный микроскоп.

#### **Учебный материал**

##### **Задачи медицинской микробиологии**

- Изучение биологических свойств микроорганизмов и процессы их взаимодействия с организмом человека и окружающей средой.
- Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний.
- Разработка методов специфической профилактики и лечения инфекционных заболеваний.
- Организация производства препаратов, применяемых для диагностических, лечебных и профилактических целей.
- Разработка методов индикации микробов во внешней среде.

## **Организация и оборудование микробиологической лаборатории**

- Лабораторные комнаты и боксы для работы в асептических условиях.
- Специально оборудованное помещение для стерилизации питательных сред, посуды, обеззараживания отработанного инфицированного материала.
- Моечная, оборудованная для приготовления питательных сред.
- Помещение для приготовления питательных сред.
- Виварий – помещение, предназначенное для содержания лабораторных животных.
- Стены должны быть окрашены масляной краской или покрыты кафельной плиткой, пол – линолеумом.

### **Микробиологические лаборатории снабжены оборудованием:**

- Биологическими иммерсионными микроскопами с дополнительными приспособлениями и наборами необходимых красителей.
- Набором инструментов: бактериологическими петлями, микробиологическими шпателями, пинцетами, спиртовками и др.
- Лабораторной посудой: пробирками, чашками Петри, флаконами, пипетками и др.
- Приборами для стерилизации посуды, питательных сред и реактивов, рН-метрами, дистилляторами, центрифугами, техническими и аналитическими весами, аппаратурой для фильтрования и др.

### **Правила работы в микробиологической лаборатории:**

Работа на кафедре микробиологии и в бактериологической лаборатории требует строгого соблюдения специальных правил, так как исследования проводятся с использованием культур патогенных микроорганизмов и заразного материала от больных и экспе-

риментальных животных. Соблюдение этих правил необходимо для обеспечения не только личной безопасности, но и безопасности окружающих.

- В лабораторию на практические занятия студенты должны являться в халатах.
- Каждый студент должен работать на закрепленном за ним рабочем месте. Переход на другое место без разрешения преподавателя не допускается.
- На лабораторные столы не разрешается класть личные вещи, можно оставлять только рабочие тетради и руководство, запрещается принимать пищу.
- Отработанные препараты, пипетки и т. п. не разрешается класть на стол, их следует опускать в банку с дезинфицирующим раствором.
- В случае попадания заразного материала на стол, руки, одежду и прочее необходимо сообщить об этом преподавателю и обработать зараженный объект дезинфицирующим раствором.
- Следует бережно относиться к инвентарю, особенно к микроскопу, экономно расходовать краски, реактивы и фильтровальную бумагу.
- Необходимо точно и аккуратно выполнять задания по практическим занятиям.

### **Микроскопический метод исследования**

Для обнаружения и исследования микроорганизмов применяют микроскопы.

**Микроскоп световой.** Микроскоп (*греч.* micros – малый, scopo – смотрю) – оптический прибор для изучения малых объектов, недоступных невооруженному глазу.

В микроскопе различают механическую и оптическую части (рисунок 1).

Механическая часть микроскопа состоит из штатива, в котором различают нижнюю часть, или ножку микроскопа, и верхнюю часть, или колонку, соединенную с нижней при помощи шарнира. К колонке прикреплен предметный столик. К верхней части колонки присоединена трубка микроскопа – тубус.

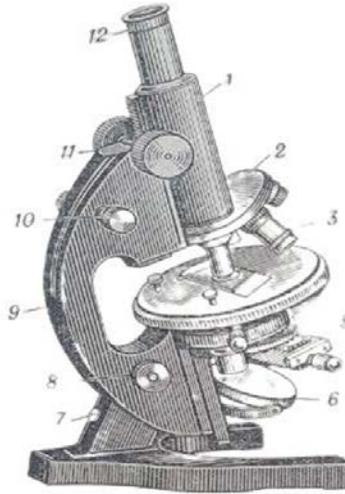


Рисунок 1 – Устройство биологического (светового) микроскопа:  
1 – тубус; 2 – револьвер; 3 – объектив; 4 – предметный столик;  
5 – осветительный аппарат (конденсор); 6 – зеркало; 7 – ножка;  
8 – шарнир; 9 – колонка; 10 – микрометрический винт;  
11 – макрометрический винт; 12 – окуляр

Штатив микроскопа изготавливается целиком из металла и должен быть устойчивым. Колонка служит ручкой для переноса микроскопа (при переносе или установке микроскопа нельзя держать его за тубус). Предметный столик, на который кладут изучаемый препарат, передвигается при помощи винтов в двух взаимно перпендикулярных направлениях. В тубус микроскопа сверху вставлен окуляр, а в нижней части он снабжен вращающимся по кругу «револьвером», в отверстия которого ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно подвести под отверстие тубуса любой объектив, который с помощью особой пружинки закрепляется на месте. Тубус состоит из двух трубок, вдвинутых одна в другую. Большинство объективов дает наилучшее изображение при длине тубуса 160 мм. Тубус передвигается вверх и вниз с помощью двух систем: для грубого передвижения служит макрометрический винт. Им пользуются при слабых увеличениях, а также при сильных объективах для первоначальной грубой установки.

Для более точной установки служит микрометрический винт. Обращение с ним требует особой осторожности. Тубус при помощи этих двух винтов устанавливается так, чтобы получить наиболее ясную микроскопическую картину. Это достигается, когда расстояние от рассматриваемого объекта до объектива равно фокусному расстоянию данного объектива.

Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсора с диафрагмой. Зеркало служит для отражения световых лучей по направлению к объективу и через него внутрь микроскопа. Одна сторона зеркала плоская, другая вогнутая. При работе с конденсором пользуются плоским зеркалом. Конденсор состоит из системы сильных линз, предназначенных для собирания лучей, идущих от зеркала, в одной точке – фокусе, который должен находиться в плоскости рассматриваемого препарата.

При микроскопировании с дневным светом конденсор должен быть поднят до уровня предметного столика. При искусственном освещении конденсор опускают до тех пор, пока при малом увеличении изображение источника света не появится в плоскости препарата. При изучении неокрашенных объектов следует опускать конденсор.

Объем лучей, сообразно с потребностями исследования, регулируется диафрагмой, находящейся под конденсором, которая при помощи рычага может суживаться и расширяться. Окрашенные препараты рассматривают при совершенно открытой диафрагме. При рассматривании неокрашенных объектов следует сузить отверстие диафрагмы, причем приходится тем сильнее закрывать его, чем тоньше структура изучаемого объекта.

Объективы составляют самую важную часть микроскопа. Каждый из них представляет собой систему линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя (фронтальная) линза – самая маленькая, является главной, производящей увеличение. Лежащие за ней линзы называются коррекционными, они предназначены для устранения недостатков оптического изображения.

В современных микроскопах на оправе объективов указано производимое ими увеличение, например:  $\times 8$ ,  $\times 40$ ,  $\times 90$ ,  $\times 100$ . Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния и, следова-

тельно, от кривизны фронтальной линзы. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние, и тем больше увеличение объектива.

Все объективы разделяются на сухие и иммерсионные, или погружные. *Сухим* называют такой объектив, между фронтальной линзой которого и рассматриваемым препаратом, находится воздух. При этом ввиду разницы показателей преломления стекла (на котором находится изучаемый препарат) и воздуха часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя.

При исследовании микробов применяется *иммерсионный*, или *погружной в масло*, объектив. Его преимущество перед сухими объективами состоит в том, что между стеклом и линзой устанавливается однородная (гомогенная) среда (стекло препарата – масло – стекло объектива) с одинаковым показателем преломления. Благодаря этому все лучи, не преломляясь и не изменяя направления, попадают в объектив, чем и достигается наилучшее освещение мельчайших объектов. Для этого обычно пользуются кедровым маслом, показатель преломления которого (1,52) почти равен показателю преломления стекла.

Иммерсионный объектив, называемый также «масляной» системой, требует особенно осторожного обращения. Так как фронтальная линза имеет очень короткое фокусное расстояние до исследуемого объекта, опускать объектив нужно крайне осторожно, чтобы не раздавить стекла препарата, что связано с серьезной порчей линзы. Погружать иммерсионный объектив в капле масла на стекле нужно очень осторожно, смотря сбоку. После погружения объектива в каплю масла вращением сначала макро-, а затем и микрометрического винта устанавливают четкое изображение объекта. При отсутствии кедрового масла пользуются его заменителями, например, касторовым, укропным, вазелиновым маслом и др.

Окуляры имеют две линзы: верхняя называется главной, нижняя – собирающей. Расстояние между линзами равно полусумме их фокусных расстояний. С уменьшением фокусного расстояния повышается увеличение окуляра; более сильными будут короткие окуляры, а более слабыми длинные. Окуляры обозначают по тому увеличению, которые они дают, например:  $\times 5$ ,  $\times 7$ ,  $\times 10$ ,  $\times 12$ ,  $\times 15$ .

Общее увеличение микроскопа равняется произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Таким образом, например, комбинация иммерсионного объектива с показателем увеличения  $\times 90$  и окуляром  $\times 10$  дает увеличение объекта в 900 раз и т. д. Микроскопы, употребляемые в повседневной работе, дают увеличение порядка в 700–900–1000 раз. При пользовании этими микроскопами пределом видимости являются объекты размером не меньше 0,2 мкм. Для измерения размеров микроорганизмов используются окуляр-микрометры с вмонтированной в них масштабной сеткой с делениями.

Современные микроскопы имеют ряд усовершенствований для улучшения изображения и расширения границы видимости. Первое достигается введением в практику микроскопов-бинокуляров, второе – исследованием в темном поле зрения.

**Бинокулярный микроскоп** имеет обычный для микроскопа оптический предел, но обладает преимуществом в самом процессе микроскопирования. В нем колонка имеет насадку с двумя тубусами, следовательно, и с двумя окулярами. При наблюдении объекта обоими глазами одновременно достигается большая резкость глубины, пластичность изображения, меньше утомляется зрение.

**Исследование в темном поле.** Микроскоп с темным полем зрения отличается от обычного микроскопа способом освещения препарата: применяется яркое боковое освещение, вследствие чего получается изображение светящегося объекта на темном фоне. При этом косые лучи не попадают в объектив и, следовательно, в глаз наблюдателя, в силу чего поле зрения оказывается совершенно неосвещенным (темное поле зрения). В глаз наблюдателя попадают только лучи, натолкнувшиеся на своем пути на исследуемый объект и отраженные от него. Боковое освещение в микроскопе можно получать, используя конденсор или объектив с затемненным центром или более просто, вкладывая между линзами конденсора кружок черной бумаги с оставлением незначительной периферической части линз.

Объекты, которые можно наблюдать при помощи косо́го освещения в темном поле зрения, измеряются 0,06–0,04–0,02 мкм, т. е. лежат за пределами видимости в обычном микроскопе. В то

же время и более крупные объекты при пользовании темным полем в ряде случаев оказываются в более благоприятных условиях для изучения, так как они лучше видны вследствие контраста между ними и темным полем зрения. Этим методом удобно пользоваться для наблюдения за подвижностью микробов в живом состоянии.

### Техника микроскопии

Каплю исследуемого материала на предметном стекле накрывают покровным стеклом (следить, чтобы не было пузырьков воздуха!). На обе поверхности препарата помещают каплю кедрового масла, чтобы проходящие лучи света не преломлялись, и микроскопируют с иммерсионной системой. При микроскопии с сухой системой на конденсор наносят каплю воды.

**Люминесцентная микроскопия** основана на способности некоторых объектов и красителей светиться при освещении их ультрафиолетовыми лучами, синими или другими коротковолновыми лучами света. Различают собственную (первичную) люминесценцию и наведенную (вторичную). При первичной люминесценции исследуемый объект содержит вещества, способные флюоресцировать при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Большая часть объектов не обладает собственной люминесценцией, поэтому при люминесцентной микроскопии пользуются обработкой объекта красителями, способными флюоресцировать. Такие красители получили название *флюорохромов*. В качестве флюорохромов применяются акридиновый желтый, ауорофосфин и др.

Люминесцентные микроскопы – обычные микроскопы, которые снабжены источником ультрафиолетового света и набором светофильтров. Светофильтры необходимы, во-первых, для выделения коротковолновой части спектра, которая и возбуждает люминесценцию, и, во-вторых, для отсеивания уже прошедшего через объект возбуждающего света. Первый фильтр помещают перед источником света, а второй – в окуляре микроскопа. Расположенный в окуляре светофильтр пропускает только люминесцентное свечение препарата.

Приготовление препарата для люминесцентной микроскопии несложно: на предметном стекле каплю исследуемого материала

смешивают с каплей раствора флюорохрома и покрывают покровным стеклом. Люминесцентная микроскопия находит все более широкое применение в микробиологии для быстрой диагностики ряда заболеваний.

**Фазово-контрастная микроскопия** применяется для изучения неокрашенных препаратов, живых объектов, размножения микроорганизмов и т. д. Исследование таких объектов может проводиться и в затемненном поле зрения (при суженной диафрагме и опущенном конденсоре), и в темном поле. Однако оба метода не дают возможности рассмотреть детали изучаемого препарата. Метод фазово-контрастной микроскопии позволяет в прозрачном, при обычной микроскопии, препарате изучить внутреннее строение микроорганизма.

При прохождении пучка света через окрашенный препарат происходит изменение интенсивности света, т. е. меняется амплитуда световой волны. Такие амплитудные изменения легко улавливаются человеческим глазом. Тот же пучок света, проходя через прозрачный неокрашенный препарат, не теряет своей интенсивности, а меняется только скорость прохождения света через объект, т. е. изменяется фаза колебания света. Такие фазовые колебания глаз не воспринимает. С помощью фазоконтрастного устройства и происходит превращение фазовых невидимых изменений – в амплитудные контрастные, видимые.

Фазоконтрастное приспособление состоит из специального фазового конденсора, содержащего кольцевую диафрагму, и набора объективов, в которые вставлены фазовые пластинки в форме кольца. Конденсор и объективы устанавливаются на обычном микроскопе. Пучок света, проходя через кольцевую щель диафрагмы и объект, попадает в кольцо фазовой пластинки объектива и глаз наблюдателя.

Метод фазовых контрастов может быть положительным (на светлом фоне темное изображение объекта) или отрицательным (на темном фоне светлое изображение). Лучшие результаты наблюдаются при положительном фазовом контрасте. Основным условием фазово-контрастной микроскопии является максимальная освещенность препарата, которая лучше всего достигается установкой по методу Келлера. Объектом исследования может

служить зубной налет, приготовленный методом раздавленной капли. Необходимо следить за тем, чтобы предметное стекло было обезжиренным, а покрывное – не толще 0,17 мм.

**Установка фазово-контрастного устройства.** *Первый этап* – наведение света по Келлеру. Из обычного микроскопа вынимают конденсор и на его место вставляют фазовый конденсор. Вращая подставку конденсора, устанавливают в отверстие конденсора цифру 0. Объективы микроскопа также меняют на фазовые. Зеркало устанавливают плоской стороной под углом 45°. На предметный столик помещают окрашенный препарат. При малом увеличении препарат четко освещается. Затем суживают ирис-диафрагму осветителя и диафрагму конденсора. На зеркало кладут кусочек белой бумаги, на котором хорошо видна нить накала в виде змейки. Патрон лампочки осветителя двигают вперед и назад до тех пор, пока фигура нити накала не приобретает четкую форму прямоугольника или квадрата.

Затем открывают до предела диафрагму конденсора.

*Второй этап* – установка фазового контраста. Вынимают окуляр и на его место вставляют вспомогательный микроскоп, который увеличивает фазовое кольцо и дает возможность установить соответствие фазового кольца объектива кольцу диафрагмы. Внутреннюю часть трубки вспомогательного микроскопа поднимают до тех пор, пока не будет видно резкое изображение фазового кольца объектива. Затем поворачивают подставку конденсора по часовой стрелке до появления в отверстии цифры 20, в окуляре видно темное фазовое кольцо объектива и диафрагмы. Поднимая и опуская внутренний тубус вспомогательного микроскопа, добиваются четкого изображения колец. Совмещение колец в одно кольцо достигается движениями боковых винтов конденсора. Вынимают вспомогательный микроскоп, вставляют окуляр и изучают неокрашенный препарат.

**Электронный микроскоп** – вместо световых лучей используется поток электронов, длина волны которых составляет 1/100000 длины света. Поэтому при электронной микроскопии можно рассматривать объекты, размер которых в 50–100 раз меньше видимых в обыкновенном микроскопе.

Электронный микроскоп дает увеличение в 20000–40000 раз. При последующем оптическом увеличении в 4–5 раз можно получить полезное увеличение в 100000–200000 раз.

По расположению линз и ходу лучей электронный микроскоп очень похож на проекционный светооптический микроскоп. В зависимости от того, из каких линз собран микроскоп, различают электростатические и электромагнитные микроскопы. Источником электронов в этом приборе является электронная пушка (электроннолучевая трубка с катодом, состоящим из раскалённой нити, и анодом-цилиндром). Вылетевшие из нити электроны разгоняются высоким электрическим напряжением (50000–100000 V.) Вышедший из электронной пушки пучок электронов попадает в конденсорную электромагнитную линзу, которая сводит их на рассматриваемый предмет, лежащий на тонкой (1/1000000 см) пленке коллодия. После этого лучи попадают на объективную электромагнитную линзу, собирающую расходящиеся лучи и дающую первое (промежуточное) увеличение предмета.

Это изображение можно наблюдать на специальном промежуточном экране. В центре его сделано маленькое отверстие (апертурная диафрагма). Небольшая часть первого увеличенного изображения, равная отверстию промежуточного экрана, служит «предметом» для дальнейшего увеличения. Поток электронов через это отверстие попадает на проекционную электромагнитную линзу, снабженную апертурной диафрагмой. Второе увеличенное изображение, даваемое проекционной линзой, принимается на флюоресцирующий экран или на фотографическую пластинку. Можно прибегнуть также к последующему оптическому увеличению.

С помощью электронной микроскопии удалось обнаружить многие важные особенности и детали морфологии микроскопических организмов – бактерий, вирусов, бактериофагов и др.

## **Методические рекомендации к выполнению практических заданий**

*Освоить технику микроскопии  
окрашенных препаратов с иммерсионной системой:*

1. Подготовить биологический микроскоп для работы с иммерсионной системой. Поднять конденсор до отказа, диафрагма конденсора полностью открыта.

2. Установить хорошее освещение поля зрения с помощью плоского зеркала и объектива  $\times 8$ .

3. Перевести объектив  $\times 8$  на объектив иммерсионный  $\times 90$ .

4. На мазок нанести каплю иммерсионного масла и погрузить объектив в масло под контролем глаза.

5. Смотря в окуляр, с помощью макровинта найти изображение мазка.

6. С помощью микровинта добиться четкого изображения мазка. Обратит внимание на форму, размеры, расположение, окраску микробов.

7. После окончания работы перевести микроскоп в нерабочее положение: для этого поднять колонку штатива микроскопа макровинтом, снять препарат и удалить иммерсионное масло с объектива, с препарата фильтровальной бумагой осторожными промокательными движениями, установить объективы вне отверстия предметного столика и опустить колонку штатива.

8. Провести иммерсионную микроскопию готового микропрепарата (мазка) из чистой культуры стафилококка и эшерихий, зарисовать в рабочие тетради.

9. На каждом занятии ко всем зарисовкам микропрепаратов делают аннотацию по следующей форме:

а) латинское название микроорганизма;

б) способ окраски (при простом методе указывают наименование красителя);

в) краткое описание микроскопической картины.

10. Ознакомиться с таблицей (стендом) «Основные формы бактерий», сфотографировать, перенести в рабочую тетрадь уметь рисовать и писать латинские названия.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие задачи выполняет медицинская микробиология?
2. Организация микробиологической лаборатории, правила работы и основы техники безопасности.
3. Методы микроскопического изучения микроорганизмов:
  - а) световой микроскоп, техника микроскопии, окрашенных препаратов с иммерсионной системой;
  - б) фазово-контрастная микроскопия, сущность и назначение;
  - в) принципы люминесцентной микроскопии;
  - г) электронно-микроскопические методы изучения микроорганизмов.
4. Устройство биологического микроскопа и правила работы с ним.
5. Иммерсионная система, её преимущество, правила работы с иммерсионным объективом.
6. Как определить увеличение микроскопа? Что такое разрешающая способность микроскопа и от каких факторов она зависит?
7. Размеры микробов, способы их определения.
8. Принцип работы фазово-контрастного микроскопа.
9. Принцип работы люминесцентного микроскопа.
10. Принцип работы электронного микроскопа. Какие основные отличия электронного микроскопа от светового?

## УИР № 2

### Тема: ФОРМЫ БАКТЕРИЙ. МЕТОДЫ ИХ ИЗУЧЕНИЯ

#### План

1. Морфология (основные формы бактерий).
2. Техника приготовления препарата – мазка из чистой культуры бактерий и исследуемого материала. Окраска простым методом. Анилиновые красители.
3. Микроскопия мазков из чистых культур кокковидных, палочковидных и извитых форм бактерий.
4. Приготовление мазка из зубного налета по Бурри.

#### Учебный материал

Морфология микроорганизмов включает: форму, размер, расположение особей в препарате, структурные компоненты (жгутики, капсула, споры, включения), тинкториальные свойства (способность воспринимать окраску).

**Бактерии** – это одноклеточные организмы, сложные живые существа. При этом одна клетка соответствует целому организму со всеми присущими ему свойствами и функциями. Размеры клеток измеряются в микрометрах.

*Бактерии имеют различные размеры, форму и расположение клеток относительно друг друга. Эти признаки называются морфологическими и являются дифференциально-диагностическими признаками, позволяющими отличить бактерии друг от друга.*

Выделяют 3 основные формы бактерий: шаровидная, цилиндрическая (палочковидная), извитая. В соответствии с этим все бактерии делятся на следующие группы: кокки, палочки, извитые формы.

**Кокки** имеют шаровидную (округлую) форму и размеры 0,5–1,5 мкм. В процессе деления молодые новые клетки могут сохранять связь между собой, образуя различные сочетания.

По взаимному расположению клеток кокки подразделяются на:

- *микрোকки* (род *Micrococcus*) – клетки располагаются одиночно, например, сапрофиты, обитатели воды, воздуха;
- *диплококки* (род *Diplococcus*) – располагаются по две клетки, так как клетки делятся в одной плоскости и не расходятся. К патогенным диплококкам относятся: пневмококки – возбудители пневмонии; гонококки – возбудители гонореи; менингококки – возбудители менингита;
- *стрептококки* (род *Streptococcus*) – располагаются в виде цепочки клеток, так как клетки делятся в одной плоскости и в одном направлении, и связь между ними сохраняется. Это микроорганизмы, вызывающие гнойно-воспалительные процессы у человека и животных;
- *тетракокки* (род *Tetracoccus*) – располагаются по 4 клетки, так как они делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и не расходятся. Это сапрофиты – крайне редкие возбудители заболеваний;
- *сарцины* (род *Sarcina*) – располагаются в виде пакетов (кубиков) клеток, так как они делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и не расходятся, например, сапрофиты, обитатели воздуха;
- *стафилококки* (род *Staphylococcus*) – образуют упорядоченные скопления в виде виноградной грозди, так как делятся в разных направлениях без особой правильности и не расходятся. Эти микробы играют большую роль в патологии человека, являясь гноеродными кокками.

Кроме круглой формы, кокки могут иметь овальную или ланцетовидную форму – *пневмококки*; бобовидную (кофейное зерно) форму – *менингококки*, *гонококки*.

**Палочки** имеют цилиндрическую форму и размеры  $1-8 \times 0,5-2$  мкм. Это самая многочисленная и разнообразная группа бактерий. Палочки могут быть правильной и неправильной формы, прямыми или слегка изогнутыми в виде запятой – холерный вибрион. Концы палочек могут быть как обрезанными – возбудитель сибирской язвы, так и закругленными – кишечная палочка, заостренными – фузобактерии или в виде утолщения, и тогда палочка похожа на булаву – возбудители дифтерии.

Те палочки, которые не образуют спор, называются *бактериями* (род *Bacterium*, обозначаются – *Bact.* или *B.*). Аэробные палочки, образующие споры, называются *бациллами* (род *Bacillus*, обозначаются – *Bac.*). Анаэробные палочки, образующие споры, называются *кловстридиями* (род *Clostridium*, обозначаются – *Cl.*).

Большинство палочек располагается беспорядочно, поодиночке, так как после деления клетки расходятся. Однако они могут образовывать различные сочетания, если после деления клетки остаются связанными общими фрагментами клеточной стенки:

- *диплобактерии* и *диплобациллы* (спорообразующие) – палочки, соединенные по две;
- *стрептобактерии* и *стрептобациллы* (спорообразующие) – палочки, соединенные в цепочки;
- палочки могут располагаться под углом друг к другу в виде букв V или X (возбудители дифтерии).

Морфологические отличия палочек иногда играют существенную роль для дифференциации вида возбудителя при исследовании патологического материала под микроскопом (например, возбудитель сибирской язвы – бациллы прямоугольной формы с резко обрубленными концами, располагающимися в виде дипло- или стрептобацилл).

Среди палочек насчитывается значительное количество болезнетворных видов.

**Извитые формы** имеют изгибы в виде одного или нескольких оборотов спирали. Клетки отличаются по длине и толщине, а также по количеству и характеру завитков. Длина клеток варьируется от 5 до 30 мкм при толщине 0,25–1 мкм.

*Спириллы* имеют изгибы, напоминающие спираль. К патогенным спириллам относятся возбудитель содоку (болезнь укуса крыс) – *Spirillum minor*.

*Спирохеты* – тонкие, длинные, извитые (спиралевидной формы) бактерии, отличающиеся от спирилл подвижностью, обусловленной «сгибательными» изменениями клеток. Спирохеты состоят из наружной мембраны (клеточной стенки), окружающей протоплазматический цилиндр с цитоплазматической мембраной и аксиальной нитью (аксистилю). Аксиальная нить находится под

наружной мембраной и закручивается вокруг протоплазматического цилиндра спирохеты, придавая ей винтообразную форму (первичные завитки спирохет). Аксиальная нить состоит из фибрилл – аналогов жгутиков бактерий, и содержит сократительный белок флагеллин. Фибриллы прикреплены к концам клетки и направлены навстречу друг другу, другой конец фибрилл свободен. Число и расположение фибрилл варьируют у разных видов. Фибриллы участвуют в движении спирохет, придавая клеткам вращательное, сгибательное и поступательное направление. При этом спирохеты образуют петли, завитки, изгибы, которые получили название вторичных завитков.

Спирохеты, плохо воспринимающие красители, обычно окрашивают по методу Романовского – Гимзы или серебрением. В живом виде их исследуют с помощью фазово-контрастной или темнопольной микроскопии.

Спирохеты представлены 3 родами, патогенными для человека: *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*. Спирохеты рода *Treponema* имеют по 8–12 равномерных мелких завитков. Патогенными представителями являются *T. pallidum* – возбудитель сифилиса – и *T. pertenue* – возбудитель тропической болезни фрамбезии. Имеются и сапрофиты – обитатели полости рта или ила водоемов. Спирохеты рода *Borrelia* более длинные, имеют по 3–8 крупных завитков. К ним относится возбудитель возвратного тифа *B. recurrentis*. Спирохеты рода *Leptospira* имеют неглубокие и частые завитки в виде закрученной веревки. Концы этих нитевидных спирохет изогнуты наподобие крючков с утолщениями на концах. Образуя вторичные завитки, они приобретают вид букв S или C. Патогенный представитель – *L. interrogans* и др. Патогенные лептоспиры попадают в организм с водой или пищей, приводя к развитию кровоизлияний и желтухи. Сaproфитные представители обитают в воде.

**Хламидии** – бактерии сферической формы, неподвижные, не образующие спор и капсул, грамотрицательные. Являются облигатными внутриклеточными паразитами. Имеют сложный жизненный цикл, включающий образование двух основных форм: элементарное тельце и ретикулярное тельце.

*Элементарное тельце* (ЭТ) – внеклеточная, высокоинфекционная форма. Это мелкая овоидная клетка, размером 0,25–0,5 мкм. С толстой, ригидной клеточной стенкой, цитоплазматической мембраной и цитоплазмой с большим количеством рибосом и нуклеоидом, представляющим собой двунитевую кольцевую ДНК. ЭТ способны к адсорбции и проникновению в чувствительные клетки путем эндоцитоза. По методу окраски Романовского – Гимзы ЭТ окрашиваются в красный цвет.

*Ретикулярное тельце* (РТ) – делящаяся репродуктивно, внутриклеточная форма, представлена крупными сферическими клетками размером 1,0–1,5 мкм, окруженная тонкой оболочкой – мантией. По Романовскому – Гимзе РТ окрашиваются в голубой цвет. Внутри клетки РТ размножаются путем бинарного деления и превращаются в ЭТ нового поколения. Такой цикл продолжается 40–72 часа и завершается разрывом клетки, выходом ЭТ хламидий в межклеточное пространство путем экзоцитоза или лизиса клетки. Вышедшие из клетки ЭТ внедряются в другие клетки, где цикл развития повторяется. Хламидии являются возбудителями трахомы, конъюнктивитов, урогенитального хламидиоза, орнитоза и др. болезней человека.

**Микоплазмы** – мелкие бактерии, окруженные цитоплазматической мембраной и не имеющие клеточной стенки. Относятся к классу – *Mollicutes* – «мягкокожие». Из-за отсутствия клеточной стенки микоплазмы имеют разнообразную форму: кокковидную, нитевидную, колбовидную. Величина клеток варьируется от ультрамикроскопических размеров (200 нм), способных проходить через бактериальные фильтры, до крупных размеров – 1,5 мкм. Эти формы видны при фазово-контрастной микроскопии чистой культуры микоплазм. Патогенные микоплазмы вызывают хронические инфекции: плевропневмонию крупного рогатого скота, пневмонию человека и поражение мочеиспускательного тракта.

**Актиномицеты** – ветвящиеся грамположительные бактерии. Свое название (*греч.* actis – луч, тусе – гриб) они получили в связи с образованием в пораженных тканях друз – гранул, из плотно переплетенных нитей в виде лучей, отходящих от центра и заканчивающихся колбовидными утолщениями.

Актиномицеты, как и грибы, образуют мицелий – нитевидные переплетающиеся клетки – гифы. Они формируют субстратный мицелий, образующийся в результате возрастания клеток в питательную среду, и воздушный, – растущий на поверхности среды. Актиномицеты могут делиться путем фрагментизации мицелия на клетки, похожие на палочковидные и кокковидные бактерии. На воздушных гифах актиномицетов образуются споры, служащие для размножения.

Большинство актиномицетов – свободноживущие сапрофиты, местом их обитания является почва. Среди них выявлены виды, активно продуцирующие антибиотические вещества. Обнаружены патогенные виды, поражающие людей и животных, вызывая актиномикоз.

Нокардиоформные актиномицеты образуют ветвящиеся формы, к ним относятся бактерии родов *Corinebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardii*. Патогенные актиномицеты вызывают актиномикоз, нокардии – нокардиоз, микобактерии – туберкулез и лепру, коринебактерии – дифтерию. Сапрофитные формы актиномицетов широко распространены в почве. Многие из них являются продуцентами антибиотиков.

У многих микроорганизмов форма и размеры клеток изменяются в зависимости от условий среды. Это свойство называется *полиморфизмом*.

При определенных, относительно стабильных условиях, микроорганизмы сохраняют присущие данному виду морфологические признаки, приобретенные в процессе эволюции, поэтому они являются важным критерием при их идентификации.

**Риккетсии** – прокариотические микроорганизмы, названные в честь американского микробиолога Г. Риккетса, погибшего в результате лабораторного заражения сыпным тифом. Риккетсии относятся к нескольким родам. Они представляют собой мелкие (0,3–0,6 мкм) полиморфные бактерии, имеющие кокковидную, палочковидную или нитевидную форму. Клеточная стенка построена по типу грамотрицательных бактерий. Риккетсии окрашивают по способу Романовского – Гимзы и по Здродовскому. Метод Здродовского – облегченная модификация метода Циля – Нильсена,

основанная на выявлении кислотоустойчивости риккетсий. Риккетсии являются облигатными внутриклеточными паразитами. Многие виды патогенны для людей, вызывают острые лихорадочные заболевания – риккетсиозы: сыпной тиф эпидемический и эндемический, пятнистая лихорадка скалистых гор, японская речная лихорадка и др.

**Техника приготовления препарата-мазка из чистой культуры бактерий и исследуемого материала. Окраска простым методом.**

### **Анилиновые красители**

Процесс приготовления мазка состоит из четырех этапов:

1. *Приготовление мазка*: на обезжиренное предметное стекло наносят каплю физиологического раствора, затем прокаленной остуженной петлей вносят небольшое количество культуры, эмульгируют, далее быстрыми круговыми движениями равномерно распределяют на площади диаметром 15–20 мм.

2. *Высушивание* препарата производят на воздухе.

3. *Фиксацию мазка* осуществляют двумя способами: фламбированием – для этого препарат проносят 2–4 раза над пламенем спиртовки мазком вверх; или фиксирующими жидкостями (формалин, этиловый спирт, метиловый спирт, ацетон, смесь спирта с эфиром по Никифорову).

Фиксация мазка инактивирует микроорганизмы, закрепляет их на поверхности стекла, предотвращает их смывание при последующем окрашивании, повышает восприимчивость клеток красителям.

4. *Окрашивание* препаратов проводится с помощью анилиновых красок. Способность клеток воспринимать различные краски отражает их тинкториальные свойства, что определяется структурой и составом клеточной стенки. Выделяют простые и сложные (дифференцирующие) методы окраски. В микробиологии используют различные красители, подразделяемые по их способности окрашивать определенные структурные образования микробных клеток.

## **Наиболее используемые красители:**

Основные (базофильные) краски:

### **Красные:**

- Нейтральный красный.
- Фуксин основной.
- Сафранин.

### **Синие:**

- Метиленовый синий

### **Фиолетовые:**

- генциановый фиолетовый
- кристаллический фиолетовый
- гемотоксилин

### **Зеленые:**

- малахитовый зеленый
- метиленовый зеленый

### **Коричневые:**

- везувин
- хризоидин

### **Черные:**

- индулин

Флюорохромы – группа красителей, способных флюоресцировать при той или иной длине волны возбуждающего света.

## **Методические рекомендации к выполнению практических заданий**

1. Основные формы бактерий. Нарисовать и написать латинские названия.
2. Окрасить мазок (*простой способ*):
  - а) нанести на мазок водный раствор красителя (фуксина на 1–2 мин или метиленового синего на 2–3 мин);
  - б) слить краску и промыть мазок водой;
  - в) высушить фильтровальной бумагой;

г) микроскопировать мазки с иммерсионной системой, определить вид микроба и зарисовать.

Провести иммерсионную микроскопию готовых микропрепаратов из чистой культуры стафилококков, стрептококков, эшерихий, сибиреязвенных палочек и зарисовать их.

3. Приготовить мазок по Бурри. На предметное стекло нанести каплю туши. Прокаленной и остуженной петлей взять зубной налет у шейки зуба и тщательно размешать в капле туши. Шлифованным предметным стеклом под углом 45° провести по предметному стеклу. Мазок высушить. Микроскопировать с иммерсионной системой.

*Результат:* на черном фоне видны неокрашенные микробные клетки. Мазок зарисовать.

4. Микроскопировать в темном поле зрения живую культуру лептоспир, проследить за характером их движения.

5. Изучить на таблицах:

- мазки из крови больных возвратным тифом, содержащие *Borrelia recurrentis*, окрашенные по Романовскому – Гимзе;
- мазки, из отделяемого твердого шанкра при сифилисе, содержащие *Treponema pallidum*, окрашенные серебрением;
- мазки из чистой культуры актиномицет – найти тонкие ветвящиеся нити и короткие палочковидные формы; мазки из ткани, пораженной актиномикозом, найти друзы актиномицет.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Нарисовать основные формы микробов и написать латинские названия.

2. Из каких этапов состоит процесс приготовления мазка?

3. Для чего осуществляют фиксацию мазка из культуры бактерий и как она проводится?

4. Что такое тинкториальные свойства бактерий? Для чего их изучают?

5. Назовите основные краски, применяемые для окраски микроорганизмов.

6. Что значит простой способ окраски микробов?

7. Как приготовить мазок по Бурри?

8. Морфологические особенности актиномицет. Структура гифов, строение друз. Формы существования актиномицет во внешней среде и в организме. Способы размножения.

9. Рассмотреть таблицы, содержащие риккетсий, окрашенных по Здродовскому и по Романовскому – Гимзе.

10. Морфологические особенности хламидий, цикл внутриклеточного развития. Какая форма хламидий является инфекционной? Методы выявления хламидий. Заболевания, вызываемые хламидиями.

11. Морфологические особенности микоплазм. Заболевания, вызываемые ими.

12. Морфологические особенности риккетсий и их типы по Здродовскому. Методы окраски риккетсий. Заболевания, вызываемые риккетсиями.

## УИР № 3

### Тема: СЛОЖНЫЕ (ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ) СПОСОБЫ ОКРАСКИ. СПОРООБРАЗОВАНИЕ У БАКТЕРИЙ

#### План

1. Окраска мазков по Граму.
2. Окраска кислотоустойчивых бактерий.
3. Спорообразование. Этапы. Выявление спор у микробов простым и сложным способами.

#### Учебный материал

*Сложные методы* окраски являются многоэтапными, мазок последовательно обрабатывают различными красками, протравами, дифференцирующими веществами и подразделяют на:

- дифференцирующие, позволяющие отличить одни виды бактерий от других (методы Грама, Циля – Нильсена);
- предназначенные для выявления различных структур бактериальной клетки (методы Ожешко – споры, Нейссера – включения волютина и др.).

#### *Окраска мазков по Граму в модификации Синёва:*

- Мазки накрыть фильтровальной бумагой, пропитанной раствором карболового генцианвиолета и налить воду на 2 мин.
- Снять пинцетом бумагу и слить краску. Не промывая водой, нанести раствор Люголя на 1 мин (мазок чернеет).
- Слить раствор Люголя и, не промывая водой, погрузить в спирт на 30 сек.
- Промыть водой и докрасить водным раствором фуксина 2 мин.
- Промыть мазки водой, высушить фильтровальной бумагой. Микроскопировать с иммерсионной системой.

*Результат:* *Грамположительный* – микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, *Грамотрицательный* – в красный.

Различное отношение бактерий к окраске по Граму зависит от строения клеточной стенки, имеющей существенные различия у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Большую часть массы (40–90 %) клеточной стенки грамположительных бактерий составляет многослойный пептидогликан, пронизанный тейховыми кислотами. В клеточной стенке грамотрицательных бактерий пептидогликана содержится меньше (5–10 %) и он одно-, двуслойный. Способность грамположительных бактерий при окраске по Граму удерживать генциановый фиолетовый в комплексе с йодом (результат – фиолетовая окраска бактерий) связана со свойством многослойного пептидогликана взаимодействовать с краской, а последующая обработка спиртом вызывает сужение пор в пептидогликане, что задерживает краску в клеточной стенке. Грамотрицательные бактерии вследствие меньшего содержания пептидогликана после воздействия спирта утрачивают краситель, обесцвечиваются и при обработке фуксином окрашиваются в красный цвет.

К грамположительным микроорганизмам относятся: все кокки, за исключением менингококков и гонококков; из палочковидных форм – все спорообразующие бациллы и клостридии, а также возбудители дифтерии, туберкулеза и проказы.

К грамотрицательным относятся: из палочковидных – эшерихии, сальмонеллы, шигеллы, франциселлы, иерсинии, бруцеллы и все извитые формы – трепонемы, боррелии, лептоспиры и др.

*Метод Циля – Нильсена* предназначен для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (микобактерии туберкулеза, проказы от некислотоустойчивых)

Кислотоустойчивыми называют бактерии, которые с трудом воспринимают красящие вещества, поэтому на них приходится действовать сильными, концентрированными растворами красок с подогреванием. При последующем действии кислот они не обесцвечиваются и, таким образом, могут быть дифференцированы от других микробов, не обладающих этим свойством.

Кислотоустойчивость связана с наличием в клеточной стенке липидов, жировосковых веществ и, особенно, миколовой кислоты. Кислотоустойчивые бактерии требуют интенсивной окраски концентрированным фуксином Циля при нагревании. Они прочно

удерживают краситель, не обесцвечиваются серной кислотой и остаются окрашенными в красный цвет. Некислотоустойчивые микробные клетки при обработке серной кислотой обесцвечиваются и далее окрашиваются метиленовым синим.

*Окраска кислотоустойчивых микробов по Цилю – Нильсену:*

- Готовый мазок из мокроты накрыть фильтровальной бумагой, налить раствор карболового фуксина. Подогреть над пламенем спиртовки до появления паров 2–3 раза, не доводя до кипения.
- Дать препарату остыть, снять бумагу, слить избыток краски, промыть препарат водой.
- Обесцветить препарат 5%-й серной кислотой в течение 2–3 сек. После обесцвечивания слить остаток кислоты и тщательно промыть мазок водой.
- Докрасить мазок метиленовым синим (водным раствором) в течение 3-х минут.
- Препарат промыть водой, высушить фильтровальной бумагой и микроскопировать с иммерсионной системой.

*Результат:* Кислотоустойчивые туберкулезные палочки окрашиваются в рубиново-красный цвет, неокислотоустойчивые микроорганизмы – в синий.

Метод Циля – Нильсена предназначен для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (микобактерии туберкулеза, проказы) от неокислотоустойчивых, составляющих подавляющее большинство микроорганизмов.

### **Спорообразование**

Процесс спорообразования происходит последовательно в 4 стадии: подготовительная стадия, стадия проросты, стадия образования оболочки, созревание.

Подготовительная стадия начинается с формирования спорогенной зоны внутри бактериальной клетки, представляющей собой уплотненный участок цитоплазмы с расположенным в нем нуклеоидом. Затем происходит образование проросты путем изолирования спорогенной зоны от остальной части цитоплазмы с помощью растущей внутри клетки ЦПМ. Между внутренним

и наружным слоями ЦПМ образуется кортекс (кора), состоящий из пептидогликана. В дальнейшем образуется наружная оболочка споры. В результате формируется многослойная, плохо проницаемая оболочка, в состав которой входят липиды, белки, дипиколиновая кислота, кальций, обуславливающие термоустойчивость спор. Затем вегетативная часть клетки отмирает, и спора сохраняется во внешней среде в течение длительных сроков, измеряемых многими месяцами и годами.

Чрезвычайно высокая устойчивость спор к физическим и химическим факторам имеет существенное эпидемиологическое значение, поскольку способствует сохранению источника инфекции и загрязнению окружающей среды.

В благоприятных условиях споры прорастают, проходя три последовательные стадии: активации, инициации, прорастания.

*Активация* – это готовность к прорастанию. Спора набухает, что связано с увеличением в ней количества воды, активации ферментов, участвующих в метаболизме.

*Инициация* характеризуется разрушением оболочки споры и выходом из нее ростовой трубки, после чего завершается синтез клеточной стенки, и сформировавшаяся вегетативная клетка начинает делиться.

*Прорастание споры* проходит в течение 4–5 часов, в то время как образование споры продолжается 18–20 часов. При этом из одной споры образуется одна бактериальная клетка. Споры – своеобразная форма покоящихся бактерий, образующихся при неблагоприятных условиях существования – недостатке питательных веществ, неблагоприятной температуре, наличии вредных продуктов обмена, высыхании. Внутри бактериальной клетки образуется всего одна спора (эндоспора).

Образование спор способствует сохранению вида и не является способом размножения, как у грибов, поэтому споры рассматривают как форму сохранения наследственной информации бактериальной клетки в неблагоприятных условиях внешней среды.

Спорообразующие бактерии, у которых размер споры не превышает диаметр клетки, называются бациллами – *Bac. anthracis*. Спорообразующие бактерии, у которых размер споры превышает диаметр клетки, от чего они принимают форму веретена, называют кластридиями (от лат. *clostridium*). Это возбудители газовой гангрен-

ны: *Cl. perfringens*, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. histolyticum*; возбудители столбняка *Cl. tetani*, возбудители ботулизма *Cl. Botulinum*.

Форма и расположение спор в клетке являются видовым признаком бактерий, что позволяет отличать их друг от друга.

Споры с трудом вступают в физико-химические реакции с красками. Поэтому при простых способах окраски они не прокрашиваются, оставаясь бесцветными внутри окрашенных вегетативных тел бактерий. Споры кислотоустойчивые, окрашиваются по методу Ожешко в красный цвет, а вегетативная клетка – в синий.

### **Выявление спор**

*Простой способ.* На готовый мазок налить водный метиленовый синий на 3–5 мин или водный фуксин на 1–2 мин. Краску слить, промыть водой, высушить, микроскопировать с иммерсионной системой.

*Результат:* споры не окрашиваются, вегетативная часть клетки микроба окрашивается метиленовым синим в синий цвет или фуксином – в красный.

*Сложный способ по Ожешко* основан на кислотоустойчивости спор. Готовят густой мазок из культур спорообразующих микроорганизмов, высушивают на воздухе (но не фиксируют), наливают на мазок 0,5%-ю соляную кислоту и подогревают в течение 2 минут для протравливания (оболочка спор размягчается, что способствует ее прокрашиванию). Мазок промывают, высушивают и фиксируют в пламени спиртовки. Далее мазок окрашивают по Цилю – Нильсену.

*Результат:* споры окрашиваются в красный цвет, вегетативная часть клетки – в синий.

### **Методические рекомендации к выполнению практических заданий**

1. Готовые мазки из чистой культуры стафилококка, кишечной палочки и из смеси стафилококка с кишечной палочкой окрасить по Граму в модификации Синёва. Микроскопировать, зарисовать и подписать.

2. Фиксированный готовый мазок из мокроты больного туберкулезом окрасить по Цилю – Нильсену. Микроскопировать. Найти

в препарате рубиново-красные *Mycobacterium tuberculosis*, остальные элементы мокроты и некислоустойчивые бактерии синего цвета. Препарат зарисовать и подписать.

3. Готовые мазки из чистой культуры *Bac. subtilis* окрасить: один простым способом, другой сложным способом Ожешко. Микроскопировать и зарисовать.

4. Изучить таблицу микобактерии туберкулеза в мокроте, микобактерии проказы в тканях.

5. Изучить таблицы с готовыми окрашенными препаратами с характерным расположением спор: терминальное – у возбудителя столбняка *Cl. tetani* («барабанные палочки»), субтерминальное у возбудителя ботулизма *Cl. botulinum* («теннисные ракетки»), центральное – у возбудителя сибирской язвы *Bac. anthracis*.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие методы окраски называют сложными, дифференциальными, позволяющими разделить все бактерии на две группы?

2. Техника окраски по Граму (модификация Синёва).

3. Чем объясняется различное отношение микробов к окраске по Граму?

4. Каково строение клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий?

5. Назовите грамположительные и грамотрицательные микробы.

6. Какие микробы относятся к кислотоустойчивым? Чем обусловлена кислотоустойчивость?

7. Методика и результат окраски по Цилю – Нильсену? Опишите микроскопическую картину мазка из мокроты больного туберкулезом, окрашенного по Цилю – Нильсену.

8. Что такое спора микроба, её значение у прокариотов, структура, стадии спорогенеза?

9. Чем объяснить устойчивость спор к различным факторам внешней среды?

10. Какие микробы образуют споры? В чем отличие бацилл от клостридий?

11. Чем обусловлена кислотоустойчивость спор?

12. Методы выявления спор (простой и сложный).

## УИР № 4

### **Тема: СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУР БАКТЕРИЙ**

#### **План**

1. Особенности строения бактериальной прокариотической клетки и её отличие от клеток высших организмов (эукариот).
2. Основные структуры бактериальной клетки: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, нуклеоид. Дополнительные структуры – жгутики, пили, капсула, споры, включения.
3. Микробы, образующие капсулу только в организме и постоянно. Структура значение капсулы и методы выявления.
4. Волутиновые зерна, их химический состав, значение и методы окраски.
5. Жгутики, структура, расположение, значение. Выявление подвижности микробов.
6. Ультрамикроскоп, принцип работы.

#### **Учебный материал**

Основные отличия прокариотов от эукариотов состоят в том, что прокариоты не имеют:

- морфологически оформленное ядро, его эквивалентом является нуклеоид, представляющий собой замкнутую кольцевую двунитевую молекулу ДНК, прикрепленную в одной точке к цитоплазматической мембране (по аналогии с эукариотами эту молекулу называют хромосомой бактерий);
- сетчатого аппарата Гольджи;
- эндоплазматической сети;
- митохондрий;
- митотического цикла деления.

Размножение прокариотов происходит путем бинарного деления. При этом прокариоты существуют в гаплоидном состоянии,

т. е. имеют одну молекулу ДНК. Кроме этого, существует еще ряд признаков, характерных для прокариотов, также отличающих их от эукариотических особей:

- многочисленные инвагинации цитоплазматической мембраны (ЦПМ), которые называются мезосомами; они связаны с нуклеоидом и участвуют в делении клетки, спорообразовании и дыхании микробной клетки;
- специфический компонент клеточной стенки – муреин; по химический структуре это пептидогликан.

Электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов позволили выявить основные структурные элементы бактерий:

- клеточная стенка;
- цитоплазматическая мембрана;
- цитоплазма с включениями;
- генетический аппарат

и дополнительные структуры:

- капсула;
- жгутики;
- фимбрии, пили.

**Клеточная стенка** – прочная, упругая структура, придающая бактерии определенную форму и сдерживающая высокое осмотическое давление в клетке. Она участвует в процессе деления клетки и в транспорте метаболитов. У бактерий существует два основных типа строения клеточной стенки, свойственных грамположительным и грамотрицательным видам. Такое название они получили после того, как в конце XIX века датский врач Ханс Кристиан Грам обнаружил, что если бактерии обработать сначала карболовым раствором генцианвиолета, а затем йодом, после чего обесцветить спиртом, то бесцветные в обычных условиях клетки окрашиваются. Но у одних бактерий образуется прочная фиолетовая окраска (их назвали грамположительными), а у других – грамотрицательных – краситель смывается этиловым спиртом, поэтому их докрасивают водным раствором фуксина, и они приобретают красную окраску. Отношение бактерий к окраске по Граму зависит от структуры клеточной стенки.

В клеточной стенке *грамположительных* бактерий содержится небольшое количество полисахаридов, липидов и белков. Большую часть массы (40–90 %) клеточной стенки этих бактерий составляет пептидогликан (синонимы: муреин, мукопептид), связанный с тейхоевыми кислотами. В клеточной стенке *грамотрицательных* бактерий пептидогликана содержится меньше (5–10 %). Наружный слой клеточной стенки, состоящий из липополисахарида (ЛПС), обуславливает токсичность бактерии и отождествляется с эндотоксином. Липополисахарид является О-антигеном, по которому можно дифференцировать бактерии.

Клеточная стенка не является структурой, жизненно необходимой бактериальной клетки. Подтверждением этому служат микоплазмы, у которых отсутствует клеточная стенка, что является генетически детерминированным видовым признаком.

Бактерии в изменившихся условиях существования могут частично или полностью терять клеточную стенку. Это явление получило название L-трансформации, а образующиеся при этом формы бактерий – L-формами в честь института Листера в Лондоне. L-формы могут образовываться спонтанно или индуцированы воздействием определенных факторов, таких как антибиотики, ферменты, иммуноглобулины. Утрата клеточной стенки сопровождается изменением морфологии, тинкториальных, физиологических, биологических свойств бактерий, что затрудняет диагностику болезней.

Клетки, полностью утратившие клеточную стенку, называются протопластами, частично утратившие – сферопластами.

L-формы бактерий разных видов могут длительное время персистировать (оставаться) в макроорганизме, что способствует формированию хронических форм болезней.

**Цитоплазматическая мембрана** является трехслойной структурой и окружает наружную часть цитоплазмы бактерий; она состоит из двойного слоя фосфолипидов, пронизанного белками.

Функции цитоплазматической мембраны:

- метаболическая (содержит большое количество ферментов, осуществляющих все виды обменных процессов);
- регуляция осмотического давления, так как она полупроницаема;

- выделительная (экзоферменты, токсины, другие продукты метаболизма);
- энергетическая (транспорт электронов у аэробов);
- синтетическая (синтез компонентов клеточной стенки, в том числе и основных – пептидогликана, тейхоевых кислот, ЛПС, фосфолипидов);
- ее инвагинаты образуют мезосомы;
- в цитоплазматической мембране находятся центры роста, от которых образуется перегородка при делении клеток и спорообразовании.

**Цитоплазма** бактерий занимает основной объем клетки и представляет собой сложную коллоидную систему, состоящую из воды, растворимых белков, углеводов, липидов и минеральных соединений.

В цитоплазме содержатся многочисленные зернышки, богатые рибонуклеиновой кислотой. Это рибосомы, их более 50 тыс. Они образуют массу цитоплазмы и являются ее структурным скелетом. Бактериальные рибосомы являются белоксинтезирующей системой клеток, они могут стать мишенью для действия антибиотиков.

**Лизосомы – внутриклеточные образования.** Они содержат набор гидролитических ферментов, способных переварить как чужеродные вещества, так и собственные компоненты клеток.

В процессе жизнедеятельности клетки в ее цитоплазме образуются различные включения, представляющие собой скопления, продуктов обмена, либо запас питательных веществ.

Особое значение имеют **зерна волютина**, состоящие из белков-нуклеопротеидов, выполняющих роль запаса питательных веществ. Волютин накапливается во время роста, при голодании клеток они погибают. У одних микробов волютин встречается в большом количестве. Это – *Spirillum volutans* и свое название они получили потому, как впервые были обнаружены у этого микроба. По именам исследователей, впервые описавших волютиновые зерна, их называют зернами Бабеша – Эрнста. Зерна волютина имеют больший коэффициент преломления света, чем цитоплазма, благодаря чему обнаруживаются при микроскопировании в неокрашенных бактериях. Зерна волютина называют еще метахроматически-

ми в связи с тем, что при окраске они принимают иную окраску, чем цитоплазма. Располагаются зерна волютина то в центре, то на концах клетки. У дифтерийных палочек они располагаются биполярно, и этот признак настолько постоянный, что используется в микроскопической диагностике.

В цитоплазме имеются глыбки гликогена. Они являются резервуаром углеродного питания клетки, энергетическим материалом для ее развития.

В цитоплазме могут быть жироподобные вещества – липиды. Высокое содержание липидов обуславливает устойчивость микроорганизмов к кислотам, щелочам, спиртам и т. д. Наиболее богаты липидами туберкулезные палочки и палочки проказы.

Цитоплазматические включения волютина выявляют окраской по Леффлеру (простой способ) или по Нейссеру (сложный способ).

### **Окраска по Леффлеру:**

- На готовый мазок нанести щелочной раствор метиленового синего на 2 мин.
- Промыть водой, высушить и микроскопировать с иммерсионной системой.

*Результат:* тело микроба окрашено в светло-синий цвет, волютиновые зерна – в темно-синий.

### **Окраска по Нейссеру:**

- На готовый мазок нанести уксуснокислый метиленовый синий на 2 мин.
- Промыть мазок водой.
- Нанести на мазок раствор Люголя на 3–40 сек.
- Не промывая мазок водой, слить раствор Люголя и нанести везувин на 10–15 сек.
- Промыть водой, высушить, микроскопировать с иммерсионной системой.

*Результат:* тело микроба окрашено в желтый цвет, волютиновые зерна – в темно-синий, почти черный цвет.

**Ядро** имеет ведущее значение в жизнедеятельности клеток. Бактерии не имеют морфологически оформленного ядра, его экви-

валентом является нуклеоид, представляющий собой замкнутую, кольцевую двунитевую молекулу ДНК, прикрепленную в одной точке к цитоплазматической мембране. Нуклеоид не ограничен от цитоплазмы мембраной и по аналогии с эукариотами эту молекулу называют хромосомой. В цитоплазме бактерий нет сетчатого аппарата Гольджи, эндоплазматической ретикулярной сети митохондрий, митотического цикла деления.

**Плазмиды** – автономно реплицирующиеся кольцевые молекулы двунитевой ДНК с меньшей молекулярной массой, чем хромосома бактерий. Находясь, наряду с нуклеоидом, в цитоплазме, они несут наследственную информацию, которая, не являясь жизненно необходимой для микробной клетки, предоставляет ей те или иные селективные преимущества в окружающей среде. Наиболее известны плазмиды лекарственной устойчивости, которые обеспечивают циркуляцию среди микроорганизмов генов, детерминирующих устойчивость к используемым для лечения различных заболеваний химиотерапевтическим средствам.

**Капсула** представляет собой выраженный слизистый слой, покрывающий клеточную стенку снаружи. Капсульное вещество имеет полисахаридную, гликопротеиновую или полипептидную природу. Капсулу образует большинство патогенных бактерий, находясь только в организме человека или животных. Это стафилококки, стрептококки, менингококки, гонококки, возбудители чумы, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы, один из возбудителей газовой гангрены – *Cl. perfringens*. При культивировании бактерий капсула может появляться при добавлении к питательной среде нативного белка (например, у *Bac. anthracis*). Известны бактерии, образующие капсулу в любых условиях существования, как в организме, так и на питательных средах. Это представители рода *Klebsiella* – *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rinoscleromatis*.

Капсулы выполняют ряд важных функций. Они предохраняют бактерии от повреждений и высыхания, от действия неблагоприятных факторов среды обитания, в том числе от действия противомикробных агентов макроорганизма (системы комплемента, фагоцитов, противомикробных антител.) Поэтому капсулы относят к факторам вирулентности бактерий. Утрата капсул снижает патогенность бактерий.

Капсулу микроорганизмов выявляют:

- **простым методом окраски** в мазках из клинического материала (мокрота и гной). Для этого мазки окрашивают водными растворами фуксина или метиленовой синей. При микроскопии видны окрашенные тела бактерий, окруженные бесцветной капсулой;
- **сложным методом по Бурри – Гинсу**: для этого мазок, приготовленный по Бурри, фиксируют и окрашивают разведенным карболовым фуксином Циля. Фуксин окрашивает тела бактерий в красный цвет, капсулы остаются не окрашенными и хорошо видны вокруг бактерий на черном фоне туши.

**Жгутики.** Все бактерии подразделяются на подвижные и неподвижные. Органами движения у бактерий являются жгутики – тонкие эластические нити, в их состав входит белок флагелин, который по своей структуре относится к сократительным белкам типа миозина. Жгутики прикрепляются к базальному телу, состоящему из системы нескольких дисков, вмонтированных в цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку. Количество и расположение жгутиков у разных бактерий неодинаково. Длина жгутиков иногда в несколько раз больше длины тела самого микроба. По числу жгутиков и их расположению бактерии делятся на монотрихи, имеющие на конце тела один жгутик, лофотрихи, с пучком жгутиков на конце, у амфотрихов жгутики расположены на обоих полюсах клетки, а у перетрихов – по всей ее поверхности. Типичным представителем монотрихов является холерный вибрион, лофотрихов – хеликобактерии, амфитрихов – кампилобактерии, перитрихов – брюшнотифозная палочка.

**Пили** (*pili*, синоним – ворсинки, фимбрии) – тонкие полые нити белковой природы, длиной 0,3–10 мкм, толщиной 10 нм, покрывающие поверхность бактериальных клеток. В отличие от жгутиков не выполняют двигательную функцию. По своему функциональному назначению подразделяются на типы.

Пили общего 1-го типа обуславливают прикрепление или адгезию бактерий к определенным клеткам макроорганизма. Их количество велико – от нескольких сотен до нескольких тысяч на одну бактериальную клетку. Адгезия является первоначальной стадией любого инфекционного процесса.

Пили 2-го типа (синоним: конъюгативные, или половые) участвуют в конъюгации бактерий, обеспечивающей перенос части генетического материала от донорской клетки к реципиентной. Они имеются только у бактерий-доноров в ограниченном количестве (1–4 пили на клетку).

### **Методические рекомендации к выполнению практических заданий**

Подвижность микробов изучают в препаратах «раздавленная капля» и «висячая капля».

а) препарат **«раздавленная капля»**: чистое стекло слегка подогреть над пламенем спиртовки. Нанести на стекло каплю физиологического раствора. Суточную культуру сенной палочки петлей внести в каплю физиологического раствора на стекле, осторожно размешать и накрыть покровным стеклом;

б) препарат **«висячая капля»**: каплю культуры наносят на покровное стекло и накрывают специальным предметным стеклом с лункой, переворачивают. Приготовленные препараты рассматривают в затемненном поле зрения, т. е. при уменьшенной интенсивности освещения, что достигается опусканием конденсора и сужением диафрагмы, при этом обычно пользуются объективом  $\times 40$ , реже иммерсионным  $\times 90$ .

Более совершенными методами изучения живых объектов является темнопольная и фазово-контрастная микроскопия. Метод микроскопии в темном поле основан на освещении препарата лучами света, идущими в косом направлении и не попадающими в объектив, что делает поле зрения темным. В объектив попадают только те лучи, которые отражаются от имеющихся в препарате микробов и на темном фоне хорошо видны яркие светящиеся изображения бактерий. Освещение препарата косыми лучами создается с помощью специального темнопольного конденсора с затемненной центральной частью. Метод микроскопии в темном поле повышает разрешающую способность в десять раз. Он особенно ценен при изучении спирохет и при наблюдении за подвижностью микробов.

*Задание.* Изучить таблицы: мазки из чистой культуры *Klebsiella*, окрашенных по Бурри – Гинсу; мазки-отпечатки из ор-

ганов животных, зараженных *B. anthracis*, окрашенных водным раствором фуксина; жгутики и их различное расположение; мазки из чистой культуры дифтерийных палочек, окрашенных по Леффлеру и Нейссеру. Перенести в тетрадь, подписать.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что представляет собой капсула микробной клетки? Её химический состав и значение.
2. Какие микробы образуют капсулу только в организме и постоянно?
3. Как обнаружить капсулу у бактерий?
4. Каково строение клеточной стенки у бактерий, её значение?
5. Как называются микробы, лишённые полностью или частично клеточной стенки?
6. Цитоплазматическая мембрана, её состав и значение для микробов.
7. Цитоплазма бактерий, её строение, значение.
8. Включения бактериальной клетки, их значение.
9. Волютиновые зерна, их химический состав, значение. Методы окраски.
10. Ядерный аппарат бактерий, его значение.
11. Что такое плазмиды, их роль?
12. Чем обусловлена подвижность бактерий? Строение, химический состав и функция жгутиков. Выявление подвижности у бактерий.
13. Что представляют собой пили у бактерий? Их виды и значение.

# УТР № 5. КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА № 1 по разделу «МОРФОЛОГИЯ»

(собеседование, тестовый контроль,  
ситуационные задачи)

## Билет № 1

1. Нарисовать и написать латинские названия грамположительных микробов. Методика окраски по Граму. От чего зависит отношение микробов к окраске по Граму?

2. Понятия о виде, штамме, клоне бактерий, бактериальной культуре.

3. Цитоплазматические включения бактерий, их химическая природа, значение. Примеры микроорганизмов, для которых характерно наличие зерен волютина. Методы выявления зерен волютина.

4. Роберт Кох, его вклад в развитие микробиологии.

## ТЕСТЫ

### 1. Структуры, обязательные для L-форм бактерий:

- 1) клеточная стенка;
- 2) цитоплазматическая мембрана;
- 3) капсула;
- 4) жгутики;
- 5) нуклеоид.

### 2. Значение зерен волютина:

- 1) защита от неблагоприятных факторов;
- 2) сохранение формы;
- 3) запас питательных веществ;
- 4) участие в размножении;
- 5) дифференциальный признак.

### 3. Перитрихи – это бактерии с:

- 1) одним жгутиком;
- 2) двумя полярно расположенными жгутиками;

- 3) пучком жгутиков на конце;
- 4) множеством жгутиков, покрывающих всю поверхность бактериальной клетки;
- 5) тремя жгутиками.

**4. К перитрихам относятся:**

- 1) холерный вибрион;
- 2) спириллы;
- 3) хеликобактеры;
- 4) эшерихии;
- 5) сальмонеллы.

**5. При фиксации мазка происходит:**

- 1) гибель микробов;
- 2) прикрепление к стеклу;
- 3) усиление восприимчивости к красителю;
- 4) увеличение пептидогликана в клеточной стенке;
- 5) уменьшение пептидогликана в клеточной стенке бактерий.

**6. Различное отношение бактерий к окраске по Граму зависит от строения:**

- 1) цитоплазмы;
- 2) включений;
- 3) клеточной стенки;
- 4) цитоплазматической мембраны;
- 5) нуклеоида.

**Билет № 2**

1. Возбудители каких заболеваний являются кислотоустойчивыми? Методика их окраски. Чем обуславливается кислотоустойчивость?

2. Нарисовать и написать латинские названия капсульных микробов. Значение и методы выявления капсул.

3. Хламидии. Особенности морфологии, цикл внутриклеточного развития. Какая форма хламидий является инфекционной? Методы выявления хламидий.

4. Фазово-контрастный микроскоп, принцип устройства и работы, применение.

## ТЕСТЫ

### 1. Сложные методы окраски позволяют:

- 1) дифференцировать бактерии;
- 2) предельно морфологию микробов;
- 3) поставить диагноз заболевания;
- 4) изучить ультраструктуру бактериальной клетки;
- 5) обнаружить расположение бактериальных клеток.

### 2. Фазово-контрастная микроскопия используется при изучении препаратов:

- 1) окрашенных по Граму;
- 2) нативных «раздавленная капля» или «висячая капля»;
- 3) фиксированных метиловым спиртом;
- 4) окрашенных по Цилю – Нильсену;
- 5) верно все перечисленное.

### 3. Обязательный структурный компонент бактериальной клетки:

- 1) цитоплазматическая мембрана;
- 2) цитоплазма;
- 3) нуклеоид;
- 4) жгутики;
- 5) капсула.

### 4. Морфологические структуры, обуславливающие положительную или отрицательную окраску по Граму:

- 1) клеточная стенка;
- 2) цитоплазматическая мембрана;
- 3) цитоплазма;
- 4) нуклеоид;
- 5) капсула.

### 5. Клеточная стенка грамположительных бактерий содержит:

- 1) многослойный пептидогликан;
- 2) однослойный пептидогликан;
- 3) тейхоевые кислоты;
- 4) липополисахарид;
5. РНК.

**6. Таксономические категории, отражающие бинарную номенклатуру (название) микроорганизмов:**

- 1) царство, подцарство;
- 2) отдел, класс;
- 3) порядок, вид;
- 4) семейство, род;
- 5) род и вид.

**Билет № 3**

1. Нарисовать и написать латинские названия спорообразующих микробов. Значение спор. Стадии спорогенеза. Методы окраски спор.

2. Волутиновые зерна. Химический состав, значение. Методы окраски. Для возбудителя какого заболевания волутиновые зерна являются диагностическим признаком? Нарисуйте его.

3. Риккетсии, их таксономическое положение. Назовите патогенные для человека риккетсии и вызываемые ими заболевания. Морфологические особенности риккетсий. Формы существования риккетсий. Методы окраски риккетсий.

4. И.И. Мечников, его вклад в развитие микробиологии.

**ТЕСТЫ**

**1. Функция клеточной стенки:**

- 1) защитная;
- 2) формообразующая;
- 3) способность по-разному воспринимать красители;
- 4) сохранение наследственной информации;
- 5) избирательная проницаемость.

**2. Бактерии, не имеющие клеточной стенки:**

- 1) риккетсии;
- 2) спирохеты;
- 3) микоплазмы;
- 4) хламидии;
- 5) актиномицеты.

### **3. Цитоплазматическая мембрана представляет собой:**

- 1) выраженный слизистый слой, покрывающий клеточную стенку;
- 2) двойной фосфолипидный слой, пронизанный белковыми глобулинами;
- 3) жизненно необходимый структурный компонент бактериальной клетки;
- 4) сложную коллоидную систему;
- 5) сложный нуклеопротеид.

### **4. Функции цитоплазматической мембраны:**

- 1) регуляция поступления в клетку метаболитов, ионов;
- 2) участие в репликации ДНК;
- 3) сохранение наследственной информации;
- 4) участие в метаболизме;
- 5) белоксинтезирующая система клетки.

### **5. Локализация наследственной информации в бактериальной клетке:**

- 1) ЦПМ;
- 2) митохондрии;
- 3) мезосомы;
- 4) нуклеоид;
- 5) плазмиды.

### **6. Бактериоскопический метод исследования позволяет:**

- 1) определить форму и расположение клеток;
- 2) изучить ультраструктуру бактериальной клетки;
- 3) дифференцировать бактерии;
- 4) определить отношение бактерий к окраске;
- 5) поставить диагноз.

## **Билет № 4**

1. Основные принципы систематики прокариотов, таксономические категории: семейство, род, вид, биовар, серовар, фаговар. Бинарная номенклатура бактерий, пример.

2. Этапы приготовления мазка из чистой культуры бактерий, методы окраски.

3. Спорообразование, условия, стадии. Расположение спор, окраска простым и сложным способом, нарисовать микробы, образующие споры. Чем обусловлена устойчивость спор к воздействию факторов внешней среды?

4. Спирохеты, ультраструктура. Морфологические отличия спирохет *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*. Методическое изучение спирохет в живом состоянии в нативных препаратах. Темнопольная микроскопия, ее сущность и назначение.

## ТЕСТЫ

### 1. Роберт Кох разработал:

- 1) метод выделения чистых культур бактерий;
- 2) сформулировал понятие об иммунитете;
- 3) предложил анилиновые красители и конденсор;
- 4) открыл возбудителей туберкулеза, холеры;
- 5) разработал серологические реакции.

### 2. Кислотоустойчивость бактерий связана с наличием:

- 1) нуклеиновых кислот;
- 2) жировосковых веществ;
- 3) полисахаридов;
- 4) многослойного пептидогликана;
- 5) высоких концентраций солей.

### 3. Спирохеты отличаются от большинства бактерий наличием:

- 1) палочковидной формы;
- 2) дифференцированного ядра;
- 3) эластической осевой нити;
- 4) активного движения;
- 5) спорообразования.

### 4. Для риккетсий характерно:

- 1) неклеточная структура;
- 2) размножение делением;
- 3) положительная окраска по Граму;
- 4) полиморфизм;
- 5) внутриклеточный паразитизм.

**5. Капсулу в организме образуют только возбудители:**

- 1) холеры;
- 2) туберкулеза;
- 3) сибирской язвы;
- 4) пневмонии;
- 5) туляремии.

**6. Сконструировал микроскоп, увидел и зарисовал микробы:**

- 1) Луи Пастер;
- 2) Роберт Кох;
- 3) Илья Мечников;
- 4) Дмитрий Иванович;
- 5) Антоний ван Левенгук.

**Билет № 5**

1. Механизм и этапы окраски по Граму. В какой цвет при этом могут окрашиваться бактерии, почему? Нарисуйте и напишите латинские названия грамотрицательных микробов.

2. Особенности строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий. Значение клеточной стенки.

3. Простой способ окраски бактерий. Приготовление мазка по Бурри. Что выявляет метод Бурри?

4. Сравнительная характеристика боррелий трепонем, лептоспир (размер, количество и характер завитков, отношение к окраске по Романовскому – Гимзе.

**ТЕСТЫ**

**1. По количеству и расположению жгутиков различают:**

- 1) монотрихи;
- 2) сферопласты;
- 3) лофотрихи;
- 4) протопласты;
- 5) перитрихи.

**2. Споры микроорганизмов имеют значение для:**

- 1) размножения;
- 2) сохранения вида;

- 3) идентификации;
- 4) участия в метаболизме;
- 5) активного движения.

### **3. Споры образуют:**

- 1) бактерии;
- 2) бациллы;
- 3) клостридии;
- 4) микоплазмы;
- 5) хламидии.

### **4. Простой способ окраски позволяет определить в микробной клетке:**

- 1) споры;
- 2) капсулу;
- 3) кислостойчивость;
- 4) отношение к окраске по Граму;
- 5) волутиновые зерна.

### **5. Способность воспринимать красители (тинкториальные свойства) определяет структура и состав:**

- 1) цитоплазмы;
- 2) нуклеоида;
- 3) капсулы;
- 4) клеточной стенки;
- 5) плазмиды.

### **6. Какие морфологические структуры бактерий обуславливают окраску по Граму:**

- 1) цитоплазма;
- 2) капсула;
- 3) клеточная стенка;
- 4) цитоплазматическая мембрана;
- 5) волутиновые зерна.

## Билет № 6

1. Кислотоустойчивые бактерии. Механизм и этапы окраски по Цилю – Нильсену. Чем обусловлена кислотоустойчивость бактерий?

2. Особенности строения клеточной стенки грамотрицательных микробов. Нарисовать и написать латинские названия грамотрицательных микробов.

3. Нуклеоид бактерий, структура, функции.

4. Актиномицеты, формы существования актиномицет во внешней среде и в организме. Морфологические особенности актиномицет, структура нити и друзы.

## ТЕСТЫ

**1. Приготовление препарата для микроскопического исследования предусматривает:**

- 1) высушивание мазка на воздухе;
- 2) высушивание мазка в пламени;
- 3) фиксацию мазка в пламени;
- 4) фиксацию мазка спиртом;
- 5) окраску мазка без фиксации.

**2. Окрашивание по методу Циля – Нильсена применяют для выявления:**

- 1) ядерной субстанции;
- 2) включений;
- 3) кислотоустойчивости;
- 4) подвижности;
- 5) капсулообразования.

**3. Отношение микробов к окраске по Граму зависит от:**

- 1) формы и размера клетки;
- 2) строения цитоплазматической мембраны;
- 3) содержания пептидогликана в клеточной стенке;
- 4) формы колоний;
- 5) высоких концентраций солей.

#### **4. Антоний Левенгук первым:**

- 1) создал теорию иммунитета;
- 2) предложил питательные среды;
- 3) открыл фагоцитоз;
- 4) сконструировал микроскоп;
- 5) увидел и нарисовал микробов.

#### **5. Микоплазмы характеризуются отсутствием:**

- 1) цитоплазматической мембраны;
- 2) цитоплазмы;
- 3) нуклеоида;
- 4) клеточной стенки;
- 5) рибосом.

#### **6. Палочка с терминально расположенной спорой (напоминающая барабанную палочку), характерна для:**

- 1) *Cl. perfringens*;
- 2) *Cl. novyi*;
- 3) *Cl. tetani*;
- 4) *Cl. botulinum*;
- 5) *Cl. septicum*.

### **Билет № 7**

1. Строение бактериальной клетки. Нуклеоид бактерий, его отличие от ядер эукариотической клетки. Биологические функции нуклеоида, его химическая природа и строение. Цитоплазма бактерий. Перечислите структуры цитоплазмы, укажите отличия от эукариотических клеток.

2. Строение цитоплазматической мембраны бактериальной клетки, ее функции. Мезосомы, их строение, функции.

3. Споры бактерий, условия образования, значение. Процесс спорообразования, ультраструктура споры, ее прорастание. Нарисовать и написать латинские названия спорообразующих микробов. Окраска по способу Ожешки и простым способом.

4. Морфология, ультраструктура спирохет, строение двигательного аппарата. Сравнительная характеристика боррелий, тре-

понем лептоспир (размеры, количество и характер завитков, отношение к окраске по Романовскому – Гимзе). Микроскопическое изучение спирохет в нативных препаратах, темнопольная микроскопия.

## ТЕСТЫ

### 1. Бактерии, не имеющие клеточной стенки:

- 1) риккетсии;
- 2) спирохеты;
- 3) хламидии;
- 4) микоплазмы;
- 5) актиномицеты.

### 2. Цитоплазматическая мембрана бактерий:

- 1) играет важную роль в обмене веществ;
- 2) является осмотическим барьером;
- 3) контролирует поступление и выход различных веществ из клетки;
- 4) определяет форму клетки;
- 5) сохраняет наследственную информацию.

### 3. Цитоплазма бактерий:

- 1) сложная коллоидная система;
- 2) содержит дифференцированное ядро;
- 3) состоит из растворимых белков;
- 4) содержит до 50 тысяч рибосом;
- 5) не содержит включений гликогена, крахмала, волютина.

### 4. Мезосомы бактерий:

- 1) производные клеточной стенки;
- 2) производные ЦПМ;
- 3) не связаны с нуклеоидом;
- 4) участвуют в делении клетки;
- 5) участвуют в спорообразовании.

### 5. Плазмиды:

- 1) внехромосомные факторы наследственности;

- 2) автономная кольцевая молекула ДНК;
- 3) жизненно необходимая структура бактериальной клетки;
- 4) обуславливает селективные преимущества;
- 5) не способны к репликации.

**6. Спорообразующие микроорганизмы веретенообразной формы называются:**

- 1) бациллы;
- 2) бактерии;
- 3) микоплазмы;
- 4) клостридии;
- 5) риккетсии.

**Билет № 8**

1. Клеточная стенка, ее строение у грамположительных и грамотрицательных бактерий, функции, техника окраски по Граму. Нарисовать грамположительных микробов (названия по латыни). Протопласты, сферопласты, L-формы бактерий их свойства.

2. Ворсинки (пили, фимбрии), значение.

3. Жгутики, типы расположения, ультраструктура, способы выявления. Нарисуйте подвижные виды микробов (латинские названия).

4. Актиномицеты. Формы существования актиномицет во внешней среде и в организме. Отличительные морфологические особенности актиномицет, строение нити и друзы. Способы размножения.

**ТЕСТЫ**

**1. Роль капсулы в жизнедеятельности бактерий:**

- 1) усиливает болезнетворность;
- 2) является обязательным структурным компонентом клетки;
- 3) подавляет фагоцитоз;
- 4) является осмотическим барьером;
- 5) определяет форму клетки.

**2. Спороброзование является механизмом:**

- 1) размножения бактерий;
- 2) адгезии бактерий;
- 3) защиты от фагоцитоза;
- 4) сохранения вида;
- 5) синтеза белка.

**3. Постоянство формы бактерий обуславливается строением ее:**

- 1) цитоплазматической мембраны;
- 2) цитоплазмы;
- 3) клеточной стенки;
- 4) капсулы;
- 5) жгутиков.

**4. Капсулу в организме образуют возбудители:**

- 1) туберкулеза;
- 2) проказы;
- 3) сибирской язвы;
- 4) чумы;
- 5) туляремии.

**5. Этап окраски по Граму, позволяющий дифференцировать бактерии на грамположительные и грамотрицательные:**

- 1) окраска карболовым генцианвиолетом;
- 2) обработка раствором Люголя;
- 3) промывание водой после фуксина;
- 4) окраска водным фуксином;
- 5) обесцвечивание спиртом.

**6. Спиралевидную форму имеют:**

- 1) хламидии;
- 2) боррелии;
- 3) кокки;
- 4) бактерии;
- 5) микоплазмы.

## Билет № 9

1. Споры, строение, значение. Примеры устойчивости спор к воздействиям внешней среды. Стадии образования и прорастания спор. Методы выявления спор. Нарисуйте бациллы и клостридии (названия по латыни).

2. Цитоплазматические включения их химическая природа. Зерна волютина, значение, методы окраски. Для возбудителя какого заболевания волютиновые зерна имеют диагностическое значение, нарисуйте его.

4. Спирохеты. Таксономическое положение. Биологические свойства, ультраструктура. Морфологические отличия спирохет рода *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*. Методы изучения спирохет в живом состоянии. Методы окраски спирохет.

4. Фазово-контрастное устройство и ультрамикроскоп, принцип работы.

## ТЕСТЫ

### 1. Подвижность бактерий определяется:

- 1) фазово-контрастной микроскопией;
- 2) методом Бурри – Гинса;
- 3) в темном поле зрения;
- 4) в «раздавленной капле»;
- 5) окраской по Граму.

### 2. Жгутики бактерий:

- 1) участвуют в размножении;
- 2) служат для сохранения вида;
- 3) обуславливают подвижность;
- 4) являются антигенами;
- 5) состоят из белка флагеллина.

### 3. Пили (фибрин, ворсинки) обуславливают:

- 1) подвижность;
- 2) передачу генетического материала;
- 3) адгезию;
- 4) репликацию;

5) синтез белка.

**4. Нативные, неокрашенные препараты готовят для микроскопии:**

- 1) световой;
- 2) темнопольной;
- 3) фазово-контрастной;
- 4) люминесцентной;
- 5) электронной.

**5. Структурные компоненты, обязательные для бактерий:**

- 1) капсула;
- 2) мезосомы;
- 3) плазмиды;
- 4) цитоплазматическая мембрана;
- 5) нуклеоид.

**6. Форма бактериальной клетки определяется строением:**

- 1) цитоплазматической мембраны;
- 2) капсулы;
- 3) споры;
- 4) клеточной стенки.

**Билет № 10**

1. Нуклеоид бактерии, отличие от ядер эукариотической клетки. Биологические функции нуклеоида, химическая природа и строение.

2. Техника приготовления препарата-мазка, способы фиксации мазка, ее значение.

3. Споры бактерий, условия образования, значения. Стадии спорообразования и прорастания спор, нарисовать и написать латинские названия спорообразующих микробов. Методы окраски спор.

4. Морфологические особенности хламидий, цикл внутриклеточного развития. Какая форма хламидий является инфекционной. Методы выявления хламидий.

## ТЕСТЫ

### 1. Окраска по Нейссеру используется для выявления:

- 1) спор;
- 2) жгутиков;
- 3) ядерной субстанции;
- 4) зерен воллютина;
- 5) капсулы.

### 2. При окраске по Бурри – Гинсу капсула бактерий:

- 1) окрашивается в красный цвет;
- 2) приобретает черный цвет;
- 3) не окрашивается;
- 4) становится невидимой;
- 5) всё верно.

### 3. Функции цитоплазматической мембраны:

- 1) защитная;
- 2) формообразующая;
- 3) барьерная;
- 4) транспортная;
- 5) метаболическая.

### 4. Ядро бактерий:

- 1) расположено диффузно;
- 2) имеет ядерную оболочку;
- 3) является хромосомой;
- 4) двунитчатая кольцевая ДНК;
- 5) одонитевая РНК.

### 5. Бактерии, не имеющие клеточной стенки:

- 1) риккетсии;
- 2) хламидии;
- 3) спирохеты;
- 4) микоплазмы;
- 5) актиномицеты.

### 6. Бактерии относят к микроорганизмам:

- 1) эукариотам;

- 2) прионам;
- 3) прокариотам;
- 4) всем трем;
- 5) ни к одному из них.

## **Билет № 11**

1. Тинкториальные свойства и методы окраски микроорганизмов (простые и сложные). Механизм и этапы окраски по Граму. В какой цвет окрашиваются бактерии и почему? Нарисовать грамположительных микробов и написать латинские названия.

2. Строение клетки бактерий. Составные части клетки, значение, функции.

3. Риккетсии. Таксономическое положение. Биологические свойства. Морфологические типы риккетсий. Методы окраски (Здродовского, Романовского – Гимзы). Обязательный внутриклеточный паразитизм. Методы культивирования. Роль в инфекционной патологии.

4. Люминесцентный микроскоп, принцип работы.

## **ТЕСТЫ**

**1. Простой метод окраски позволяет в микробной клетке:**

- 1) выявить оболочку;
- 2) определить форму;
- 3) обнаружить капсулу;
- 4) выявить споры;
- 5) изучить структуру нуклеоида.

**2. Клеточная стенка грамположительных бактерий состоит из:**

- 1) липополисахаридов;
- 2) однослойного пептидогликана;
- 3) фосфолипидов;
- 4) многослойного пептидогликана;
- 5) тейхоевых кислот.

**3. При окраске по Нейссеру используют:**

- 1) раствор генцианвиолета;
- 2) щелочной раствор метиленовой сини;

- 3) искусственный раствор метиленовой сини;
- 4) раствор везувина;
- 5) спирт.

#### **4. Плазмиды:**

- 1) внехромосомные факторы наследственности;
- 2) жизненно необходимая структура бактериальной клетки;
- 3) придают бактериям определенные селективные преимущества;
- 4) автономная кольцевая молекула двунитевой ДНК;
- 5) не способны к автономной репликации

#### **5. Мезосомы бактерий:**

- 1) являются эквивалентом ядра;
- 2) производные цитоплазматической мембраны;
- 3) не связаны с нуклеоидом;
- 4) участвуют в делении клеток;
- 5) участвуют в спорообразовании.

#### **6. Волутиновые зерна по автору называются:**

1. Липшютца;
- 2) Бабеша – Эрнста;
- 3) Бабеша – Негри;
- 4) Пашена;
- 5) Гварниери.

### **Билет № 12**

1. Капсула: строение, значение, способы выявления, нарисовать бактерии, образующие капсулу только в организме.

2. Волутиновые зерна: состав, значение, окраска по Леффлеру, по Нейссеру. Нарисовать бактерии, содержащие волутиновые зерна.

3. Ядерный аппарат бактерий, плазмиды, их роль и значение.

4. Хламидии. Таксономическое положение. Особенности морфологии. Ультраструктура элементарных и ретикулярных телец, методы изучения. Роль хламидий в инфекционной патологии человека.

## ТЕСТЫ

### 1. Кислотоустойчивость микроорганизмов связана с наличием:

- 1) нуклеиновых кислот;
- 2) жировосковых веществ;
- 3) полисахаридов;
- 4) высоких концентраций солей;
- 5) многослойного пептидогликана.

### 2. К кислотоустойчивым бактериям относятся возбудители:

- 1) пневмонии;
- 2) актиномикоза;
- 3) туберкулеза;
- 4) бруцеллеза;
- 5) проказы.

### 3. Луи Пастер:

- 1) сконструировал первый микроскоп;
- 2) доказал, что каждый вид брожения имеет своего возбудителя;
- 3) открыл возбудителя родильной горячки, фурункулеза, остиомиелита;
- 4) является основоположником химиотерапии;
- 5) изготовил вакцину против бешенства, сибирской язвы.

### 4. Устойчивость споры во внешней среде обуславливается:

- 1) повышенным содержанием тейхоевых кислот;
- 2) наличием только связанной воды;
- 3) содержанием дипиколиновой кислоты;
- 4) повышенной концентрацией кальция;
- 5) грамотрицательной окраской.

### 5. При окраске по методу Грама применяют:

- 1) карболовый раствор фуксина;
- 2) карболовый раствор генцианвиолета;
- 3) водный раствор фуксина;
- 4) обесцвечивание спиртом;
- 5) водный раствор метиленовой сини.

**6. Способность прикрепляться к поверхности клеток обуславливает наличие у бактерий:**

- 1) токсинов;
- 2) мезосом;
- 3) микроворсинок (пили);
- 4) включений;
- 5) цитоплазматической мембраны.

**Билет № 13**

1. Основные принципы систематики прокариот. Таксономические категории.

2. Нуклеоид бактерий, его отличие от ядер эукариотической клетки. Биологические функции нуклеоида, его химическая природа и строение.

3. Цитоплазматические включения бактерий, их химическая природа, значение. Примеры микроорганизмов, для которых характерно наличие зерен воллютина. Методы выявления зерен воллютина.

4. Морфологические особенности микоплазм. Изучение морфологии микоплазм в фазовом контрастном микроскопе. Назовите патогенные микоплазмы, какие заболевания они вызывают. L-формы бактерий, условия возникновения, морфологические особенности, способность к реверсии. Методы выявления L-форм. В чем сходство микоплазм с L-формами.

**ТЕСТЫ**

**1. Прокариотическая клетка имеет:**

- 1) морфологически оформленное ядро;
- 2) ядерную мембрану;
- 3) аппарат Гольджи;
- 4) мезосомы;
- 5) митохондрии.

**2. Микроорганизмы, относящиеся к прокариотам:**

- 1) бактерии;
- 2) простейшие;

- 3) риккетсии;
- 4) актиномицеты;
- 5) микоплазмы.

### **3. Обязательный структурный компонент бактериальной клетки:**

- 1) нуклеоид;
- 2) спора;
- 3) ЦПМ;
- 4) капсула;
- 5) цитоплазма.

### **4. Цель фиксации препарата:**

- 1) дифференцировать бактерии;
- 2) прикрепить мазок к стеклу;
- 3) убить клетки бактерий;
- 4) усилить восприимчивость к окраске;
- 5) определить расположение клеток.

### **5. Роль капсулы в жизнедеятельности бактерий:**

- 1) усиливает болезнетворность;
- 2) является обязательным структурным компонентом клетки;
- 3) препятствует фагоцитозу;
- 4) является осмотическим барьером;
- 5) источник генетической информации.

### **6. Нуклеоид:**

- 1) аналог ядра;
- 2) кольцевая, двунитевая ДНК, расположенная диффузно в цитоплазме клетки;
- 3) связан с основными белками – гистонами;
- 4) расположен компактно, обладает мембраной и ядрышком;
- 5) сохраняет и передает наследственную информацию.

## **Раздел II. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

### **УИР № 6**

#### **Тема: ПИТАНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ И ДЕЗИНФЕКЦИИ**

##### **План**

1. Питание бактерий и их классификация по типам питания.
2. Принципы культивирования бактерий.
3. Питательные среды: классификация, требования, приготовление.
4. Стерилизация, дезинфекция, антисептика, асептика.
5. Методы стерилизации и аппаратура.

##### **Учебный материал**

**Физиология микробов** – раздел микробиологии, изучающий процессы жизнедеятельности: питание, дыхание, обмен веществ, движение, рост, размножение и взаимодействие микробов с окружающей средой.

**Питание микроорганизмов.** В процессе питания клетка получает вещества, идущие на синтез клеточных компонентов, а также вещества, служащие источником энергии. Микроорганизмы не имеют пищеварительных органов и органелл. Они не способны заглатывать плотные частицы пищи. Переваривание плотных органических веществ происходит вне клетки – в процессе внешнего пищеварения. Клетка может усваивать лишь растворимые продукты пищеварительного процесса; ряд органических веществ или совсем не растворяются в воде, либо дают коллоидные растворы – это белки, жиры и углеводы. Чтобы их усвоить, бактерии при помощи специальных ферментов – гидролаз, выделяемых наружу, переводят эти вещества в более простые растворимые в воде соединения, удобные для усвоения бактериальной клеткой.

Основным регулятором поступления веществ в клетку является ЦПМ. Поступление питательных веществ в клетку происходит за счет осмоса и диффузии через всю оболочку клетки.

Условно выделяют 4 механизма проникновения питательных веществ в клетку:

- *Простая диффузия*: вещества поступают в клетку по градиенту концентрации без затрат энергии. Так, в клетку поступают вода и ограниченное число веществ.
- *Облегченная диффузия*: вещества поступают по градиенту концентрации, без затрат энергии, но при участии ферментоподобных белков переносчиков – пермеаз.
- *Активный транспорт*: вещества поступают против градиента концентрации с участием пермеаз. Данный процесс требует энергетических затрат, так как происходит в тех случаях, когда концентрация веществ в микробной клетке выше, чем в питательной среде.
- *Транслокация* – этот тип транспорта похож на активный транспорт, но переносимая молекула видоизменяется

Бактерии по своей способности усваивать разнообразные источники углерода делятся на две группы – автотрофы и гетеротрофы.

**Автотрофы** (лат. autos – сам, trophē – питание) синтезируют все углеродсодержащие компоненты из CO<sub>2</sub>, как единственного источника углерода. К ним относятся нитрифицирующие бактерии, железобактерии и др.

**Гетеротрофы** (лат. heteros – другой, «питающиеся за счет других») нуждаются в готовых органических соединениях. Они подразделяются на сапрофиты – гнилой (sapro, phyton – растение) и паразиты (parasitos – нахлебник).

**Сапрофиты** используют готовые органические соединения. К ним относят микробов, вызывающих процессы гниения и брожения.

**Паразиты** – это микробы, зависимые в получении питательных веществ от макроорганизма. Различают облигатные паразиты и факультативные. Облигатные паразиты способны размножаться только в живой клетке, они не растут на питательных средах. К ним относятся риккетсии и хламидии.

**Источники азота.** Для синтеза азотсодержащих соединений (аминокислот пуринов, пиримидинов, витаминов) микробам нужен азот. Одни способны усваивать молекулярный азот из солей аммония нитритов или нитратов, другие используют органические азотсодержащие соединения.

Микробы, способные синтезировать все необходимые органические соединения из глюкозы и солей аммония, называются прототрофы.

Микробы, которые нуждаются в готовых факторах роста (аминокислотах, витаминах, пуриновых и пиримидиновых основаниях), называются ауксотрофы.

Кроме углерода, азота, водорода и кислорода для биосинтетических реакций микробам необходимы соединения, содержащие серу, фосфор, минеральные соли: К, Mg, Са, Cu, Мо, необходимые для действия ферментов, факторы роста.

**Источники энергии.** В зависимости от источника энергии микробы подразделяют на фототрофы, способные использовать энергию солнечного цвета, хемотрофы, получающие энергию при расщеплении неорганических соединений, и хемоорганотрофы, получающие энергию при расщеплении органических соединений.

### **Принцип культивирования бактерий**

Культивирование микроорганизмов, помимо состава питательной среды, сильно зависит от физических и химических факторов. Размножение микробов, помещенных в соответствующую питательную среду, происходит при оптимальной для изучаемых видов температуре (для большинства бактерий 37 °С), постоянство которой поддерживается в термостате. При этом количественные показатели каждого из них неодинаковы и определяются особенностями метаболизма бактерий. Существуют методы культивирования микроорганизмов на твердых и жидких питательных средах в анаэробных, аэробных и в микроаэрофильных условиях.

### **Питательные среды**

Разнообразные свойства микроорганизмов могут изучаться только в условиях, когда им обеспечена возможность расти, размножаться и проявлять свою жизнедеятельность. Одним из таких

условий является применение соответствующих питательных сред, которые используются с целью:

- 1) выделения и изучения свойств возбудителей при диагностике инфекционных заболеваний;
- 2) накопления микробной массы для приготовления диагностических и лечебно-профилактических препаратов.

### **Основные требования, предъявляемые к питательным средам:**

- а) оптимальное содержание питательных веществ, необходимых для жизнедеятельности микроорганизмов;
- б) соответствующее значение РН среды;
- в) изотоничность;
- г) влажность;
- д) абсолютная стерильность.

### **Классификация питательных сред**

- **По консистенции:** жидкие, полужидкие, плотные. Плотность создается добавлением к жидким средам 2–3%-го агара, обладающего способностью растворяться при 100 °С и застывать при комнатной температуре. Агар полисахарид, полученный из морских водорослей.
- **По происхождению:** естественные, искусственные, синтетические.

*Естественные среды* готовят из овощей (картофель, морковь), молока, яиц, сыворотки крови и т. д.

*Искусственные* включают переработанные естественные продукты, например, мясную воду, гидролизат кильки и вещества, полученные из естественных продуктов – пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты и др.

*Синтетические* создают из химически чистых соединений с точно известным составом (аминокислоты, углеводы, витамины, минеральные соли).

- **По целевому назначению:** основные и специальные.

*Основные* – это *простые или универсальные*. Простой питательный бульон (ППБ) готовят из белковых гидролизатов, содер-

жащих полный набор аминокислот, пептидов и пептонов. Простой питательный агар (ППА) состоит из гидролизата дрожжей, натрия, хлорида, агара.

*Специальные* подразделяются на: *сложные*, с повышенной питательной ценностью, *элективные*, *накопления* и *обогащения*, *дифференциально-диагностические*.

*Сложные* – с обогащением простых сред углеводами (сахарный бульон, сахарный агар), или сывороткой (сывороточный бульон, сывороточный агар), или кровью (кровяной бульон, кровяной агар), или асцитической жидкостью (асцит-бульон, асцит-агар).

*Элективные*, или избирательные среды, на которых одни виды растут, другие нет. Примеры:

а) желчный бульон элективен для сальмонелл, размножение которых стимулирует 10 % желчи и одновременно тормозит рост сопутствующих микробов;

б) желточно-солевой агар (ЖСА) элективен для стафилококков, которые могут размножаться при содержании в среде 20%-го хлорида натрия, а другие микробы не выносят повышенной концентрации (оптимальное содержание для большинства микробов 0,5 %);

в) щелочной агар, 1%-я щелочная пептонная вода элективна для холерного вибриона, который быстро размножается, когда для других микробов pH 8,0–8,5 не является благоприятным.

*Среды накопления*. Селенитовая среда для накопления патогенных энтеробактерий, в который добавленный 10%-й раствор кислого селенитового натра тормозит рост сопутствующих микробов, не мешая размножению шигелл, сальмонелл.

*Дифференциально-диагностические среды*, на которых разные виды бактерий дают различный рост, предназначены для изучения и индикации отдельных типов, видов бактерий. Различают следующие группы дифференциально-диагностических сред:

а) содержащие белки (кровь, желатин, молоко), дающие характерные изменения под действием бактериальных ферментов; их применяют для определения гемолитических или протеолитических свойств. Наиболее распространенными средами являются МПЖ (мясопептонная желатина), кровяной агар, молоко;

б) содержащие углеводы и индикаторы, позволяющие дифференцировать эшерихий от сальмонелл и шигелл. Такой средой явля-

ется среда Эндо, в состав которой входят лактоза, МПА и основной фуксин, обесцвеченный сульфитом натрия. Среда светло-розовая. При ферментации лактозы образуется кислота, которая нейтрализует сульфит натрия, в результате восстанавливается фуксин, и колонии окрашиваются в красный цвет. Поэтому эшерихии, которые ферментируют лактозу, при росте на этой среде образуют колонии красного цвета с металлическим блеском, а сальмонеллы и шигеллы – бесцветные, так как они не ферментируют лактозу.

Различия в способности бактерий ферментировать углеводы с образованием кислоты, либо кислоты и газа учитывают на средах Гисса с коротким или более длинным набором углеводов, спиртов, гликозидов.

**Среда Гисса** представляет собой набор пробирок с питательными средами, содержащими в каждой пробирке различные углеводы – «сахара», чаще используют лактозу, глюкозу, маннит, мальтозу, сахарозу (при необходимости набор углеводов может быть расширен. При ферментации этих продуктов бактериями происходит образование органических кислот и газообразование. Кислоты определяет индикатор бромкрезоловый пурпурный, меняя свой исходный фиолетовый цвет на желтый. Газообразование обнаруживают поплавки (стеклянные трубочки, запаянные с одной стороны), помещенные в каждую пробирку с углеводом. Рост бактерий на среде Гисса без изменения его цвета свидетельствует об отсутствии фермента, расщепляющего данный углевод.

В настоящее время выпускаются питательные среды в сухом виде. Простой питательный бульон (ППБ) содержит триптический гидролизат кильки, натрия хлорид. Простой питательный агар (ППА) содержит гидролизат кормовых дрожжей, натрий хлорид, агар.

### **Техника приготовления основных питательных сред:**

1) *простой питательный бульон* (ППБ): навеску порошка, указанную на этикетке (например, 15 г), тщательно размешивают в колбе с 1 литром дистиллированной воды. Кипятят 1–2 мин, фильтруют через бумажный фильтр и разливают в пробирки или колбы. Стерилизуют при температуре 120 °С в течение 20 мин;

2) *простой питательный агар* (ППА): 30 г порошка размешивают в 1 литре дистиллированной воды, кипятят до полного расплавления агара (2–3 мин), фильтруют через ватный фильтр и стерилизуют при температуре 120 °С 30 мин. Затем разливают питательный агар в стерильные чашки Петри.

Для приготовления скошенного питательного агара пробирки с разлитым агаром оставляют застывать в металлической сетке или в наклонном положении на столе.

### **Современные методы стерилизации и дезинфекции**

**Стерилизация** – это уничтожение на объектах внешней среды всех форм микроорганизмов (т. е. полное обеспложивание).

Существует три основных метода стерилизации: тепловой, лучевой, химический. Тепловая стерилизация основана на чувствительности микробов к высокой температуре. При температуре 60 °С и наличии воды в микробной клетке происходит денатурация белка, деградация нуклеиновых кислот, вследствие чего вегетативные формы микробов погибают. Споры, содержащие воду в связанном состоянии и обладающие плотными оболочками, устойчивы к такой температуре и инактивируются при 160–170 °С.

В микробиологической практике самым распространенным и надежным способом является применение высокой температуры.

**Прокаливание на огне** – самый эффективный способ стерилизации петель, игл для посевов, мелкого инструментария.

**Кипячение в воде** в течение 45 мин используют для стерилизации инструментов, шприцев.

**Стерилизация сухим жаром** производится в печах Пастера или сухожаровых камерах, которые представляют собой металлический шкаф, покрытый снаружи асбестом для сохранения тепла. Сверху через отверстие в крышке вставлен термометр, опускающийся внутрь аппарата.

Приготовленный материал ставят в печь и стерилизуют в течение 45 мин при температуре 165–175 °С, считая с того момента, когда ртуть в термометре поднимется до этого показателя, который должен оставаться постоянным все время стерилизации. Выше 170 °С начинается обугливание бумаги, а при более низкой температуре требуется большой срок стерилизации. Сухим жаром

стерилизуют всю стеклянную посуду, градуированные и пастеровские пипетки. Перед стерилизацией посуда должна быть вымыта, высушена и завернута в бумагу. Пробирки, колбы, флаконы закрывают ватно-марлевыми пробками. Пробирки завертывают в бумагу по 10–15 штук, градуированные пипетки – по 1–3 штуки. Можно стерилизовать пипетки и чашки в особых металлических футлярах.

Критерием достаточной стерилизации является легкое пожелтение бумаги, в которую завернуты стерилизуемые предметы. По окончании стерилизации печь открывают после того, как она остынет, ибо вследствие резкой перемены температуры стеклянные предметы могут лопнуть.

Стерилизация паром не требует такой высокой температуры, как стерилизация сухим жаром, ибо пар действует на микробов сильнее. Обеспложивание паром производится двумя способами: 1) стерилизация насыщенным паром под давлением и 2) стерилизация текучим паром.

**Стерилизация паром под давлением** – самый эффективный в бактериологической практике способ стерилизации, так как с его помощью быстро достигается полное и надежное обеспложивание, включая и спороносные бактерии. Этот способ стерилизации основан на том, что образующийся при кипении воды пар не выходит наружу, а скапливаясь в замкнутом пространстве, повышает давление. Соответственно давлению увеличивается и температура кипения воды: при повышении давления на 0,5 атмосферы температура кипения равна 110 °С, на 1 атмосферу – 121 °С, на 1,5 атмосферы – 127 °С, на 2 атмосферы – 134 °С. При такой температуре микроорганизмы и их споры погибают очень быстро (при 120 °С – в течение 15–20 минут).

Этим способом стерилизации пользуются для обеспложивания питательных сред (за исключением тех, которые не выносят высокой температуры), посуды инструментов и т. д. Стерилизация паром под давлением производится в автоклавах.

**Автоклав.** Автоклав представляет собой прочный цилиндрический медный котел на ножках с толстым двойными стенками и герметически закрывающейся при помощи особых винтов массивной крышкой. На крышке (или сбоку) находится манометр,

предохранительный клапан и выпускной кран. Нагрев электрический. Между стенками автоклава наливают воду. На подставке помещают в специальных биксах стерилизуемые предметы и закрывают крышку, сначала не закручивая ее герметически. Включают электронагрев, доводят воду до кипения, образующийся при этом пар выходит через выпускной кран вместе с воздухом. Когда весь воздух вытеснен и выделяется непрерывная струя пара, герметически закручивают крышку и закрывают выпускной кран вместе с воздухом. Когда весь воздух вытеснен и выделяется непрерывная струя пара, герметически закручивают крышку и закрывают выпускной кран. Пар оказывается в замкнутом пространстве, и начинается повышение давления и температуры. На манометрах принято обозначать в атмосферах только избыточное давление, причем нормальное атмосферное давление (760 мм рт. ст.) считается равным нулю. Когда манометр покажет нужную высоту давления (1–2 атм), регулируют нагрев так, чтобы это давление держалось 15–20 минут, после чего отключают нагрев, ждут пока стрелка манометра не упадет до 0. Только после этого открывают выпускной кран, откручивают и снимают крышку автоклава. Если открыть автоклав раньше, то вследствие быстрого падения стерилизуемая жидкость закипит, вытолкнет пробку и выплеснется из сосудов.

Предохранительным клапаном автоклав снабжается на тот случай, если давление достигнет предела, тогда клапан автоматически открывается, и вырывающаяся со свистом струя «предупреждает» о необходимости немедленно прекратить нагрев автоклава, чтобы давление больше не повышалось (автоклав может взорваться).

Современные автоклавы имеют также горизонтальное расположение с помещенным внизу водонагревательным прибором.

**Стерилизация текучим паром** производится в аппарате Коха, представляющем собой высокий металлический цилиндр, обложенный снаружи асбестом или линолеумом, с двойным дном и закрывающейся крышкой с отверстием. На дно аппарата наливают воду, подогреваемую снизу до кипения. Образующийся пар выделяется через края неплотно закрытой крышки. Стерилизацию производят в течение 30–40 минут с момента выделения пара.

Стерилизацию текучим паром можно производить и в автоклаве. В таком случае, крышка автоклава остается не закрученной,

а выпускной кран – открытым. Пар выделяется через щель между крышкой и автоклавом и через выпускной кран. Время стерилизации отсчитывается с момента выхода непрерывной струи пара, когда температура достигает 100 °С. Текущим паром стерилизуют предметы, портящиеся от действия высокой температуры. Однократная стерилизация текущим паром не обеспечивает полного обеспложивания стерилизуемых объектов, так как при температуре 100 °С гибнут вегетативные формы, но не споры бактерий. Полное обеспложивание при помощи текущего пара достигается лишь при повторных стерилизациях. Стерилизация текущим паром при 100 °С производится 3 дня подряд по 20–30 минут. В промежутках стерилизуемый материал находится при комнатной температуре. За этот срок споры должны прорасти в вегетативные формы, которые уничтожаются последующим нагреванием до 100 °С.

**Дробной стерилизации** подвергаются материалы, портящиеся от сухого жара и продолжительного действия пара, не переносящие температуры выше 100 °С (желатина, молоко, питательные среды с углеводами).

В основу метода дробной стерилизации положен следующий принцип. Убивая при температуре 100 °С вегетативные формы бактерий, дают оставшимся спорам прорасти в вегетативные формы. Через сутки снова стерилизуют материал при 100 °С. Обычно после третьей стерилизации при 100 °С материал оказывается освобожденным от бактерий и спор.

**Тиндаллизация** представляет собой дробную стерилизацию при низкой температуре, предложенную Тиндалем для объектов, не переносящих температуры 100 °С (сыворотки, желатин, витамины). Их подвергают нагреванию в течение 5–6 дней подряд при более низкой температуре (например, при 56–58°С) по 1 часу ежедневно (первый день – в течение 2 часов). Тиндаллизация проводится на водяных банях или в специальных сосудах с терморегуляторами.

**Стерилизация фильтрованием** – механический способ фильтрации, как способ освобождения от микробов, производится в тех случаях, когда материал не может быть подвергнут нагреванию (например, сыворотка, ряд лекарственных веществ и т. д.).

Для этой цели изготавливают фильтры из инфузорной земли, фарфора, каолина, асбеста с настолько мелкими порами, что они не пропускают микробов. Фильтры готовятся в виде цилиндрических свечей (фильтр Шамберлана, Беркефельда) или асбестовых пластинок (фильтр Зейтца).

Фильтрацию производят или под повышенным давлением, вследствие чего жидкость нагнетается через поры фильтра в приемник или же создается разрежение в приемнике, и жидкость всасывается в него через фильтр. Поэтому к фильтрующему прибору присоединяется нагнетающий или разрежающий насос. Стерильность профильтрованной жидкости проверяется путем ее посева на питательную среду – посев должен оставаться стерильным. Прибор для фильтрации должен быть предварительно простерилизован в автоклаве.

**Химическая стерилизация.** Предполагается использование токсических газов – 1) оксида этилена; 2) смеси оксида этилена, бромистого метила и формальдегида. Эти вещества в клетках микроорганизмов способны инактивировать ферменты, ДНК, РНК, что приводит к их гибели. Стерилизация газами осуществляется в присутствии пара при температуре от 18 до 80 °С в специальных камерах. В них стерилизуют оптические приборы, радиоэлектронную аппаратуру, эндоскопы, питательные среды с белком.

**Лучевая стерилизация** осуществляется либо с помощью гамма-излучения, либо с помощью ускоренных электронов. Источником гамма-излучения, получаемого в специальных гамма-установках, являются радиоактивные изотопы Co, Cs. Гибель микробов происходит в результате повреждения нуклеиновых кислот. Лучевая стерилизация позволяет обрабатывать сразу большое количество предметов: одноразовых шприцев, систем для переливания крови и т. д.

*Ультрафиолетовое облучение* производится с помощью специальных бактерицидных ламп – настенных, потолочных, передвижных для обеззараживания воздуха, различных поверхностей в операционных, перевязочных, микробиологических лабораториях и т. д. Действие ультрафиолетовых лучей приводит к разрушению ДНК микробов.

**Пастеризация** была предложена Пастером для частичного (неполного) обеспложивания жидкостей, теряющих свои качества под действием высокой температуры (молоко, вино и т. д.).

Способ основан на том, что при нагревании жидкости до 50–60 °С в течение 15–30 минут или 70–80°С в течение 5–10 минут погибает большинство беспоровых микробов (в том числе и патогенные); споры же, если они содержатся в данной жидкости, остаются жизнеспособными. Поэтому во избежание их прорастания пастеризованный продукт необходимо хранить на холоде.

*Тепловая стерилизация* – наиболее надежный, экологически безопасный, дешевый и хорошо контролируемый метод. Однако его невозможно применять тогда, когда предметы повреждаются от высокой температуры.

### **Контроль стерилизации**

Косвенно о поддержании определенной температуры можно судить по изменению окраски химических индикаторов – бензойной кислоты, мочевины, запаянных в ампулы, которые помещают на поверхности и в глубине стерилизуемого объекта.

*Биологический контроль:* внутрь стерилизуемых предметов помещают биотесты, приготовленные из термоустойчивых бацилл с последующим посевом на соответствующие питательные среды. Кроме того, производят посев кусочков материала, смывов с предметов, подвергшихся стерилизации, на среды, позволяющие обнаружить аэробные и анаэробные бактерии, грибы. Отсутствие роста после 14 дней инкубации в термостате свидетельствует о стерильности предмета.

Перед стерилизацией лабораторная посуда должна быть вымыта, высушена и для сохранения состояния стерильности упакована. Для упаковки стерилизуемых изделий медицинского назначения применяют специальные виды бумаги, стерилизационные коробки (биксы), двойную мягкую упаковку из бязи и др. Срок хранения стерильного изделия зависит от вида упаковки: в коробках без фильтра и двойной мягкой упаковке – 3 суток, в пергаменте или коробке с фильтром – 20 суток.

**Дезинфекция** – это мероприятия, направленные на уничтожение или резкое подавление численности патогенных и условно-

патогенных микроорганизмов во внешней среде, на объектах и изделиях. Целью дезинфекции является предупреждение или прерывание передачи возбудителей от больных здоровым через объекты внешней среды. Используют следующие методы дезинфекции:

- *химический* – применяется для обработки помещений, оборудования и различных предметов. Дезинфектанты:

1) хлорсодержащие препараты – хлорная известь, хлорамин, хлоргексиды, биглюконат;

2) альдегиды – раствор формальдегида;

3) производные фенола, гексахлорофен, резорцин, хлорофен, тимол;

4) спирты (на основе этанола);

5) альдегидосодержащие на основе янтарного альдегида (гигасепт, глутарал и др.;

- *физический* – кипячение, сжигание, ультрафиолетовое облучение;

- *механический* – встряхивание, обработка пылесосом, влажная уборка, проветривание, стирка, мытье.

**Асептика** – это комплекс мер, направленных на предупреждение попадания возбудителя инфекции в рану, органы больного при операциях, лечебных и диагностических процедурах. Асептика включает: стерилизацию и сохранение стерильности инструментов, перевязочного материала, операционного белья, перчаток и всего, что приходит в соприкосновение с раной; дезинфекцию рук хирурга, операционного поля, аппаратуры операционной и других помещений, применение специальной одежды, масок.

**Антисептика** – совокупность мер, направленных на уничтожение микробов в ране, патологическом очаге или организме в целом, на предупреждение или ликвидацию воспалительного процесса.

В качестве антисептиков применяют спирты, йодсодержащие препараты, кислоты – борную, бензойную, уксусную и салициловую кислоту, из щелочей наиболее распространен раствор аммиака (нашатырный спирт, содержит 9–10 % аммиака), применяется для обработки рук хирурга; красители – бриллиантовый зеленый, ме-

тиленовый синий, риванол, основной фуксин; окислители – перекись водорода и перманганат калия (марганцовка).

### **Методические рекомендации к выполнению практических заданий**

Ознакомление с аппаратурой, методами и режимом стерилизации, способами контроля стерильности.

#### **Горячая и холодная стерилизация:**

- а) прокаливание в пламени спиртовки бактериальных петель, игл, пинцетов, предметных стекол;
- б) кипячение в стерилизаторе шприцев, инструментов;
- в) стерилизация в сухожаровой камере-печи Пастера;
- г) стерилизация в автоклаве в режимах:
  - паром под давлением;
  - текучим паром;
- д) тиндализация;
- е) пастеризация;
- ж) механическая стерилизация с помощью фильтров асбестовых, фарфоровых, коалиновых;
- з) стерилизация воздуха помещений УФЛ (кварцевание).

### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Что такое асептика, антисептика, стерилизация, дезинфекция, дезинсекция, дератизация?

2. Методы стерилизации:

Прокаливание на огне – фламбирование.

Кипячение.

Стерилизация сухим жаром в печи Пастера.

Стерилизация паром в автоклаве под давлением и текучим паром (дробная стерилизация). Какие материалы стерилизуются паром под давлением, текучим паром? Как проконтролировать эффективность стерилизации в автоклаве?

Тиндализация.

Пастеризация.

Химические способы стерилизации.

Механическая стерилизация с помощью бактериальных фильтров. Какие материалы обеззараживают этим методом?

Кварцевание воздуха.

3. Механизмы питания бактерий. Классификация бактерий по типам питания.

4. Питательные среды, требования к ним.

5. Классификация питательных сред по составу, консистенции и назначению.

6. Принцип приготовления основных питательных сред ППБ (МПБ), ППА (МПА).

## УИР № 7

### Тема: РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ МИКРОБОВ. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

#### План

1. Рост и размножение микробов, их культивирование.
2. Дыхание бактерий.
3. Методы выделения чистой культуры аэробных бактерий.
4. Методы выделения чистой культуры анаэробных бактерий.
5. Техника посева и пересева культуры микроорганизмов.
6. Подсчет выросших колоний.

#### Учебный материал

##### Общие закономерности роста и размножения бактерий

**Рост бактерий** – это упорядоченное увеличение количества и размеров всех компонентов клетки, что приводит к увеличению массы.

**Размножение бактерий** – это разделение ДНК нуклеоида на две дочерние нити, каждая из которых далее достраивается комплементарной нитью и одновременно происходит образование двух дочерних клеток.

Бактерии размножаются **поперечным делением**. Процесс деления повторяется через приблизительно равные промежутки времени (от нескольких минут до нескольких суток), что является индивидуальной генетической характеристикой микробного вида. В результате размножения резко увеличивается количество клеток в популяции. Бактерии характеризуются высоким темпом размножения на различных питательных средах, который характеризуется временем генерации. **Время генерации** – это время между двумя делениями клетки, проходящими от момента появления клетки до момента деления клетки (например, время генерации кишечной палочки – 20 минут, возбудителя туберкулеза – 14 часов).

## Размножение бактерий на плотной питательной среде

Бактерии, растущие на плотных питательных средах, образуют **колонии** – скопления микроорганизмов одного вида, выросшие из одной зародышевой клетки при размножении, видимые невооруженным взглядом.

**Внешний вид колоний** у некоторых бактерий настолько своеобразен, что может служить дифференциальным признаком, например, колонии возбудителя сибирской язвы сравнивают с «гривой льва», колонии возбудителя чумы с «кружевным платком», колонии возбудителя дифтерии с «цветком маргаритки».

*По форме колонии* бывают правильные – округлые, неправильные – амебовидные. В зависимости от диаметра различают колонии точечные (диаметр меньше 1 мм), мелкие (1–2 мм), средние (диаметр 2–4 мм), крупные (4–6 мм и более).

*Цвет* определяется видом пигмента (белый, желтый, красный и др.). Пигментированные колонии, например, у стафилококка (белый, лимонно-желтый или золотистый), у нейссерий (кремовый), у кишечных бактерий рода *Serratia* (красный). Большинство патогенных бактерий пигмент не образуют – их колонии прозрачные.

Пигменты различаются по цвету, химическому составу, растворимости.

- **Каротиноиды** – жирорастворимые пигменты красного, желтого и оранжевого цвета. Они встречаются у представителей рода *Mycobacterium*, *Micrococcus*.
- **Пирроловые** – спирторастворимые – пигмент продигиозин. Встречается у *Serratia marcescens* (палочка чудесной крови).
- **Фенозиновые** – водорастворимый пигмент *Pseudomonas aeruginosa* – пиоционин – выделяется в питательную среду, окрашивает ее.
- **Меланины** – нерастворимые пигменты черного и коричневого цвета, встречаются у бактерий рода *Porphyromonas*.

**Значение пигментов** – предохраняют бактериальную клетку от УФ-лучей, обезвреживают токсические кислородные радикалы, обладают антибиотическими свойствами, участвуют в реакциях фотосинтеза.

По консистенции колонии бактерий чаще бывают мягкие, слизистые или плотные, крошковидные. Характер края определяют при рассмотрении колонии под лупой или микроскопом с малым увеличением. Различают ровные края в виде четко выраженной линии и неровные – фестончатые и волнистые.

Поверхность колоний бывает матовая или блестящая, сухая или влажная, гладкая или шероховатая. Гладкие колонии обозначают буквой *S* (smooth), шероховатые буквой *R* (rough), что означает гладкий и шероховатый, соответственно.

Вид, форма, цвет колоний определяются как культуральные свойства бактерий и учитываются при их идентификации.



Рисунок 2 – Фазы развития бактериальной популяции

**При размножении бактерий на жидкой питательной среде** наблюдается последовательная смена отдельных фаз в размножении бактериальной популяции (рисунок 2):

**I. Лаг-фаза** – фаза задержки размножения. Размножение клеток не происходит, так как микробы адаптируются к питательной среде, они увеличиваются в размере, происходит накопление ферментов, репликация ДНК. В конце фазы начинается медленное размножение микробов.

**II. Лог-фаза** – логарифмическая, или экспоненциальная фаза (~ 3–5 час). Популяция делится с максимальной скоростью и идет увеличение особей в геометрической прогрессии.

**III. Стационарная фаза.** В эту фазу наблюдается равновесие между количеством вновь образовавшихся клеток и количеством погибших. (Количество образующихся и отмирающих клеток одинаково.)

**IV. Фаза отмирания.** В эту фазу происходит гибель клеток, так как на питательной среде накапливаются продукты обмена и уменьшается количество питательных веществ.

**Культивирование** – получение роста микроорганизмов в условиях искусственной питательной среды. Цели культивирования:

- получение чистых культур патогенных микроорганизмов и их идентификация;
- накопление биомассы продуцентов витаминов, гормонов, аминокислот, антибиотиков и др.;
- получение диагностических и профилактических препаратов (вакцин, диагностикумов);
- хранение эталонных музейных культур.

**Культура** – популяция микроорганизмов, выращенных на питательной среде. Культуры могут быть чистыми и смешанными.

**Чистая культура** – популяция одного вида микроорганизмов, выращенная из изолированной колонии на плотной или жидкой питательной среде.

**Колония** – это потомство одной клетки, визуально определяемое на поверхности плотной питательной среды.

**Вид** – совокупность особей, имеющих единый тип организации, который проявляется сходными признаками: морфологическими, тинкториальными (отношение к красителям), культуральными, физиологическими, биохимическими и антигенными свойствами.

**Штамм** – это совокупность микробов одного вида, выделенных из одного источника в разное время или из разных источников. Штаммы патогенных микробов – возбудителей инфекционных заболеваний, отличаются по некоторым ферментам, используемым для идентификации, а также по степени вирулентности.

**Клон** – это популяция микробов, являющаяся потомством одной клетки. Клонирование бактериальных популяций возможно как на жидких, так и на плотных питательных средах.

## **Дыхание, или биологическое окисление у анаэробных и аэробных бактерий**

Для синтеза структурных компонентов микробной клетки и поддержания процессов жизнедеятельности, наряду с питательными веществами требуется достаточное количество энергии. Эта потребность удовлетворяется за счёт биологического окисления, в результате которого синтезируется молекула АТФ. Получение энергии и создание ее запасов в форме АТФ осуществляется путем дыхания и брожения.

**Дыхание** – это цепь реакций биологического окисления. Суть окисления заключается в присоединении кислорода или в отнятии водорода от субстрата, в результате чего происходит расщепление вещества и разрушение химических связей. Энергия этих связей выделяется в окружающую среду и почти на 70 % улавливается клеткой как биологическая энергия в виде образования высокоэнергетических соединений, главным из которых является АТФ. Энергия необходима микробной клетке для ее жизнедеятельности. При дыхании происходят процессы окисления и восстановления: окисление – отдача донорами (молекулами или атомами) водорода или электронов; восстановление – присоединение водорода или электронов к акцептору.

Все процессы дыхания происходят на ЦПМ.

**По типу дыхания** бактерии делят на *аэробы* и *анаэробы*, которые, в свою очередь, бывают облигатные (строгие, или обязательные) и факультативные.

*Аэробы* (облигатные) растут и размножаются только при свободном доступе кислорода, например, микобактерии туберкулеза. Кислород для облигатных аэробов является конечным акцептором электронов.

*Анаэробы* получают энергию при отсутствии доступа кислорода путем ускоренного, но не полного расщепления питательных веществ. Облигатные анаэробы, например, возбудители столбняка, ботулизма, не переносят даже следов кислорода. Тип метаболизма у них бродильный. Если донорами и акцепторами являются органические соединения, то такой процесс называется брожением. Брожение идет без участия кислорода, оно свойственно как обли-

гатным, так и факультативным анаэробам. При брожении происходит ферментативное расщепление органических соединений, преимущественно углеводов, в анаэробных условиях. С учетом конечного продукта расщепления углеводов различают спиртовое, молочнокислое, уксуснокислое, пропионово-кислое и другие виды брожения.

*Факультативные анаэробы* развиваются как при доступе кислорода воздуха, так и при его отсутствии (энтеробактерии). Они обладают смешанным типом метаболизма: в присутствии кислорода энергия у них запасается в результате дыхания, а при отсутствии кислорода процесс получения энергии переключается на брожение.

*Микроаэрофильные бактерии (микроаэрофилы)* развиваются при низкой концентрации кислорода в окружающей атмосфере (например, лептоспиры).

*Аэротолерантные микроорганизмы* не используют кислород для получения энергии, но могут развиваться в его атмосфере (например, молочнокислые бактерии).

Некоторые патогенные микробы нуждаются в избыточном количестве углекислого газа (до 20 %), их называют *капнофилы* (возбудители бруцеллеза).

### **Методы выделения чистой культуры бактерий-аэробов и факультативных анаэробов**

Основной задачей при исследовании материала, содержащего смесь микробов, является получение отдельных изолированных колоний. Пересев изолированной колонии в пробирку на поверхность скошенного агара, приводит к получению чистой культуры.

Выделение чистых культур бактерий – обязательный этап бактериологического исследования в лабораторной диагностике инфекционных болезней. Исследуемый материал (гной, мокрота, фекалии и др.) содержит ассоциации микробов. Установление вида возбудителя болезни и изучение всех его свойств возможно только тогда, когда бактерии получены в изолированном виде, т. е. в чистой культуре. Для этого производят первичный посев исследуемого материала на поверхность плотной питательной среды. После

инкубации при 37 °С (24–48 часов) в термостате формируются колонии бактерий.

Для получения изолированных колоний и выделения чистой культуры бактерий используют методы, которые условно подразделяются на 2 группы:

- методы, основанные на принципе **механического разобщения** микроорганизмов в питательной среде с целью получения изолированных колоний (Коха, Дригальского, рассев петлей, штрихами и др.);
- методы, основанные на использовании **биологических особенностей** микроорганизмов.

#### **Методы, основанные на принципе механического разобщения микроорганизмов в питательной среде с целью получения изолированных колоний**

*Метод Коха* – последовательные разведения исследуемого материала в пробирках с расплавленным агаром, содержимое которых выливают в стерильную чашку Петри, где агар застывает, после инкубации в термостате на поверхности агара в чашках и внутри питательных сред вырастают изолированные колонии.

*Метод Дригальского* – рассев исследуемого материала по поверхности плотного питательного агара в чашке с помощью шпателя, с целью получения изолированных колоний.

#### **Этапы выделения**

**I этап** (первый день) посев исследуемого материала на трех пронумерованных чашках Петри (I, II, III) с питательной средой. На поверхность питательной среды в первой чашке наносят пастеровской пипеткой или петлей каплю исследуемого материала и растирают ее стерильным шпателем по всей поверхности, затем той же стороной шпателя растирают материал по всей поверхности питательной среды второй чашки. Далее той же стороной шпателя растирают материал по поверхности питательной среды третьей чашки. Чашки надписывают (название материала, фамилия больного, дата) и ставят в термостат в верх дном, чтобы образующие капельки паров воды, попадающие на крышку, не стекали на

поверхность и не размывали посев. Инкубация в термостате обычно в течение суток.

**II этап** (второй день): изучение колоний и выделение чистых культур. На чашке 1, где было много материала, получился сплошной рост бактерий и отдельных колоний не видно. На чашке 2 и, в особенности, на чашке 3 выросли изолированные колонии различных бактерий, отличающиеся между собой по форме, величине, цвету, характеру поверхности и краев, консистенции, пригодные для выделения чистой культуры микроорганизма. Изолированную «подозрительную», интересующую исследователя колонию снимают петлей и засевают на скошенный агар. Из остатка колонии готовят мазок и изучают при окраске по Граму.

**III этап.** Идентификация определения вида выделенной чистой культуры на основании изучения биологических свойств: морфологических, тинкториальных (отношение к окраске) культуральных (характер роста на различных жидких и плотных питательных средах), биохимических (ферментативных), вирулентных, токсигенных, антигенных, чувствительности к диагностическим фагам, чувствительности к антибиотикам и др. веществам.

*Посев штрихами* (петлей). Перед посевом исследуемый материал разводят в пробирке 5–10 мл стерильного физиологического раствора. Берут петлю разведенного материала и сначала проводят ею ряд частых параллельных линий (штрихов) на небольшой площади среды. Затем отступив, продолжают высев петлей, проводя штрихи через всю поверхность питательной среды на расстоянии 5 мм друг от друга. В результате в начале посева – сплошной рост, и чем дальше от первоначального посева, тем больше изолированных колоний.

*Посев по секторам.* Чашка Петри с питательной средой с внешней стороны делится на 4 сектора карандашом по стеклу. Исследуемый материал петлей вносят в первый сектор и проводят ею параллельные линии по всему сектору на расстоянии одна от другой около 5 мм. Этой же петлей, проводят такие же линии последовательно на 2-м, 3-м и 4-м секторах чашки. В том месте, где на агар попало большое количество микробных клеток, рост микроорганизмов будет в виде сплошного штриха. На секторах с небольшим количеством клеток вырастают отдельные колонии.

## **Методы выделения чистой культуры, основанные на использовании биологических особенностей микроорганизмов**

*Применение элективных, избирательных питательных сред.* Например, солевой агар для стафилококков, щелочной агар для холерных вибрионов, желчный бульон для сальмонелл и т. д.

*Кислотоустойчивость микобактерий туберкулеза* позволяет выделить их в чистой культуре при обработке исследуемого материала (мокрота больного, где обилие кислотоустойчивых гноеродных и других бактерий) 5%-м раствором серной кислоты. Некислотоустойчивые бактерии при такой концентрации кислоты погибают. Посев обработанной кислотой мокроты больного туберкулезом дает рост чистой культуры возбудителя туберкулеза.

*Термоустойчивость спорообразующих микробов* позволяет отделить их от неспорных форм: для этого прогревают исследуемый материал на водяной бане при 80 °С 15–20 мин. При этом погибают неспорные формы, а споры сохраняются и при посеве на соответствующую питательную среду прорастают.

*Метод Шужевица:* клетки бактерии (протей), характеризующиеся скользящим типом движения, засеянные в конденсационную жидкость скошенного агара, поднимаются («всплывают») по поверхности среды и разрастаются далеко за зону внесения исследуемого материала.

*Биологический метод* – заражение животных, восприимчивых к данному виду бактерий, с последующим выделением культуры из их органов и крови при заболевании и гибели. Например, высокая вирулентность *Streptococcus pneumoniae* для белых мышей позволяет выделить их в чистой культуре введением мокроты больного (содержащей огромное количество сопутствующей микрофлоры) внутрибрюшинно белым мышам. После их гибели от пневмококковой септицемии из крови и органов выделяют чистую культуру.

## **Методы выделения чистой культуры облигатных анаэробов**

К облигатным анаэробам относятся клостридии – спорообразующие грамположительные палочковидные микроорганизмы.

Патогенные клостридии образуют экзотоксины и вызывают тяжелые заболевания: газовую гангрену – *Cl. perfringens*, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. histolyticum*, столбняк – *Cl. tetani*, ботулизм – *Cl. botulinum*. Наиболее строгими облигатными анаэробами являются неспорообразующие анаэробы, к которым относятся бактероиды, представители родов *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella* и *Fusobacterium* – грамотрицательные палочки, вызывающие гнойно-воспалительные процессы.

Взятие исследуемого материала осуществляется шприцем с притертым поршнем, после чего материал вносят в пробирки с транспортной средой. Выделение чистой культуры проводится со строгим соблюдением анаэробных условий на всех этапах исследования, лучше в анаэробоксах.

Для культивирования облигатных анаэробов необходимы бескислородные анаэробные условия, которые могут быть созданы различными методами.

### Методы создания анаэробных условий

**Физические методы** основаны на выращивании микроорганизмов в безвоздушной среде, что достигается:

- посевом в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества;
- посевом микроорганизмов в глубину плотных питательных сред;
- механическим удалением воздуха из сосудов, в которых выращиваются анаэробные микроорганизмы;
- заменой воздуха в сосуде каким-либо индифферентным газом.

В качестве редуцирующих веществ обычно используют кусочки (около 0,5 г) животных тканей (печень, почки, селезенка). Эти ткани связывают растворенный в среде кислород. Чтобы уменьшить содержание кислорода в питательной среде, ее перед посевом кипятят 10–15 мин, а затем быстро охлаждают и заливают сверху небольшим количеством вазелинового масла. В качестве легко окисляемых веществ используют глюкозу, лактозу.

Лучшей жидкой питательной средой с редуцирующими веществами является среда *Китта* – *Тароцци*, которая используется

для выделения анаэробов при первичном посеве исследуемого материала.

Посев микроорганизмов в глубину плотных сред производят по методам *Вейнберга* и *Веньяль – Вейона*.

*По Вейнбергу* – сахарный агар наливают в пробирку высоким столбиком и охлаждают до 42–45 °С. Затем добавляют исследуемый материал тщательно перемешивают. Пробирки ставят в штатив, питательная среда застывает и внутри нее (особенно в нижней части пробирки) создаются анаэробные условия.

*Метод Веньяль – Вейона* состоит в механической защите посевов анаэробов от кислорода воздуха. Берут стеклянную трубку длиной 30 см и диаметром 3–6 мм. Один конец трубки вытягивают в виде пастеровской пипетки. В пробирки с расплавленным и охлажденным до 50 °С агаром засевают исследуемый материал, затем насыпают засеянный агар в стерильные трубки *Веньяль – Вейона*. Капиллярный конец трубки запаливают в пламени горелки, в противоположный конец трубки вставляют резиновую пробку. Так создаются благоприятные условия для роста самых строгих анаэробов. Для выделения отдельной колонии трубку надрезают напильником, соблюдая правила асептики, на уровне колонии ломают, а колонию захватывают стерильной петлей и переносят в пробирку со скошенным агаром, для получения чистой культуры.

**Механические методы.** Анаэроустат представляет собой толстостенный металлический цилиндр с хорошо притертой крышкой (с резиновой прокладкой), снабженный отводящим краном и вакуумметром. После размещения засеянных чашек или пробирок, воздух из анаэроустата удаляют с помощью вакуумного насоса, заменяют его газовой смесью, состоящей из азота, водорода, аргона, углекислого газа и инкубируют в течение 2–3 суток в термостате при температуре 37 °С. Можно использовать специальные полиэтиленовые пакеты, заполненные газовой смесью.

**Химические методы.** Основаны на поглощении кислорода воздуха в герметически закрытом сосуде (эксикаторе) такими веществами, как пирагаллол или гидросульфит натрия.

**Биологические методы.** *Метод Фортнера* основан на совместном выращивании анаэробов со строгими аэробами. Для этого

из застывшей питательной среды вырезают стерильным скальпелем полоску среды шириной около 1 см. На одну сторону засевают аэроб, например, *Staphylococcus aureus* или *Serratia marcescens*. На другую сторону засевают анаэроб. Края чашки заливают расплавленным парафином и помещают в термостат. Сначала размножаются аэробы, после того как весь кислород в чашке будет использован, начнется рост анаэробов.

### **Демонстрация**

1) всех вариантов посевов и пересевов бактерий со скошенно-го агара на скошенный, со скошенного агара на бульон, с бульона на бульон с помощью петли или пастеровской пипетки;

2) методов посева по Дригальскому.

### **Методические рекомендации к выполнению практических заданий**

1. Группа студентов из 3–4-х человек производит посев взвеси испражнений шпателем по Дригальскому на три чашки со средами Эндо.

2. Студент, сидя прямо перед горячей спиртовкой, берет пробирку с исследуемым материалом в левую руку, а петлю за петледержатель – в правую. Петлю прокаливают в пламени горелки. Пробку вынимают из пробирки, зажимая между мизинцем и безымянным пальцем правой руки и краем ладони, и обжигают край пробирки. Петлю вводят в пробирку, охлаждая о внутреннюю поверхность стекла, после чего легким скользящим движением берут материал. Затем вынимают петлю из пробирки, снова обжигают край и закрывают пробкой. Исследуемый материал петлей наносят на поверхность питательного агара, в верхней части чашки густо заштриховывают зигзагообразными движениями петли, освобождая от излишнего материала, затем наносят параллельные штрихи по остальной части среды. После посева петлю обязательно прокаливают в пламени. Чашки ставят в термостат вверх дном на сутки.

3. При просмотре чашек с ростом колоний из исследуемого материала изучают изолированные колонии, обращая внимание на их величину, форму, цвет, консистенцию, контуры края, структуру и характер поверхности.

4. Для выделения чистой культуры бактерий часть одной изолированной колонии снимают стерильной петлей, не задевая соседние колонии, и пересевают в пробирку со скошенным агаром. Для этого пробирку со скошенным агаром берут в левую руку, а правой вынимают пробку, как описано выше, и вносят петлю со снятой колонией, опуская её до конденсата в нижней части среды, зигзагообразным движением распределяют по скошенной поверхности агара. Вынув петлю, обжигают край пробирки, закрывают пробкой. Петлю стерилизуют в пламени горелки и ставят в штатив.

5. Техника посева бактерий на скошенный агар сводится к следующему: пробирку с культурой и пробирку со стерильной средой берут в левую руку, так чтобы пробирка с культурой была ближе к работающему, а стерильная дальше от него. Поверхности агара должны быть обращены кверху. В правую руку берут бактериальную петлю и прокалывают в пламени горелки, одновременно проводя через пламя часть рукоятки петледержателя. Следят за тем, чтобы прокаленная петля ни к чему не прикасалась.

Ватно-марлевые пробки обеих пробирок захватывают мизинцем и безымянным пальцами правой руки, вынимают и держат так, чтобы во время посева они также ни к чему не прикасались. Обжигают края открытых пробирок в пламени горелки, вводят простерилизованную остуженную петлю в пробирку с культурой и прикасаются к поверхности бактериального роста, легким скользящим движением набирают культуру и быстро переносят петлю в пробирку со стерильной средой. Петлю с культурой опускают до конденсационной воды и производят посев зигзагообразными движениями по скошенной среде агара. Вынув петлю, обжигают края пробирок и вставляют одновременно пробки в обе пробирки. Петлю прокалывают в пламени и ставят в штатив.

6. Техника посева на жидкие питательные среды, в основном такая же, как и на твердые. При работе с жидкими средами необходимо следить, чтобы жидкость не выливалась из пробирок и не смачивала их края и ватно-марлевые пробки.

7. Подсчет колоний. Для определения количества выросших колоний, а следовательно, степени загрязненности исследуемого материала применяют прямой подсчет их при помощи лупы, или,

в случаях большого количества выросших колоний, по секторам, а также при помощи автоматического счетчика или специальной камеры Вольфгюгеля. При этом чашку Петри с посевом помещают под стекло камеры и подсчитывают число колоний в 10 больших квадратах. Вычисляют среднее число на один квадрат и узнают количество колоний на всей площади чашки по формуле:  $N = x \times \pi r^2$ , где  $N$  – число колоний на всей чашке,  $x$  – среднее число колоний на одном квадрате,  $\pi = 3,14$ ,  $r$  – радиус чашки Петри = 5 см.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое колония и чистая культура микроорганизмов?
2. Дайте определение понятий: вид, штамм, клон, культура бактерий.
3. Методы и этапы выделения чистых культур аэробных бактерий. От чего зависит выбор определенного метода?
4. Какие бывают формы колоний микробов?
5. Какие признаки колоний имеют дифференциальное значение?
6. Для чего необходимо получить рост изолированных колоний?
7. Какие методы посева используют для получения изолированных колоний?
8. Какие правила необходимо соблюдать при посеве культуры?
9. Способы и цель подсчета колоний.
10. Биологическое окисление (дыхание) у анаэробных и аэробных бактерий.
11. Как создать бескислородные условия, необходимые для выращивания анаэробных бактерий?
12. Назовите облигатных анаэробов. Чем отличаются облигатные анаэробы от факультативных?
13. Что собой представляет анаэроостат?
14. Механизм и скорость размножения микробов. Фазы роста бактериальной культуры в жидкой питательной среде в стационарных условиях.
15. Устройство и принцип работы термостата.

## УИР № 8

### **Тема: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ. АНТИБИОТИКИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ**

#### **План**

1. Ферменты бактерий. Значение при определении вида микроба.
2. Биохимические признаки: углеводный и белковый обмен у бактерий, значение и методы изучения.
3. Факторы патогенности.
4. Антибиотики, источники получения.
5. Классификация антибиотиков по механизму действия и спектру.
6. Механизмы формирования антибиотикорезистентности и пути преодоления.
7. Методы определения антибактериального спектра действия антибиотиков.
8. Побочные действия при использовании антибиотиков.

#### **Ферменты бактерий и их выявление**

Ферменты – высокоспецифические белковые катализаторы, присутствующие во всех живых клетках, без которых невозможны жизнь и размножение. Ферменты распознают соответствующие им метаболиты (субстраты), вступают с ними во взаимодействие и ускоряют химические реакции. Ферменты являются белками (гликопротеинами). Ферментный состав микроорганизма определяется геномом и является стабильным признаком. Определение ферментов широко применяется для биохимической идентификации бактерий.

По расположению ферменты микробов делятся на экзоферменты и эндоферменты. Экзоферменты, выделяясь в окружающую среду расщепляют макромолекулы углеводов, белков, жиров до

более простых веществ, способных пройти в клетку. Эндоферменты катализируют метаболизм, проходящий внутри клетки.

Одни ферменты синтезируются бактериальной клеткой постоянно – это **конститутивные ферменты**, другие ферменты синтезируются только при контакте с определенным субстратом – **индуцибельные ферменты**.

Каждый микроб имеет определенный набор ферментов, который генетически запрограммирован и является постоянным признаком, что используется при идентификации бактерий.

Многие микробы выделяют ферменты, способствующие проявлению болезнетворных свойств, так как субстратом для их действия являются вещества, входящие в состав клеток и тканей организма. К ним относятся: гиалуронидаза, фибринолизин, нейраминидаза, коллагеназа, лецитиназа (лецитовителлаза), плазмокоагулаза, уреазы и др.

Все ферменты подразделяются на шесть классов: трансферазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтетазы), оксидоредуктазы, гидролазы.

**Трансферазы** – ферменты, которые катализируют перенос отдельных частей молекул или целых атомных группировок от одних соединений к другим. Эти ферменты в повседневной лабораторной практике не определяют.

**Лиазы** – это ферменты, которые катализируют отщепление от субстратов определенных химических групп с образованием двойных связей или присоединение отдельных групп (например, аминокрупп, альдегидных групп) по месту двойных связей без участия воды (декарбоксилазы, дезаминазы).

**Изомеразы** – это ферменты, производящие глубокие внутримолекулярные перестройки, т. е. превращение органических соединений в их изомеры (изомеразы, трансферазы). В лабораторной практике эти ферменты не выявляют.

**Лигаза** – это ферменты, которые катализируют синтез сложных органических веществ (сшивание, лигирование) из простых соединений с одновременным разрывом фосфатных связей (аспарагинсинтетаза, кокарбоксилазы).

**Оксидоредуктазы** – это ферменты, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции и встречаются во всех

живых клетках. Их основная функция – обеспечение организма энергией в доступной для использования форме. Представителями оксидоредуктаз являются дегидрогеназы, оксидазы, пероксидазы, гидроксиллазы, оксигеназы, каталаза. При идентификации бактерий в основном используют методы выявления каталазы.

Каталаза разлагает пероксид водорода на воду и молекулярный кислород. Этот фермент выявляют по образованию пузырьков кислорода после смешивания микробной суспензии с 1%-м раствором перекиси водорода на стекле или после нанесения раствора перекиси водорода на культуру, выросшую на поверхности плотной питательной среды.

**Гидролазы** – ферменты, которые катализируют реакции расщепления и синтеза белков, жиров и углеводов с участием воды.

### **Биохимические признаки: углеводный и белковый обмен бактерий, значение и методы изучения**

Устойчивость ферментных систем бактерий позволяет использовать их биохимические свойства в сочетании с морфологическими, культуральными и другими признаками для идентификации бактерий и установления микробиологического диагноза.

**Углеводный обмен** – способность бактерий усваивать углеводы. Углеводы необходимы бактериям для получения энергии и как пластический материал для биосинтеза веществ собственного организма. Усвоение бактериями полисахаридов – крахмала, клетчатки – происходит под влиянием экзоферментов (амилазы, целлюлазы) до моносахаров: лактозы, мальтозы, глюкозы и др., которые легко диффундируют внутрь клетки и там под влиянием эндоферментов подвергаются дальнейшим превращениям, в результате чего образуются кислоты (молочная, уксусная, муравьиная и др.). Полное расщепление кислот заканчивается образованием углекислого газа, водорода. Разнообразие конечных продуктов распада определяется набором ферментов, специфическим для каждого вида бактерий. Поэтому конечные продукты распада углеводов всегда определенные, что позволяет установить вид микроба. Конечные продукты распада выявляют после посева исследуемой культуры на дифференциально-диагностические среды *Гисса* – жидкие или полужидкие.

*Среда Гисса жидкая* представляет собой набор пробирок, содержащих в каждой пробирке пептонную воду и различные углеводы: лактозу, глюкозу, маннит, мальтозу, сахарозу и т. д. и индикатор – бром-крезол пурпурный.

Для улавливания образующихся газов в пробирку помещают поплавки (стеклянные трубочки, запаянные с одного конца), которые при стерилизации заполняются средой. Исходный цвет среды – фиолетовый. При расщеплении углевода только до кислоты наблюдается изменение цвета среды на желтый, а при образовании еще и газа последний накапливается в поплавке. Если углевод не расщепляется, цвет среды не изменяется.

*Полужидкие среды Гисса* содержат 0,2–0,5 % МПА, 1 % одного из углеводов и индикатор – бром-крезол пурпурный.

При расщеплении углевода цвет среды становится желтым, а при образовании газа отмечаются разрывы среды или пузырьки газа.

Каждый вид бактерий ферментирует только определенный спектр углеводов, поэтому в одних пробирках цвет среды меняется, а в других остается исходным, в результате чего наблюдается «пестрый ряд». Иными словами, для каждого вида бактерий характерен свой «пестрый ряд». Это позволяет отличить один вид бактерий от другого.

Способность разлагать различные углеводы обнаруживается при посеве выделенной чистой культуры на среды Гисса.

**Белковый обмен** – способность бактерий расщеплять белки, который также складывается из двух звеньев – распада и синтеза. Бактерии выделяют гидролитические ферменты – экзопроteaseы. При их участии белковая молекула гидролизуется до пептидов, способных диффундировать внутрь клетки, где под действием эндоферментов – пептидаз – пептиды гидролизуются до аминокислот. Часть аминокислот подвергается дальнейшему внутриклеточному расщеплению. В итоге выделяется энергия и образуются конечные продукты распада. Разнообразие конечных продуктов распада определяется набором ферментов, специфических для каждого вида микроорганизмов, что позволяет определить вид микроба. Конечными продуктами распада белков могут быть индол, сероводород

и аммиак. Для обнаружения этих продуктов используют индикаторные бумажки, которые помещают внутрь пробирки между стенкой пробирки и ватно-марлевой пробкой. Индикатором на индол является щавелевая кислота. Пропитанная щавелевой кислотой индикаторная полоска при наличии индола изменяет цвет с белого на красный. Индикатором на сероводород является ацетат свинца. При наличии сероводорода белая индикаторная полоска приобретает черный цвет, вследствие образования сульфида свинца.

Гидролитические ферменты – *протеазы бактерий* выявляют при посеве чистой культуры на специальные питательные среды – мясопептонный желатин – МПЖ. Результат оценивают по разжижению желатина.

Разные виды бактерий имеют разную форму разжижения желатина: золотистый стафилококк – в виде воронки, холерный вибрион – в виде гвоздя и т. д. (рисунок 3).

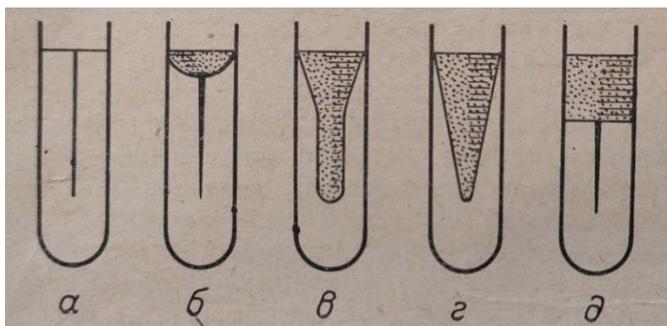


Рисунок 3 – Характер разжижения желатина при посеве уколом: а – линия укола при посеве; б – разжижение желатина в форме: б – гвоздя; в – чулка; г – воронкой; д – послойно

У патогенных бактерий часть экзоферментов называется *ферментами инвазии*. Эти экзоферменты способствуют проникновению и распространению бактерий в тканях макроорганизма, а также ослабляют его защитные силы. К ферментам инвазии относятся гиалуронидаза, коллагеназа, лецитиназа, ДНК-аза, лейкоцидин,

гемолизин, плазмокоагулаза, фибринолизин, нейраминидаза, протеаза и др.

В лабораторных условиях определяют такие ферменты патогенности бактерий, как гемолизин, лецитиназу, плазмокоагулазу и фибринолизин.

*Гемолизин* вызывает гемолиз эритроцитов. Присутствие гемолизина можно установить на кровяном агаре по образованию зоны просветления (зоны гемолиза) вокруг колоний.

*Лецитиназа* расщепляет лецитин. На желточном агаре действие этого фермента проявляется в виде опалесцирующей зоны (радужного венчика вокруг колоний).

*Плазмокоагулаза* вызывает коагуляцию плазмы крови (образование сгустка).

*Фибринолизин* лизирует фибриновые сгустки. Присутствие плазмокоагулазы и фибринолизина определяется с помощью одного теста.

В пробирку с плазмой вносят исследуемую культуру. При наличии плазмокоагулазы через 3–4 часа при комнатной температуре образуется сгусток. При дальнейшем культивировании при температуре 36 °С в случае синтеза фибринолизина сгусток разжижается.

Такие ферменты патогенности, как **нейраминидаза, гиалуронидаза, коллагеназа** в лабораторных условиях в повседневной практике не определяются.

### **Методические рекомендации к выполнению практических заданий**

1. Для определения сахаролитических ферментов произведите посев чистой культуры грамотрицательных микробов со скошенного агара на цветной ряд Гисса, а для определения протеолитических ферментов – в пробирку с МПБ, под пробку поместите индикаторные полоски, для выявления индола и сероводорода.

2. Рассмотрите демонстрации результатов биохимического тестирования представителей различных типов энтеробактерий, учтите их, используя таблицу 1. Таблицу перенести в тетрадь.

Таблица 1 – Идентификация бактерий семейства *Enterobacteriaceae* по биохимическим свойствам

Вид микроба	Среда Гисса					МПБ	
	ферментация углеводов					образование	
	лактоза	глюкоза	маннит	мальтоза	сахароза	индол	H <sub>2</sub> S
<i>E. coli</i>	КГ	КГ	КГ	КГ	-	+	±
<i>S. typhi</i>	-	К	К	К	-	-	+
<i>S. paratyphi A</i>	-	КГ	КГ	КГ	-	-	-
<i>S. paratyphi B</i>	-	КГ	КГ	КГ	-	-	+

Примечание. КГ – образование кислоты и газа.

3. **Решение задачи.** За сутки до получения результата в среды Гисса и МПБ был произведен посев чистой культуры разных видов грамотрицательных микробов. Демонстрация по конечным продуктам углеводного и белкового обмена, определите вид микроба.

4. Для определения фермента каталазы на предметное стекло нанесите каплю 3%-го раствора перекиси водорода, а рядом для контроля – каплю физиологического раствора. В обе капли внесите бактериальную петлю с культурой. Каталаза микробов под действием перекиси водорода разлагается на кислород и воду. Выделение пузырьков кислорода свидетельствует о наличии у данного вида бактерий фермента каталазы, участвующего в окислительно-восстановительных процессах.

### Антагонизм микроорганизмов

В естественных условиях микроорганизмы существуют в сложных ассоциациях, внутри которых складываются разнообразные взаимоотношения, определяющиеся, в первую очередь, физиолого-биохимическими особенностями членов ассоциаций, а также различного рода экологическими факторами. Взаимоотношения между микроорганизмами могут быть симбиотические (*симбиоз, метабиоз, сателлитизм, синельгизм*) и конкурентные (*антагонизм, паразитизм*).

*Симбиоз* – взаимоотношения микроорганизмов, при которых два или более вида микроорганизмов при совместном развитии создают для себя взаимовыгодные условия. Типичный пример таких взаимоотношений – совместное развитие аэробных и анаэробных бактерий. В кефирных зернах одновременно развиваются молочнокислые бактерии и дрожжи. При этом молочнокислые бактерии, испытывающие потребность в витаминах, в результате развития дрожжей, получают благоприятные условия для развития за счет подкисления среды.

При *метабиозе* продукты жизнедеятельности одного микроорганизма, содержащие значительное количество энергии, потребляются другими микроорганизмами в качестве питательного материала. Между ними складывается синтрофные связи, при которых субстрат используется одновременно несколькими видами микробов. В частности, некоторые инфекционные заболевания человека являются полимикробными, т. е. вызываются синтрофными ассоциациями бактерий. Газовая гангрена, например, обусловлена действием нескольких возбудителей из рода *Clostridium* в ассоциации с различными аэробными бактериями, стафилококками, стрептококками и другими.

Разновидностью метабиоза является *самеллитизм*, для которого характерно, что одни микроорганизмы выделяют в среду ростовые вещества (аминокислоты, витамины и др.), стимулирующие развитие другого микроорганизма или макроорганизма-хозяина, как например нормальная микрофлора у человека.

При *синергизме* у членов микробной ассоциации взаимно повышается физиологическая активность за счет выделения продуктов, стимулирующих их развитие.

Помимо благоприятных взаимоотношений между микроорганизмами наблюдаются и такие, при которых один вид микроорганизмов полностью или частично подавляет рост и развитие других видов, т. е. между ними при их развитии наблюдается *антагонизм*. Причины, приводящие к антагонизму, разнообразны:

- Антагонизм, складывающийся при совместном развитии разных видов, нуждающихся в одних и тех же питательных веществах. В этом случае преимущество будет у того микроорганизма, скорость роста которого выше скорости других.

- Атагонизм, связанный с образованием микроорганизмами органических кислот, спиртов или других продуктов обмена, которые изменяют условия среды, делая ее непригодной для развития других микроорганизмов. В процессе смены микрофлоры свежего молока в нем содержатся как кисломолочные, так и гнилостные бактерии. Вначале они развиваются одинаково, но в результате размножения молочнокислых бактерий накапливается молочная кислота и молоко значительно подкисляется. В этих условиях наблюдается подавление роста, а затем и полная гибель гнилостных бактерий.
- Антагонизм, связанный с образованием и выделением в окружающую среду **антибиотических веществ** (антибиотиков, бактериоцинов и др.).

Наиболее существенной формой конкурентных взаимоотношений, имеющей важное практическое использование, является образование микробами-продуцентами специфических продуктов обмена, угнетающих или полностью подавляющих развитие микроорганизмов других видов.

Практическое значение антагонизма для медицины:

- применение бактериальных препаратов, содержащих живых антагонистически действующих микроорганизмов для угнетения патогенных и условно-патогенных микробов и лечения нарушений нормального микробиоценоза кишечника – дизбактериоза (применяют биопрепараты: колибактерин, бифидумбактерин, лактобактерин и др.);
- использование микробов-антагонистов для производства антибиотиков.

### **Антибиотики**

**Антибиотики** – это вещества природного происхождения или их полусинтетические и синтетические аналоги, обладающие антимикробным, а в некоторых случаях и противоопухолевым действием.

Основными источниками получения природных и полусинтетических антибиотиков являются:

- Актиномицеты – ветвящиеся бактерии, они синтезируют большинство природных антибиотиков (80 %).
- Плесневые грибы – синтезируют природные β-лактамы (грибы рода *Penicillium* и *Cephalosporium*).
- Бактерии *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis* – продуцируют полимиксины и другие вещества, обладающие антибактериальным действием.

### Способы получения антибиотиков:

1) *биологический синтез* (так получают природные антибиотики – натуральные продукты ферментации, когда в оптимальных условиях культивируют микробы-продуценты, которые выделяют антибиотики в процессе своей жизнедеятельности);

2) *биологический синтез с последующими химическими модификациями* (так создают полусинтетические антибиотики). Сначала с помощью биосинтеза получают природный антибиотик, а затем его первоначальную молекулу видоизменяют путем химических модификаций, например присоединяют определенные радикалы, в результате чего улучшаются противомикробные и фармакологические характеристики препарата;

3) *химический синтез* (так получают синтетические аналоги природных антибиотиков, например хлорамфеникол/левомицетин). Это вещества, которые имеют такую же структуру, как и природный антибиотик, но их молекулы синтезированы химически.

### Краткая характеристика антибактериальных препаратов

Антибактериальные препараты разделяют на антибиотики – вещества природного происхождения или продукты их химической модификации и химиопрепараты – полностью синтетические соединения, не имеющие аналогов в живой природе. Классификация антибактериальных препаратов основана на их химической структуре и механизмах действия.

**БЕТА-ЛАКТАМЫ.** Основу молекулы составляет бета-лактамное кольцо, при разрушении которого препараты теряют свою активность; тип действия – бактерицидный. Антибиотики

этой группы подразделяют на *пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы*.

**Пенициллины.** Природный препарат – *бензилпенициллин* (пенициллин G) – активен против грамположительных бактерий, однако имеет много недостатков: быстро выводится из организма, разрушается в кислой среде желудка, инактивируется пенициллиназами – бактериальными ферментами, разрушающими бета-лактамное кольцо. Полусинтетические пенициллины (аминопенициллановой кислоте) различных радикалов, имеют преимущества перед природным препаратом, в том числе широкий спектр действия. Среди них встречаются следующие препараты:

- **депо-препараты**, например *бициллин*, который действует около 4 недель (создает депо в мышцах), применяется для лечения сифилиса, профилактики рецидивов ревматизма;
- **кислотоустойчивые** (*феноксиметилпенициллин*) для перорального приема;
- **пенициллиназа-устойчивые** (*метициллин, оксациллин*), но у них довольно узкий спектр;
- **широкого спектра** (*ампициллин, амоксициллин*);
- **антисинегнойные** (*карбоксипенициллины – карбенициллин, уреидопенициллины – типерациллин и азлоциллин*);
- **комбинированные** (амоксициллин + клавулановая кислота, ампициллин + сульбактам). В состав этих препаратов включены ингибиторы ферментов бета-лактамаз (клавулановая кислота и др.).

**Цефалоспорины.** Спектр действия широкий, но они более активны в отношении грамотрицательных бактерий. По последовательности внедрения различают 4 поколения препаратов, которые отличаются по спектрам активности, устойчивости к бета-лактамазам и по некоторым фармакологическим свойствам, поэтому препараты одного поколения не заменяют препараты другого поколения, а дополняют:

- **1-е поколение** (*цефазолин, цфалотин и др.*) – более активны в отношении грамположительных бактерий, разрушаются бета-лактамазами;

- **2-е поколение** (*цефуроксин, цефаклор и др.*) – более активны в отношении грамотрицательных бактерий, более устойчивы к бета-лактамазам;
- **3-е поколение** (*цефотаксин, цефтазидин и др.*) – более активны в отношении грамотрицательных бактерий и высоко-резистентны к действию бета-лактамаз;
- **4-е поколение** (*цефепим и др.*) – действуют, в основном, на грамположительные, некоторые грамотрицательные бактерии и синегнойную палочку, резистентны к действию бета-лактамаз.

**Карбапенемы** (*имипенем и др.*) – из всех бета-лактамов имеет самый широкий спектр действия и резистентны к бета-лактамазам.

**Монобактамы** (*астреонам и др.*) – резистентны к бета-лактамазам. Спектр действия узкий (очень активны против грамотрицательных бактерий, в том числе, против синегнойной палочки).

**ГЛИКОПЕПТИДЫ** (*ванкомицин и тейкопланин*) – это крупные молекулы, которым трудно пройти через поры грамотрицательных бактерий. Вследствие этого спектр действия ограничивается грамположительными бактериями. Их пользуют при резистентности или аллергии к  $\beta$ -лактамам, при псевдомембранозном колите, вызываемом *Clostridium difficile*.

**АМИНОГЛИКОЗИДЫ** – соединения, в состав молекулы которых входят аминоксахара. Первый препарат – стрептомицин – был получен в 1943 г. Ваксманом как средство для лечения туберкулеза. Сейчас различают несколько поколений препаратов:

- 1) *стрептомицин, канамицин и др.*;
- 2) *гентамицин*;
- 3) *сизомицин, тобрамицин и др.*

Препараты бактерицидны, спектр действия – широкий (особенно активны против грамотрицательных бактерий, действует на некоторых простейших).

**ТЕТРАЦИКЛИНЫ** – семейство крупномолекулярных препаратов, имеющих в своем составе 4 циклических соединения. В настоящее время в основном применяют полусинтетические, например *доксциклин*. Тип действия – статический. Спектр действия –

широкий (особенно часто используются для лечения инфекций, вызванных внутриклеточно расположенными микробами: риккетсиями, хламидиями, микоплазмами, бруцеллами, легионеллами).

**МАКРОЛИДЫ** (и азолиды) – семейство больших макроциклических молекул. *Эритромицин* – наиболее известный и широко используемый антибиотик. Более новые препараты: *азитромицин*, *кларитромицин* (их можно применять всего 1–2 раза в сутки). Спектр действия – широкий, включая внутриклеточные микроорганизмы, легионеллы, гемофильную палочку. Тип действия – бактериостатический (хотя в зависимости от вида микроба может быть и бактериоцидным).

**ЛИНКОЗАМИДЫ** (*линкомицин* и его хлорированный дегидрат – *клиндамицин*), бактериостатики. Спектр их действия похож на макролиды. Клиндамицин особенно активен против анаэробов.

**ЛЕВОМИЦЕТИН (ХЛОРАМФЕНИКОЛ)** имеет в составе молекулы нитробенzenовое «ядро», которое, к сожалению, делает препарат токсичным не только в отношении бактерий, но и для клеток организма человека. Статический тип действия. Спектр действия – широкий, включая внутриклеточных паразитов.

**РИФАМИЦИНЫ** (*рифампицин*). В основе препарата – крупная молекула со сложной структурой. Тип действия – бактерицидный. Спектр действия – широкий (в том числе внутриклеточные паразиты, очень эффективны против микобактерий). Сейчас применяются в основном только для лечения туберкулеза.

**ПОЛИПЕПТИДЫ** (*полимиксины*). Спектр антимикробного действия – узкий (грамотрицательные бактерии), тип действия – бактерицидный. Очень токсичный. Применение – наружное; в настоящее время не используется.

**ПОЛИЕНЫ** (*амфотерицин В*, *нистатин*, *леворин*). Противогрибковые препараты, токсичность которых достаточно велика, поэтому применяются чаще местно (нистатин), а при системных микозах препарат выбора – амфотеримин В.

## Синтетические противомикробные химиотерапевтические препараты

Методами химического синтеза создано много веществ, которые не встречаются в живой природе, но похожи на антибиотики по механизму, типу и спектру действия.

К настоящему времени создано много разновидностей антибактериальных, противогрибковых, противопротозойных синтетических химиотерапевтических лекарственных средств разного химического строения. К наиболее значимым группам относятся: сульфаниламиды, нитроимидазолы, хинолоны и фторхинолоны, имидазолы, нитрофураны и др.

**Хинолоны.** Первый препарат этого класса – *налидиксовая кислота* (1962 г.). У нее ограниченный спектр действия, к ней быстро развивается резистентность, применение нашла при лечении инфекций мочевыводящих путей, вызванных грамотрицательными бактериями.

**Фторхинолоны** – принципиально новые фторированные соединения. Преимущества фторхинолонов – разные способы введения, бактерицидное действие, хорошая переносимость, высокая активность в месте введения, хорошая проникаемость через гистогематический барьер, достаточно низкий риск развития резистентности. У фторхинолонов (*ципрофлоксацин, норфлоксацин* и др.) спектр – широкий, тип действия – бактерицидный. Применяют при инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями (в том числе синегнойной палочкой), внутриклеточными паразитами, микобактериями.

**Нитроимидазолы** (*метронидазол, трихопол*). Особенно активны против анаэробных бактерий, так как только эти микробы способны активировать метронидазол путем восстановления. Тип действия – бактерицидный, спектр – анаэробные бактерии и простейшие (трихомонады, лямблии, дизентерийная амеба).

**Имидазолы** (*клотримазол* и др.). Противогрибковые препараты, действуют на уровне цитоплазматической мембраны.

## Противовирусные средства

Среди препаратов, обладающих противовирусной активностью, выделяют несколько основных групп.

По химическому составу и механизму действия различают: химиотерапевтические препараты – интерфероны, индукторы эндогенных интерферонов, иммуномодуляторы.

Противовирусные химиопрепараты – синтетические лекарственные средства, используемые для этиотропной терапии. Механизм их действия заключается в избирательном подавлении отдельных этапов репродукции вирусов без существенного нарушения жизнедеятельности клеток макроорганизма. В настоящее время разработаны противовирусные лекарственные средства, угнетающие следующие стадии взаимодействия вируса с клеткой: процесс депротенизации вирусного генома – *производные адамантана*, синтез ранних вирусных белков – *гуанидин*, синтез нуклеиновых кислот – *аналоги нуклеозидов*, сборку вирусов – *производные типосемикарбозона* и др.

Таким образом, антимикробная химиотерапия препаратами является основным средством лечения и профилактики бактериальных и вирусных инфекций. Они производятся и выпускаются в огромных количествах в разных странах. Поэтому знание основных характеристик, а также механизмов действия и принципов применения химиотерапевтических препаратов необходимо каждому врачу.

### Механизм действия противомикробных химиотерапевтических препаратов

По механизму действия различают следующие группы противомикробных препаратов: *ингибиторы синтеза клеточной стенки*, *ингибиторы синтеза и функций цитоплазматической мембраны*, *ингибиторы синтеза белка на рибосомах*, *ингибиторы синтеза и функций нуклеиновых кислот*.

## Классификация антимикробных препаратов по механизму действия

Механизм действия	Наименование препарата
Подавление синтеза клеточной стенки	В-лактамы: пенициллины, цефалоспорины, карбапанемы, монобактамы. Гликопептиды – ванкомицин, бацитрацин
Нарушение функции цитоплазматической мембраны	Полимиксины-полимиксины М, В. Полиены – нистатин, леворин, амфотерицин В. Имидазолы – клотримазол, миконазол, кетаконазол
Подавление синтеза белка на рибосомах	Аминогликозиды – стрептомицин, канамицин, гентамицин, амикацин. Макролиды – эритромицин, олеандомицин, рокситромицин. Тетрациклины – окситетрациклин, доксициклин, вибрамицин. Левомецетин (хлорамфеникол). Линкозамиды – линкомицин, клиндамицин
Подавление синтеза нуклеиновых кислот	1. Подавляющие синтез предшественников пурин-пиримидиновых оснований – сульфаниламиды; 2. Подавляющие репликацию и функции ДНК – хинолоны, фторхинолоны, нитроимидазолы, нитрофураны; 3. Подавляющие РНК-полимеразы – рифампицины
Подавление репликации и транскрипции (противоопухолевых препаратов)	1. Актиномицины нарушают движение ДНК-полимеразы, препятствуя репликации ДНК. 2. Митомицины блокируют репликацию и транскрипцию

## Осложнения при антимикробной химиотерапии

Каждая группа антимикробных химиотерапевтических препаратов может оказывать побочное действие на макроорганизм, микробы и лекарственные средства.

Осложнение со стороны макроорганизма:

- Токсическое действие препаратов может проявляться как нейротоксическое – гликопептиды и аминогликозиды оказывают ототоксическое действие, вплоть до полной потери слуха за счет воздействия на слуховой нерв;
- Нефротоксическое – полиены, полипептиды, аминогликозиды, макролипиды, гликопептиды;
- Общетоксическое – полиены, имидазолы.
- Угнетение кроветворения – тетрациклины, сульфаниламиды и левомецетин/хлорамфеникол, которые содержат нитробензен – супрессор функции костного мозга;
- Тератогенное действие – аминогликозиды, тетрациклины нарушают развитие костей, хрящей у плода и детей, формирование зубной коричневой окраски зубов;
- Хлорамфеникол/левомецетин токсичен для новорожденных, у которых функции печени не полностью сформированы и возникает «Синдром серого ребенка».
- Хинолоны – действуют отрицательно на развивающуюся хрящевую и соединительную ткани.

**Дисбиоз – (дисбактериоз).** Антимикробные химиотерапевтические препараты, особенно широкого спектра воздействуют не только на возбудителей инфекции, но и на микроорганизмы нормальной микрофлоры.

В результате формируется дисбиоз – нарушаются функции ЖКТ; возникает авитаминоз и может развиваться вторичная инфекция эндогенная, например, кандидоз, псевдомембранозный колит, вызванный *Cl. difficile*.

**Отрицательное действие антибиотиков на иммунную систему.** Это, прежде всего, аллергические реакции. Причинами развития гиперчувствительности могут быть сам препарат, продукты его распада, а также комплекс препарата с сывороточными белками. Аллергические реакции развиваются примерно в 10 % случаев

и проявляются в виде сыпи, зуда, крапивницы, отека Квинке. Относительно редко встречается такая тяжелая форма проявления аллергической реакции как анафилактический шок. Такое осложнение чаще всего дают В-лактамы (пенициллины, рифампицины).

**Эндотоксический шок** (терапевтический) возникает при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Введение антибиотиков вызывает гибель и разрушение клеток, а также высвобождение больших количеств эндотоксина. Это закономерное явление, которое сопровождается временным ухудшением клинического состояния больного.

**Побочное действие антибиотиков на микроорганизмы.** Применение антимикробных химиотерапевтических препаратов оказывает на микробы не только прямое угнетающее или губительное воздействие, но также может привести к формированию атипичных и персистирующих форм микробов, например, к образованию L-форм бактерий или изменению других свойств микробов, что затрудняет диагностику инфекционных заболеваний.

Широкое использование антимикробных лекарственных средств ведет также к формированию антибиотикозависимости (редко) и лекарственной устойчивости – антибиотикорезистентности (достаточно часто).

### **Лекарственная устойчивость бактерий**

*Антибиотикорезистентность* – это устойчивость микробов к антимикробным химиотерапевтическим препаратам. Резистентность может быть природной и приобретенной.

*Природная лекарственная устойчивость бактерий.* Некоторые виды микробов природно устойчивы к определенным семействам антибиотиков или в результате отсутствия соответствующей мишени (например, микоплазмы не имеют клеточной стенки, поэтому не чувствительны ко всем препаратам, действующим на этом уровне), или из-за непроницаемости клеточной стенки бактерий для данного препарата (например, грамотрицательные микробы менее проницаемы для крупномолекулярных соединений, чем положительные бактерии, так как их наружная мембрана имеет «маленькие» поры).

*Приобретенная лекарственная устойчивость бактерий* – это биологическая закономерность, связанная с адаптацией микроорганизмов к условиям окружающей среды. К противомикробным химиотерапевтическим препаратам могут стать устойчивыми не только бактерии, но и остальные микробы – от эукариотов (простейших, грибов) до вирусов. Проблема формирования и распространения лекарственной резистентности микробов особенно значима для внутрибольничных инфекций, вызываемых госпитальными штаммами, у которых, как правило, наблюдается множественная устойчивость к антибиотикам (*полirezистентность*).

### **Генетические основы приобретенной резистентности**

Устойчивость к антибиотикам определяется и поддерживается генами резистентности и условиями, способствующими их распространению в микробных популяциях.

Приобретенная лекарственная устойчивость может возникать и распространяться в популяции бактерий в результате мутаций, переноса трансмиссивных плазмид резистентности, переноса транспозонов, несущих гены резистентности.

*Мутации в хромосоме бактериальной клетки с последующей селекцией (т.е. отбором) мутантов.* Особенно легко селекция происходит при наличии антибиотиков, так как в этих условиях мутанты получают преимущество перед остальными клетками популяции, которые чувствительны к препарату. Мутации возникают независимо от применения антибиотика, т. е. сам препарат не влияет на частоту мутаций и не является их причиной, но служит фактором отбора. Далее резистентные клетки дают потомство и могут передаваться в организм следующего хозяина (человека или животного), формируя и распространяя резистентные штаммы.

*Перенос трансмиссивных плазмид резистентности (R-плазмид).* Плазмиды резистентности часто кодируют устойчивость сразу к нескольким семействам антибиотиков. Некоторые плазмиды могут передаваться между бактериями разных видов, поэтому один и тот же ген резистентности можно встретить у бактерий, таксономически далеких друг от друга.

Реализация приобретенной лекарственной устойчивости возможна в результате модификации мишени, «недоступности» мишени и инактивации препарата бактериальными ферментами.

*«Недоступность» мишени* реализуется за счет снижения проницаемости клеточной стенки и клеточных мембран или *эффлюкс-механизма*, когда клетка как бы «выталкивает» из себя антибиотик.

*Инактивация препарата бактериальными ферментами.* Некоторые бактерии способны продуцировать особые ферменты, которые делают препараты неактивными (например,  $\beta$ -лактамазы, аминогликозид-модифицирующие ферменты, хлорамфеникол-ацетилтрансфераза). Бета-лактамазы – это ферменты разрушающие  $\beta$ -лактаманное кольцо с образованием неактивных с оединений. Гены, кодирующие эти ферменты, широко распространены среди бактерий и могут быть в составе как хромосомы, так и плазмиды.

Для борьбы с инактивирующим действием  $\beta$ -лактомаз используют ингибиторы (например, клавулановую кислоту, сульбактам, тазобактам). Эти вещества содержат в своем составе  $\beta$ -лактаманное кольцо и способны связываться с  $\beta$ -лактамазами, предотвращая их разрушительное действие на  $\beta$ -лактамы. При этом собственная антибактериальная активность таких ингибиторов низкая. Клавулановая кислота ингибирует большинство известных  $\beta$ -лактамаз. Ее комбинируют с пенициллинами: амоксициллином, тикарциллином, пиперациллином.

Предупредить развитие антибиотикорезистентности у бактерий практически невозможно, но необходимо использовать антимикробные препараты таким образом, чтобы не способствовать развитию и распространению устойчивости, в частности применять антибиотики строго по показаниям, избегать их использования с профилактической целью, через 10–15 дней антибиотикотерапии менять препарат, по возможности использовать препараты узкого спектра действия, ограниченно применять антибиотики в ветеринарии и не использовать их как фактор роста.

### **Принципы преодоления лекарственной устойчивости бактерий**

**I. Микробиологический принцип.** Антибиотики применяют только по показаниям. До назначения лечения взять у больного

материал для исследования, выделить чистую культуру и определить его чувствительность к антибиотикам – антибиотикограмму. Чувствительность определяют с помощью методов разведения и методов диффузии – бумажных дисков. Методы разведения позволяют выяснить не только, какой антибиотик активен в отношении данного микроба, но и определяет минимальную подавляющую концентрацию (МПК).

**II. Фармакологический принцип** основан на правильной дозировке препарата, соблюдении необходимости интервалов между введением, продолжительности антибиотикотерапии, методом введения, возможности сочетания различных лекарственных средств.

**III. Клинический принцип** – учитывает общее состояние больного, возраст, пол, иммунный статус, наличие беременности, сопутствующие заболевания. Лечение следует начинать, как можно раньше антибиотики необходимо назначать в максимальных дозах, не давая микроорганизмам адаптироваться.

**IV. Фармацевтический принцип** – срок годности, правила хранения.

**V. Эпидемиологический принцип** учитывает, к каким антибиотикам устойчивы микробы в среде, окружающей больного (в отделении больницы, географическом регионе). Распространенность устойчивости к данному антибиотику, насколько часто встречается антибиотикорезистентность штамма.

### **Определение чувствительности бактерий к антибиотикам**

Критерием чувствительности микроорганизмов к антибиотикам является минимальная концентрация антибиотика, ингибирующая (задерживающая) рост возбудителя при стандартных условиях постановки опыта.

Изучение чувствительности **диско-диффузионным способом** основано на диффузии антибиотика в питательную среду. Концентрация антибиотиков в дисках подобрана таким образом, чтобы диаметры зон задержки роста стандартных тест-микроорганизмов соответствовали международным стандартам.

Для исследования используют чистую культуру возбудителя, выделенную до начала лечения антибиотиками, из которой затем готовится клеточная взвесь на физиологическом растворе. С помощью оптического стандарта мутности на 0,5 ед. клеточная взвесь стандартизируется. Затем стерильным ватным тампоном, смоченным в приготовленной взвеси, исследуемые бактерии засевают в чашку Петри со специальной средой Мюллера – Хинтона. Заштриховывают всю поверхность агара вначале один раз, затем заштриховывают еще дважды, вращая чашку. Стерильным пинцетом на засеянную поверхность помещают на равном расстоянии друг от друга, от краев и центра чашки стандартные бумажные диски, пропитанные растворами различных антибиотиков. Засеянные чашки выдерживают в термостате при температуре, оптимальной для роста исследуемых бактерий. Если бактерии чувствительны к данному соединению, то вокруг дисков образуется зона задержки роста. Диаметр зоны задержки роста соответствует степени чувствительности исследуемого микроорганизма к данному антибиотику. Окончательный результат оценивается по специальным таблицам.

Метод дисков не дает надежных данных при определении чувствительности микроорганизмов к плохо диффундируемым в агар полипептидным антибиотикам (например, полимиксин, ристомицин). Если эти антибиотики предполагается использовать для лечения, рекомендуется определять чувствительность *методом серийных разведений*.

Жидкую среду (пригодную для роста данного микроба) разливают по 0,2 мл в 10 пробирок. Готовят раствор антибиотика, содержащий 100 ЕД в 1 мл, и добавляют 2 мл раствора в 1-ю пробирку. После тщательного перемешивания 2 мл переносят в следующую пробирку и т. д. Из 9-ой пробирки 2 мл удаляют. Десятая пробирка не содержит антибиотика и служит контролем. Суточную культуру микроба разводят с использованием стандарта мутности до густоты 10000 микробов в 1 мл, после чего в каждую пробирку вносят по 0,2 мл взвеси. После 20 час. инкубации в термостате учитывают результат. Среда в пробирках, в которых антибиотик находится в концентрациях, достаточных для подавления роста микроорганизмов, остается прозрачной. Наименьшая кон-

центрация антибиотика, при которой размножение микроорганизмов уже не происходит, а содержимое остается прозрачным, соответствует наименьшей ингибирующей концентрации данного антибиотика в отношении изучаемого микроорганизма и рассматривается как бактериостатическая, что означает задержку роста бактерий, но не наличие их гибели. Для определения бактерицидной концентрации исследуемого антибиотика в отношении изучаемого микроорганизма (т. е. концентрации препарата, в которой он вызывает гибель клеток) проводят посев бактериологической петлей из пробирок (содержимое которых не помутнело) на полноценную питательную агаризованную среду. Отсутствие роста свидетельствует, что в данной пробирке микроорганизмы полностью убиты антибиотиком.

**Методы определения минимальных ингибирующих и бактерицидных концентраций** – это комплексные методы, которые позволяют рассчитать дозу препарата, так как концентрация антибиотика в крови должна быть значительно выше минимальной ингибирующей концентрации для возбудителя инфекции. Введение адекватных доз препарата необходимо для эффективного лечения и профилактики формирования устойчивых микробов.

#### *Задание*

1. Изучить демонстрацию препаратов антибиотиков, используемых для лечения больных, флаконы с дисками, пропитанными антибиотиками.

2. Изучить результаты определения чувствительности к антибиотикам выделенных чистых культур стафилококка методом бумажных дисков. Для этой цели на чашке с питательной средой Мюллера – Хинтона, засеянные «газоном» испытуемой культуры были размещены бумажные диски, пропитанные различными антибиотиками. Оцените степень чувствительности на основании величины *диаметра зоны задержки роста бактерий вокруг диска*. Сравните диаметр зоны задержки роста с таблицей «Значение диаметров зон задержки роста (мм) для микроорганизмов».

Запишите результаты опыта в таблицу, отметив диаметр зон задержки роста бактерий вокруг дисков; сделайте выводы.

## Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков

Антибиотики				Заключение о степени чувствительности
Испытуемые культуры	Диаметр зоны задержки роста в мм			

### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Классификация ферментов по времени продукции механизму, месту действия.
2. Значение ферментов и их роль при определении вида бактерий.
3. Биохимическая идентификация микроорганизмов. Изучение углеводного обмена на среде Гисса, белкового обмена на МПБ.
4. Дифференциально-диагностические среды Эндо, Левина, Плоскирева, Ресселя, принцип их работы.
5. Методы определения протеолитических ферментов желатиназы.
6. Ферменты патогенности, их роль в патогенезе инфекционных заболеваний.
7. Способы обнаружения токсинов и ферментов патогенности микробов: гемолизина, лецитиназы, плазмокоагулазы, гиалуронидазы.
8. Классификация и роль пигментов микроорганизмов.
9. Микробный антагонизм.
10. Антибиотики, источники их получения.
11. Классификация антибиотиков по происхождению, механизму действия и спектру действия.
12. Принципы рациональной антибиотикотерапии, возможные осложнения, побочные действия.

13. Основные механизмы формирования резистентности микробов к антибиотикам.
14. Профилактика антибиотикорезистентности.
15. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.
16. Дисбактериоз и принципы его профилактики и инфекции.

## УИР № 9

### Тема: **МОРФОЛОГИЯ ВИРУСОВ. ВИРУСОСКОПИЧЕСКИЕ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ – БАКТЕРИОФАГИ**

#### План

1. Открытие, свойства и происхождение вирусов.
2. Структура вируса. Принципы классификации.
3. Вирусы бактерий – бактериофаги. Морфологические особенности.
4. Репродукция вирусов. Основные стадии взаимодействия вируса с клеткой хозяина.
5. Методы культивирования и индикации вирусов.

#### Учебный материал

##### Открытие вирусов

Вирусы, мельчайшие возбудители инфекционных болезней. В переводе с латинского *virus* означает «яд, ядовитое начало». До конца XIX в. термин «вирус» использовался в медицине для обозначения любого инфекционного агента, вызывающего заболевание. Современное значение это слово приобрело после 1892 года, когда русский ботаник Д.И. Ивановский установил «фильтруемость» возбудителя мозаичной болезни листьев табака (табачной мозаики). Он показал, что клеточный сок из зараженных этой болезнью растений, пропущенный через специальные фильтры, задерживающие бактерии, сохраняет способность вызывать те же заболевания у здоровых растений. Пять лет спустя другой фильтрующийся агент – возбудитель ящура крупного рогатого скота, был обнаружен немецким бактериологом Ф. Лёффлером. В 1898 году голландский ботаник М. Бейеринк повторил в расширенном варианте эти опыты и подтвердил выводы Ивановского. Он назвал «фильтрующееся ядовитое начало», вызывающее табачную мозаи-

ку, «фильтрующимся вирусом». Этот термин использовался на протяжении многих лет и постепенно сократился до одного слова – вирус.

В 1901 году американский военный хирург У. Рид и его коллеги установили, что возбудитель желтой лихорадки также является фильтрующимся вирусом. Желтая лихорадка была первым заболеванием человека, опознанным как вирусное, однако потребовалось еще 26 лет, чтобы ее вирусное происхождение было окончательно доказано.

### **Свойства и происхождение вирусов**

Наиболее просто устроенные вирусы состоят из нуклеиновой кислоты, являющейся генетическим материалом (геномом) вируса и покрывающего нуклеиновую кислоту белкового чехла. В состав некоторых вирусов входят также углеводы и жиры (липиды). Таким образом, вирусы можно рассматривать просто как мобильные наборы генетической информации. Вирусы лишены некоторых ферментов, необходимых для репродукции, и могут размножаться только внутри живой клетки, метаболизм которой после заражения перестраивается на воспроизводство вирусных, а не клеточных компонентов. Это свойство вирусов позволяет отнести их к облигатным (обязательным) клеточным паразитам. После синтеза отдельных компонентов формируются новые вирусные частицы. Симптомы вирусного заболевания развиваются как следствие повреждения вирусами отдельных клеток.

Принято считать, что вирусы произошли в результате обособления (автономизации) отдельных генетических элементов клетки, получивших, кроме того, способность передаваться от организма к организму. В нормальной клетке происходят перемещения нескольких типов генетических структур, например, матричной или информационной РНК (мРНК), транспозонов, Is-последовательностей, плазмид. Такие мобильные элементы, возможно, были предшественниками или прародителями вирусов. Являются ли вирусы живыми организмами? В 1935 году американский биохимик У. Стэнли выделил в кристаллической форме вирус табачной мозаики, доказав тем самым его молекулярную природу. Полученные результаты вызвали бурные дискуссии о природе вирусов: являют-

ся ли они живыми организмами или просто активированными молекулами? Действительно, внутри зараженной клетки вирусы проявляют себя как интегральные компоненты более сложных живых систем, но вне клетки представляют собой метаболически инертные нуклеопротеины. Вирусы содержат генетическую информацию, но не могут самостоятельно реализовать ее, не обладая собственным механизмом синтеза белка. Когда особенности строения и репродукции вирусов оказались выясненными, вопрос о том, являются ли они живыми, постепенно утратил свое значение.

**Вирусы** – это универсальные микроорганизмы, относящиеся к третьему царству живой природы – царству *Vira*. В отличие от других организмов они:

- Не имеют клеточную структуру.
- Содержат только одну из двух нуклеиновых кислот ДНК или РНК, выполняющих функцию генома.
- Не имеют собственных белоксинтезирующих и генерирующих энергию систем.
- Являются абсолютными внутриклеточными паразитами на генетическом уровне, полностью зависящими от клетки хозяина. Генетический уровень паразитизма проявляется тем, что вирусы вводят в клетку лишь свою генетическую информацию и репродуцируются в чувствительной клетке, согласно генетической программе, заложенной в нуклеиновой кислоте вируса, при этом вирусы репрессируют (подавляют) функцию клеточного генома, а её метаболические системы используются вирусом для синтеза собственных структурных компонентов. Более того, генетический аппарат вируса может встраиваться в клеточный геном и в дальнейшем функционировать и воспроизводиться как его часть.
- Отличаются особым – разобщенным (дизъюнктивным) способом репродукции, при котором синтез основных структурных компонентов вирусов (нуклеиновой кислоты и белков) происходит в разных участках пораженной клетки и в разное время с последующей сборкой и формированием новых вирусов.

Различают две формы существования вируса – внеклеточную и внутриклеточную. Внеклеточный вирус называется *вирионом*. Это покоящаяся (зрелая) форма вируса, не проявляющая жизнедеятельности. Функции вириона: сохранение вируса во внешней среде и перенос его из одного организма в другой и из одной клетки в другую.

Внутриклеточный вирус, представленный ДНК или РНК, репродуцируется в инфицированной клетке или же обуславливает иные типы взаимодействия вируса с клеткой.

### **Морфология вирусов (вирионов)**

Морфологию и структуру вирусов изучают с помощью электронного микроскопа, так как их размеры малы и находятся в пределах 20–350 нм.

Форма вирионов может быть различной: сферической, овоидной, икосаэдрической (многогранной), палочковидной, пулевидной, нитевидной.

По своим размерам вирусы в тысячу раз меньше бактерий, что обуславливает их проходимость через бактериальные фильтры. Размеры вирусов определяют с помощью электронной микроскопии или методом ультрафильтрации через фильтры с известным диаметром пор или методом ультрацентрифугирования. Одним из самых мелких является вирус полиомиелита – 20 нм, наиболее крупным – натуральной оспы, 350 нм.

Для вирусов характерна единая схема организации. В центре вириона располагается молекула нуклеиновой кислоты ДНК или РНК, окружённая белковой оболочкой – капсидом (от *лат. capsula* – футляр). Капсид состоит из повторяющихся морфологических субъединиц – капсомеров, количество которых может быть различным, но строго определённым для каждого вида вирусов (например, у вирусов полиомиелита капсид построен из 32 капсомеров, у вируса гепатита В – из 180 капсомеров). Белки капсидной оболочки просты и способны к самосборке. Их взаиморасположение определяет *тип симметрии нуклеокапсида: спиральный, кубический, смешанный*. Спиральный тип симметрии обусловлен винтообразной структурой нуклеокапсида, кубический – образовани-

ем полого тела из капсида, содержащего внутри нуклеиновую кислоту. От типа симметрии зависит форма вируса.

Различают *просто устроенные* и *сложно устроенные вирусы*.

Простые вирусы состоят из нуклеиновой кислоты, связанной с внутренними белками и капсидом, и представляет собой нуклеокапсид.

У сложных вирусов нуклеокапсид является сердцевиной вириона, поверх которой расположен суперкапсид – наружная вирусная оболочка клеточного происхождения, в которую вирион «одевается» при выходе из клетки путём почкования. В суперкапсид встроены вирусоспецифические поверхностные белки – гликопротеины, выступающие наружу в виде шипиков. Эти гликопротеины обладают разными свойствами у разных вирусов – гем-агглютинины, например, являются рецепторами распознавания, вызывают агглютинацию эритроцитов; нейраминидаза разрушает нейраминовую кислоту, входящую в состав клеточных стенок, таким образом, эти структуры ответственны за адгезию (адсорбцию) – прикрепление вириона к рецепторам клетки и инвазивность – проникновение в клетку. Капсид и суперкапсид защищают вирионы от влияния окружающей среды, обуславливают избирательное взаимодействие с клетками, определяют антигенные и иммуногенные свойства вирионов.

Вирусы имеют уникальный геном, они содержат либо ДНК, либо РНК. Функции вирусных нуклеиновых кислот, независимо от типа, состоят в хранении и передаче генетической информации. Вирусные ДНК могут быть двунитевыми, редко однонитевыми. Двунитевые ДНК бывают линейные с незамкнутыми кольцами, или линейные с замкнутыми кольцами, кольцевидные. Вирусные РНК, как правило, однонитевые, но имеются и двунитевые с фрагментированным геномом, линейные или кольцевые. Они могут быть представлены плюс- или минус-нитями. Плюс-нити функционально тождественны информационной РНК (и-РНК), т. е. способны транслировать закодированную в них генетическую информацию на рибосомы клетки хозяина. Минус-нити не могут функционировать, как и-РНК и для трансляции, содержащейся в них генетической информации необходим синтез комплементарной плюс-нити.

Важнейшей особенностью вирусных нуклеиновых кислот является инфекционность – способность вызывать в клетке-хозяине продуктивную инфекцию без участия других компонентов вируса.

### Систематика вирусов

По типу нуклеиновой кислоты представители царства *Vira* делятся на два подцарства: рибовирусы и дезоксирибовирусы. В подцарствах выделяют семейства, роды и виды. Принадлежность к тому или иному семейству определяется строением и структурой нуклеиновой кислоты, типом симметрии нуклеокапсиды, наличием суперкапсидной оболочки и другими свойствами.

Согласно современной классификации, вирусы патогенные для человека, входят в 22 семейства, из них 8 семейств составляют ДНК-геномные вирусы и 14 семейств – РНК-геномные. Еще недавно насчитывалось 19 семейств. В последние годы созданы новые семейства: *Astroviridae*, *Filoviridae*, *Circinoviridae*. Семейство *Papovaviridae* разделены на два: *Papillomaviridae* и *Poliomaviridae*. Есть изменения и в других таксономических категориях, потому как классификация вирусов продолжает дополняться и совершенствоваться.

### Классификация вирусов

Семейство	Вызываемые заболевания
<i>ДНК-геномные вирусы</i>	
<i>Poxviridae</i>	Натуральная оспа, оспа обезьян, оспа коров, контактиозная эктима, контактиозный моллюск, оспа Тана
<i>Herpesviridae</i>	Герпес лабиальный и генитальный, ветряная оспа и опоясывающий герпес (лишай), цитомегалия, инфекционный мононуклеоз
<i>Adenoviridae</i>	ОРВИ, гастроэнтериты
<i>Papillomaviridae</i>	Бородавки, рак шейки матки и др.
<i>Polyomaviridae</i>	Лейкоэнцефалопатия многоочаговая прогрессирующая
<i>Parvoviridae</i>	Инфекционная эритема, полиартрит
<i>Circinoviridae</i>	Гепатит ТТ

<i>Hepadnaviridae</i>	Гепатит В
<b><i>РНК-геномные вирусы</i></b>	
<i>Reoviridae</i>	ОРВИ, гастроэнтериты
<i>Picornaviridae</i>	Полиомиелит, гастроэнтериты, гепатит А, энтеровирусные, риновирусная инфекция, ящур
<i>Caliciviridae</i>	Гастроэнтериты, гепатит Е
<i>Coronaviridae</i>	ОРВИ, гастроэнтериты
<i>Flaviviridae</i>	Желтая лихорадка, лихорадка денге, омская геморрагическая лихорадка, японский энцефалит, клещевой энцефалит, гепатит С, гепатит G
<i>Paramyxoviridae</i>	Корь, ПСПЭ, эпидемический паротит, парагрипп
<i>Togaviridae</i>	Краснуха, карельская лихорадка
<i>Orthomyxoviridae</i>	Грипп А, В, С
<i>Rhabdoviridae</i>	Бешенство, везикулярный стоматит
<i>Bunyaviridae</i>	Геморрагическая лихорадка Крым-Конго, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом
<i>Arenaviridae</i>	Лимфоцитарный хориоменингит
<i>Filoviridae</i>	Африканские геморрагические лихорадки Эбола, Марбург
<i>Retroviridae</i>	ВИЧ-инфекция, Т-клеточный лейкоз

## Взаимодействие вируса с клеткой хозяина

### Продуктивный тип взаимодействия (репродукция вирусов)

Репродукция вирусов (от *англ.* reproduce – воспроизводить) – единый процесс, который условно подразделяют на несколько этапов:

1. Адсорбция вируса на клетке.
2. Проникновение вируса в клетку.
3. Депротенинизация вириона («раздевание», разрушение белковой оболочки).
4. Экспрессия вирусного генома и синтез компонентов вириона (транскрипция, трансляция, репликация).

5. Формирование вирионов (морфогенез).

6. Выход из клетки нового поколения вирионов.

Адсорбция вирусов на клетке осуществляется при соответствии рецепторов мембраны клетки человека и вирусов. У простых вирусов рецепторы – это прикрепительные белки на поверхности капсида, у сложных гликопротеины, образующие шипики на поверхности суперкапсида. Рецепторы, расположенные на клеточной мембране, могут иметь различную природу – протеины, липо- или гликопротеины, липиды. Со способностью вирусов избирательно прикрепляться к соответствующим клеточным рецепторам связан тропизм вирусов. Например, вирус гриппа – пневмотропный, ВИЧ – иммунотропный, вирус оспы – дермотропный, вирус бешенства – нейротропный и т. д.

Проникновение вирионов в клетку происходит путем рецепторного эндоцитоза (виropексиса) или путем слияния мембран суперкапсида вируса и клетки. При виropексисе после адсорбции вирусов происходит инвагинация (впячивание) участка клеточной мембраны и образование внутриклеточной вакуоли, которая содержит вирион. Вакуоль с вирионом может транспортироваться в любом направлении в разные участки цитоплазмы или в ядро клетки.

Депроотеинизация вирусов – освобождение от окружающих оболочек нуклеиновой кислоты. Освобожденная геномная нуклеиновая кислота вируса приобретает способность индуцировать репродукцию вируса. Она дезорганизует работу клеточных систем, подавляет собственный клеточный метаболизм, «заставляет» клетку синтезировать новые вирусные белки и нуклеиновые кислоты, идущие на построение вирусного потомства.

Транскрипция (от *лат.* transcription – считывание, переписывание) сопровождается синтезом информационных РНК, комплементарных – матричным ДНК или РНК вирусов.

Во время трансляции (от *лат.* translation – передача) происходит синтез белков на рибосомах клетки с участием и-РНК.

Репликация (от *лат.* replicatio – повторение) сопровождается синтезом молекул нуклеиновой кислоты, гомологичных геному.

Транскрипция и трансляция имеют свои особенности в зависимости от типа и строения вирусных нуклеиновых кислот и происходят по следующей схеме:

У ДНК содержащих вирусов: геномная ДНК → транскрипция и-РНК → трансляция → белок.

У плюс-РНК вирусов геномная РНК одновременно является информационной РНК, поэтому стадия транскрипции отсутствует, и схема укорочена: геномная плюс-РНК → трансляция → белок.

У минус-РНК вирусов (с однонитевой и двунитевой РНК): геномная минус-РНК → транскрипция и-РНК → трансляция → белок.

Сборка-формирование вирионов из отдельных компонентов вируса. Синтезированные вирусные нуклеиновые кислоты и белки обладают способностью специфически «узнавать» друг друга и при достаточной концентрации самопроизвольно соединяются в результате гидрофобных, водородных связей.

Выход нового поколения вирионов из клетки происходит у разных вирусов разными механизмами: или при разрушении клетки, или путем почкования.

*Первый тип* – взрывной, характеризуется одновременным выходом всех синтезированных вирусов. При этом клетка быстро погибает. Такой способ выхода характерен для простых вирусов.

*Второй тип* наблюдается у сложных вирусов, которые почкуются («просачиваются») через поры мембраны клетки, одновременно приобретая суперкапсидную оболочку клеточного происхождения со встроенными вирусными белками – гликопротеинами. При этом клетка погибает не сразу, продолжая поддерживать репродукцию и выделяя новые поколения вирионов.

Таким образом, синтез вирусных нуклеиновых кислот и белков, а также сборка и формирование новых вирионов происходят в определенной последовательности, разобщен во времени и пространстве, т. е. протекает в разных структурах ядра и цитоплазме клетки. Этот уникальный способ размножения вирусов называется дизъюнктивный (от *лат. disjunctus* – разобщенный).

Время, необходимое для осуществления полного цикла репродукции вирусов, варьирует от 5–6 часов (вирус гриппа, вирус натуральной оспы и др.) до нескольких суток (вирус Коксаки, аденовирусы и др.). Образовавшиеся вирусы способны инфицировать новые клетки и проходить такой же цикл репродукции.

**Интегративный тип взаимодействия (виrogenия)** характеризуется встраиванием (интеграцией) вирусной нуклеиновой кислоты в геном клетки. При этом вирусный геном реплицируется и функционирует как составная часть клеточного генома. Геном вируса, находящийся в составе генома клетки, называется провирусом, а такое состояние клетки обозначается как виrogenия. При делении клетки провирус переходит в геном дочерних клеток, т. е. состояние виrogenии наследуется. Провирус несет дополнительную генетическую информацию, в результате чего клетки приобретают ряд новых свойств. Так, интеграция может являться причиной возникновения ряда аутоиммунных и хронических заболеваний, разнообразных опухолей. Под воздействием ряда физических и химических факторов провирус может исключаться из клеточного генома и переходить в автономное состояние, с последующей репродукцией вируса и развитием продуктивной инфекции. С этим связано хроническое течение некоторых вирусных инфекций, при которых бессимптомные периоды чередуются с обострениями – рецидивами.

**Абортивный тип взаимодействия вируса и клетки** развивается до подавления клеточного генома. В этом случае генетическая информация вируса реализована не будет, а клетка восстановит свои функции. Абортивный тип взаимодействия вирусов с клеткой может возникать при заражении чувствительных клеток дефектными вирусами.

*Различают дефектные вирусы и дефектные вирионы.* Дефектные вирусы существуют как самостоятельные виды, которые репродуцируются лишь при наличии вируса-помощника (например, вирус гепатита D репродуцируется только в присутствии вируса гепатита В). Дефектные вирионы лишены части генетического материала и могут накапливаться в популяции многих вирусов.

### **Методы культивирования, индикации и идентификации вирусов**

Культивирование вирусов осуществляется с целью микробиологической диагностики инфекции, а также для получения диагностических, лечебных и вакцинных препаратов. Выращенные

вирусы определяют с помощью методов индикации и идентификации.

*Индикация вирусов* – обнаружение факта их репродукции, основана на выявлении характерных биологических свойств вирусов и особенностей их взаимодействия с чувствительными клетками.

*Идентификация* – определение вида и типа вирусов осуществляется, в основном, с помощью иммунологических реакций основанных на взаимодействии антигенов вирусов и соответствующих антител, содержащихся в иммунных диагностических сыворотках.

Вирусы культивируют в:

- организме чувствительных экспериментальных животных;
- оболочках и структурах развивающегося куриного эмбриона;
- культуре клеток.

Выделение и культивирование вирусов в организме экспериментальных животных – первый и долгое время единственный метод, с помощью которого удалось обнаружить целый ряд вирусов. Экспериментальных животных (взрослых или новорожденных белых мышей, хомяков, кроликов, обезьян и др.) заражают вирусосодержащим материалом различными способами: подкожно, внутримышечно, интраназально, интрацеребрально и т. д. в зависимости от тропности вирусов.

О репродукции вирусов в организме животных судят по развитию у них видимых клинических проявлений заболевания, патоморфологическим изменениям органов и тканей, а также на основании реакции гемагглютинации (РГА) с суспензией органов, содержащих вирусы. РГА основана на способности многих вирусов вызывать склеивание (агглютинацию) эритроцитов (человека, животных, птиц) в результате взаимодействия вирусных белков с рецепторами эритроцитов.

Использование животных для культивирования вирусов в диагностических целях ограничено из-за видовой невосприимчивости животных ко многим вирусам человека, контаминации животных посторонними микробами, а также по экономическим и этическим соображениям.

## Культивирование вирусов в развивающихся куриных эмбрионах

Куриный эмбрион – удобная модель для культивирования вирусов. Наличие плотной скорлупной оболочки защищает эмбрион от попадания микроорганизмов из внешней среды и, таким образом, вирусы размножаются в стерильных условиях.

*Строение куриного эмбриона.* Куриный эмбрион покрыт известковой оболочкой – скорлупой, к которой изнутри примыкает скорлупная оболочка, в тупом конце яйца она раздваивается и образует воздушное пространство. Под скорлупной оболочкой находится хорион-аллантаисная оболочка, богатая кровеносными сосудами, она служит эмбриону органом дыхания. Изнутри формируется аллантаисная полость, которая является органом выделения и защищает эмбрион от травм и высыхания. Аллантаисная полость окружает амниотическую, наполненную околоплодной жидкостью, внутри которой располагается эмбрион. Через желточный канатик эмбрион соединен с желточным мешком – основным источником питательных веществ. На поздних этапах развития эмбрион получает питательные вещества из белочного мешка, расположенного в остром конце яйца.

С целью культивирования вирусов куриные эмбрионы заражают патологическим материалом на хорион-аллантаисную оболочку, аллантаисную и амниотическую полости. Используют эмбрионы 10–12-суточного возраста. Отбирают жизнеспособные эмбрионы, просвечивая инкубированные яйца в овоскопе (специальный ящик с подсветкой). Через просвечивающую скорлупу видны: эмбрион, сосуды хорион-аллантаисной оболочки, границы воздушного мешка. Жизнеспособный эмбрион подвижен, кровеносные сосуды оболочки заполнены кровью. На скорлупе яйца карандашом отмечают границы воздушного мешка и положение эмбриона. Яйцо устанавливают вертикально на подставку тупым концом вверх. Проводят тщательную стерилизацию скорлупы до границ воздушного мешка: протирают спиртом, смачивают йодом, повторно обрабатывают спиртом с последующим обжиганием.

## **Техника закрытого метода заражения**

В скорлупе над воздушной камерой пробуравливают отверстие с помощью препаровальной иглы, через которые на хорион-аллантаисную оболочку вводится 0,1–0,2 мл вирусосодержащего материала шприцем или пастеровской пипеткой. Для заражения аллантаисной полости необходимо иглу шприца продвинуть в вертикальном направлении на 2–3 мм ниже уровня воздушной камеры и затем ввести такое же количество вирусосодержащего материала. При направлении иглы в амниотическую полость наблюдается смещение эмбриона, при этом вирусы размножаются не только в клетках амниотической оболочки, но и в тканях эмбриона. Отверстия в скорлупе после введения вирусосодержащего материала закрывают стерильным покровным стеклом, предварительно обмакнув его в расплавленный парафин. Зараженные эмбрионы помещают в термостат в вертикальном положении и инкубируют в течение 2–3 суток.

## **Техника открытого метода заражения в полости амниона**

Стерильными ножницами срезают скорлупу с тупого конца по границе воздушной камеры. Пинцетом осторожно удаляют подскорлупную оболочку, обнажая хорион-аллантаисную оболочку.

Прорезают ножницами небольшое отверстие в хорион-аллантаисной оболочке в том месте, где нет кровеносных сосудов, и вводят в прорезь глазной пинцет. Пинцетом захватывают оболочку амниона и вытягивают амниотический мешок над поверхностью хорион-аллантаисной оболочки.

Удерживая амниотическую оболочку, в полость амниона вводят шприцем 0,1–0,2 мл вирусосодержащего материала.

Отверстие в скорлупе закрывают стерильным колпачком, используя для фиксации и герметизации расплавленный парафин.

Зараженные эмбрионы инкубируют в течение 2-х суток в термостате.

Существуют и другие методы заражения, используемые значительно реже. Например, заражают непосредственно эмбрион, применяя *внутримышечный* или *внутримозговой* способ введения материала.

О репродукции вирусов в куриных эмбрионах свидетельствуют: специфические поражения оболочек и тела эмбриона (скопление вируса в виде бляшек, кровоизлияния; гибель эмбриона), положительная РГА с вирусосодержащей жидкостью, полученной из полостей зараженного эмбриона.

*Заражение в желточный мешок.* Этот метод в вирусологии применяется ограниченно и чаще используется для культивирования риккетсий и хламидий. Для заражения берут 5–6-дневные эмбрионы. Метод заражения в желточный мешок напоминает по своей технике заражение в аллантоисную полость, только игла шприца вводится немного глубже. В желточный мешок вводят 0,2–0,5 мл инфекционного материала, после чего прокол в скорлупе также герметично закрывают. Зараженные эмбрионы выдерживают в термостате от 3-х до 10 суток, что зависит от вида возбудителя болезни. Вскрыв эмбрион, извлекают желточный мешок и подвергают его дальнейшему исследованию.

### **Культивирование вирусов в культуре клеток**

**Культура клеток** – это клетки какой-либо ткани животных или человека, способные расти и размножаться вне организма в искусственных условиях *in vitro*.

Для приготовления культур клеток используют различные ткани животных, человека или птиц как эмбриональные, так и зрелые. Кроме нормальных, используют также злокачественно-перерожденные ткани, получаемые из опухолей. Источником эмбриональной ткани часто служит куриный эмбрион, абортированные эмбрионы человека, эмбрионы мышей, свиней, кроликов и др. Эмбриональная и опухолевая ткани отличаются лучшей выживаемостью и более активным ростом, чем ткани взрослого организма.

**Типы клеточных культур.** Культуры клеток делят на *первичные*, которые используют в течение одной генерации, и *перевиваемые*, которые поддерживают путем пассажей (перевиваний, переносов в стерильных условиях в пробирки или флаконы-матрасы, вследствие размножения и накопления избыточного количества клеток) длительное время. Клетки перевиваемой культуры ткани готовят из эмбриональных и злокачественных линий клеток, они

способны прочно прикрепляться к стеклу пробирки или флакона, образовывать монослой клеток и многократно размножаться *in vitro*.

Для поддержания жизнеспособности клеток применяются *специальные синтетические среды*. Синтетические среды готовят из определенного набора химических веществ, поэтому они имеют постоянный и точно известный состав. Чаще всего применяют *Среду 199 (Паркера)*, содержащую 61 компонент: 20 аминокислот, 17 витаминов, пурины, пиримидины, глюкозу, минеральные соли, индикатор изменения рН среды и ряд других веществ. Вариантом этой среды является *среда Игла* в состав, которой входит около 30 компонентов.

Для промывания тканей и клеток в процессе приготовления клеточных культур применяются *солевые растворы Хенкса и Эрла*. Основное назначение этих солей – создание буферности или изотоничности среды и обеспечение наиболее важными неорганическими ионами. Эти среды являются также основой для приготовления питательных сред для культивирования клеток.

Существуют *культуры переживающих тканей*, в которых клетки временно сохраняют жизнеспособность, но не размножаются, и *культуры растущих тканей*, в которых происходит активное размножение клеток.

В вирусологии используют только культуры растущих тканей, которые подразделяют на:

1. *Однослойные культуры клеток:*

- а) первичные культуры клеток;
- б) перевиваемые (стабильные) культуры клеток;
- в) полуперевиваемые культуры диплоидных клеток.

2. *Культуры суспензионных клеток.*

Однослойные культуры клеток – это культуры, клетки которых растут и размножаются, будучи прикрепленными к твердому субстрату (стеклу, пластику), образуя слой толщиной в одну клетку (монослой). Метод получения однослойных культур клеток основан на обработке исходной ткани ферментами (обычно трипсином), разрушающими межклеточные связи, в результате чего образуется взвесь изолированных клеток. При культивировании, клетки прикрепляются к стеклу сосуда (пробирки, матраца) и растут

в виде сплошного монослоя, благодаря чему удобно заражать их вирусами и визуально наблюдать возникающие изменения в динамике. Однослойные культуры характеризуются однородностью клеток, хорошей жизнеспособностью; можно получать большие количества подобных клеток. Обладая целым рядом преимуществ, однослойные культуры нашли широкое применение в вирусологии.

*Первичные культуры клеток.* Однослойные культуры клеток называют первичными, если они способны размножаться только в первой генерации. Поэтому каждый раз для приготовления первичных культур клеток берут и заражают исходный материал – эмбриональные или зрелые ткани животных, птиц или человека.

*Перевиваемые культуры клеток.* Это стабильные культуры клеток, которые способны бесконечно долго размножаться вне организма, если их культивировать в соответствующих условиях. Перевиваемую культуру клеток исходную (маточную) выращивают в матрасе с питательной Средой 199, еженедельно, пересевая культуру в новые сосуды. Например, перевиваемые культуры из амниона человека (FL, А-8), эмбриона мыши (ЗГЗ), опухолевых клеток человека (HeLa – из клеток рака шейки матки, Нер-2 из клеток опухоли гортани) и многие другие.

В ряде стран существуют специальные центры, где хранятся банки клеточных линий. Перевиваемые культуры клеток, без посева на свежую среду, быстро дегенерируют. При длительных пассажах, их исходные свойства могут изменяться.

Перевиваемые культуры клеток обладают целым рядом преимуществ, по сравнению с первичными. Работа с перевиваемыми культурами менее трудоёмка, они, как правило, свободны от латентных вирусов. Вирусологи различных стран могут пользоваться одними и теми же международными перевиваемыми клеточными культурами. Однако перевиваемые культуры непригодны для производства вирусных вакцин, так как существуют опасения их возможного озлокачествления.

*Полуперевиваемые культуры клеток* – это диплоидные клетки человека, способные к размножению вне организма на протяжении 50 пассажей. Культуры диплоидных клеток получают из различ-

ных тканей эмбриона человека. Так, например, широко применяются штамм ДКЛЧ (диплоидные клетки легких человека), штамм MRS-5 из легочной ткани эмбриона человека. Диплоидными культурами их называют, потому что они стойко сохраняют диплоидный кариотип, присущий исходным нормальным клеткам организма – родоначальникам диплоидной линии. Культуры диплоидных клеток применяют для выделения и культивирования вирусов. Незаменимыми они оказались в производстве культуральных вирусных вакцин.

*Суспензионная культура клеток* – это культура, в которой отдельные клетки, или их конгломераты постоянно находятся во взвешенном состоянии в жидкой среде. Культуры клеток в суспензии удается получить, если проводить их культивирование при постоянном интенсивном перемешивании среды. В таких условиях клетки не могут осесть и прикрепиться к стеклу, их рост и размножение происходит во взвешенном состоянии. Культивирование клеток в суспензии хорошо удается с перевиваемыми культурами клеток (обычно в Среде Игла). Перемешивание среды достигается путем вращения пробирок в барабане с помощью магнитной мешалки. Суспензионные клетки обладают большей активностью роста, накапливаются в большом количестве. При регулярной замене среды, длительное время остаются жизнеспособными.

### **Методика получения первичных культур фибробластов куриного эмбриона**

Куриные яйца, инкубированные 7–10 дней, просматривают в овоскопе. Убедившись в жизнеспособности эмбриона, карандашом очерчивают границу воздушного мешка. Перед вскрытием куриного эмбриона скорлупу протирают спиртом, йодом, снова спиртом и обжигают над пламенем спиртовки.

Стерильными ножницами срезают скорлупу с тупого конца по границе воздушного мешка, после чего пинцетом удаляют подскорлупную оболочку и извлекают тело эмбриона (отделяя его от головы, которую не используют). Тело эмбриона помещают в стерильную чашку Петри, куда добавляют 3–5 мл раствора Хенкса. Ткань измельчают ножницами до кусочков не более 1–2 мм.

Измельченные кусочки ткани переносят пастеровской пипеткой с широким капилляром в пробирку. Для отмывания ткани от крови в пробирку наливают 2 мл раствора Хенкса, затем дают жидкости отстояться и пипеткой удаляют её. Так повторяют 2–3 раза.

К отмытым кусочкам ткани добавляют 1–2 мл раствора трипсина и пипетируют путем насасывания пастеровской пипеткой и энергично выдувания на стенку пробирки в течение 5 минут. Под действием трипсина клетки ткани разъединяются и образуют суспензию. После оседания более крупных тканевых частиц на дно пробирки, верхний слой жидкости, содержащий взвесь изолированных клеток, переносят в центрифужные пробирки, куда наливают 3 мл гидролизата альбумина. Центрифугируют 10 мин при скорости 1000 оборотов в минуту. Затем надосадочную жидкость удаляют, а осадок ресуспендируют в небольшом количестве (5 мл) лактальбумина, чтобы клетки вновь оказались во взвешенном состоянии.

Фильтруют через марлю или сетку из нержавеющей стали. Производят подсчет клеток в камере Горяева под малым увеличением микроскопа. Определив концентрацию клеток во взвеси, её разводят гидролизатом лактальбумина до 400000 клеток в 1 мл.

Взвесь разливают в пробирки по 1 мл, закрывают резиновыми пробками и помещают в термостат при  $t$  37 °С в наклонном положении под углом 5°. Через 2–3 суток, при осмотре пробирок под микроскопом при малом увеличении, видны вытянутые, отростчатые клетки фибробластов, растущих на стенке пробирки и образующих тонкий монослой.

Первичные культуры клеток из другого исходного материала – почечной ткани животных, эмбриона человека и др., готовят аналогично, применяя некоторые технические особенности.

### **Методы индикации и идентификации вирусов в клеточных культурах**

**Индикация.** При заражении вирусами клеточных культур возникают специфические видимые проявления действия вируса:

- Цитопатическое (цитопатогенное) действие вируса на культуру клеток ЦПД, это деструкция клеток, изменение их

морфологии, формирование многоядерных симпластов или синцития, слияние клеток.

- Приобретение зараженной культурой клеток способности к гемадсорбции, т. е. к адсорбции эритроцитов на поверхности клеточного слоя.
- Образование в зараженной культуре клеток под слоем агарового покрытия характерных бляшек, являющихся негативными колониями вирусов.
- Подавление процессов метаболизма в зараженной вирусом культуре клеток, выявляемое с помощью цветной пробы.

**Идентификация выделенного вируса** проводится с помощью реакции нейтрализации с диагностическими вируснейтрализующими сыворотками. После предварительного контакта вируса с сывороткой, этой смесью заражают культуру клеток и судят о наступившей нейтрализации, указывающей на соответствие вируса и сыворотки по тем же критериям.

Вирус, нейтрализованный специфической сывороткой:

- не оказывает цитопатического действия – происходит реакция нейтрализации (торможения) цитопатического действия;
- не вызывает реакции гемадсорбции – наступает реакция задержки гемадсорбции;
- не дает образования бляшек, происходит реакция нейтрализации бляшкообразования;
- не вызывает подавления метаболизма клеток, что выявляется в реакции нейтрализации по цветной пробе

Таким путем проводят серологическую идентификацию вирусов, определяют их родовую и типовую принадлежность.

### **Выявление антител к вирусам**

По такому же принципу ставят реакцию нейтрализации для определения неизвестных антител в сыворотке крови больного. В этом случае исследуемую сыворотку соединяют с известным вирусом, а затем вышеуказанными методами определяют, произошла ли реакция нейтрализации. Положительная реакция указывает на то, что антитела сыворотки соответствуют взятому в опыт известному вирусу.

## Вирусы бактерий – бактериофаги

Вирусы, способные проникать в бактериальные клетки, репродуцироваться в них и вызывать растворение, получили название бактериофаги (от *лат.* *bacteriophaga* – разрушающий бактерии).

Особые вещества, растворяющие возбудителя сибирской язвы, открыл русский учёный Н.Ф. Гамалея в 1896 году и назвал их бактериолизинами. Такие же явления, но в отношении стафилококков, наблюдал английский учёный Э. Творт в 1915 году канадский исследователь Ф. д'Эрелль в 1917 году описал феномен литического действия фильтрата испражнений человека, переболевшего дизентерией, что сопровождалось просветлением бульонной культуры и образованием «стерильных пятен» на агаровой культуре возбудителя. Он назвал это явление бактериофагией, а литический агент, способный размножаться на соответствующих (гомологичных) бактериях – бактериофагом.

В дальнейшем выяснилось, что бактериофаги широко распространены в природе, они присутствуют в воде, почве, пищевых продуктах, различных выделениях из организма людей и животных, т. е. там, где имеются бактерии. Активность бактериофагов проявляется в виде лизиса (растворения) своих хозяев – бактерий. Бактериофаги обнаружены почти у всех видов бактерий и получили название по виду хозяина, например, дизентерийные, сальмонеллёзные, стафилококковые, дифтерийные и т. д.

Бактериофаги отличаются по форме, структурной организации, типу нуклеиновой кислоты и характеру взаимодействия с микробной клеткой.

**Морфология бактериофагов.** Большинство бактериофагов под электронным микроскопом имеют форму головастика или сперматозоида, у некоторых представителей форма кубическая или нитевидная. Размеры фагов, в зависимости от формы, находятся в пределах от 20 до 800 нм (у нитевидных фагов).

Головка большинства фагов имеет форму 6-угольной призмы, содержит нуклеиновую кислоту (ДНК или РНК) и белок. От головки отходит прямой отросток «хвост», длиной более 100 нм – продолжение белковой оболочки головки. Внутри хвостового от-

ростка находится полый цилиндрический стержень, сообщающийся отверстием с головкой, снаружи – чехол, способный к сокращению (наподобие мышцы). Хвостовой отросток заканчивается шестиугольной базальной пластинкой с короткими шипами, от которых отходят нитевидные структуры – фибриллы, осуществляющие процесс адсорбции фага на бактериальной клетке. Различают несколько морфологических типов бактериофагов – ДНК-содержащих, РНК-содержащих с длинным или коротким аналогом отростка.

**Резистентность.** Фаги более устойчивы к действию химических и физических факторов, чем бактерии. Ряд дезинфицирующих веществ (фенол, этиловый спирт, эфир или хлороформ) не оказывают существенного влияния на фаги. Фаги инактивируются при температуре 6 °С по Цельсию в течение 30–60 мин. УФ-облучение приводит к быстрой гибели бактериофагов. Большинство известных бактериальных фагов выдерживают давление в несколько тысяч атмосфер и могут длительно храниться в *лиофилизированном состоянии*.

**Взаимодействие фагов с бактериями.** Для бактериофагов характерна строгая специфичность, проявляющаяся в способности лизировать бактерии только одного вида (видовая специфичность), либо внутри вида (типовая специфичность). Если фаги лизируют бактерии близких видов, входящих в один род, например, в род *Shigella*, то они называются поливалентными.

По конечному результату взаимодействия с бактериальной клеткой все фаги разделяются на вирулентные и умеренные.

Инфицирование чувствительных бактериальных клеток вирулентными фагами называется **фаговой инфекцией** и сопровождается продуктивным типом репродукции, состоящим из этапов:

- Стадия адсорбции – при наличии соответствующих рецепторов на поверхности бактериальной клетки фаг фиксируется при помощи нитей отростка. На одной клетке может адсорбироваться 200–300 фагов.
- Стадия проникновения фаговой нуклеиновой кислоты внутрь бактерии происходит следующим образом: шипы базальной пластинки примыкают к бактериальной клетке, че-

хол сокращается, и через канал стержня нуклеиновая кислота фага впрыскивается внутрь клетки. Пустая белковая оболочка остаётся снаружи.

- Нуклеиновая кислота фага перепрограммирует обмен веществ бактерии на репродукцию нуклеиновой кислоты и белков фагов за счёт внутренних структур бактерии.
- Транскрипция, трансляция, репликация и сборка происходят примерно так же, как и при репродукции человеческих вирусов.
- Последним этапом фаговой инфекции является стадия лизиса клетки и выхода зрелых фагов, готовых к новому заражению. Далее литический процесс повторяется с новыми и новыми бактериальными клетками. Визуально в жидкой питательной среде это проявляется в виде просветления бульонной культуры, вплоть до полной прозрачности; на плотной питательной среде бактериофагия проявляется в виде прозрачных – «стерильных пятен» – фаговых колоний, которые могут сливаться в зону сплошного лизиса или сплошного «стерильного пятна».

**Умеренные фаги** взаимодействуют с бактериальной клеткой по интегративному типу. Они встраивают свою нуклеиновую кислоту в бактериальный геном. Фаговый геном, встроенный в геном бактериальной клетки, называется профаг. Профаг, ставший частью хромосомы клетки, при размножении реплицируется синхронно с геномом бактерии, не вызывая лизиса и передается по наследству от клетки к клетке неограниченному числу потомков. Симбиоз микробной клетки с умеренным фагом (профагом) называется лизогенией, а культура бактерий, содержащая профаг, получила название лизогенной. Это название отражает потенциальную способность лизогенных бактерий к лизису при освобождении профага из бактериального генома и перехода в вирулентный фаг, способный вызвать продуктивную инфекцию. Произойти это может под влиянием ряда физических и химических факторов.

Лизогенные культуры по своим основным свойствам не отличаются от исходных, но они невосприимчивы к повторному заражению гомологичным или близкородственным фагом и, кроме то-

го, приобретают дополнительные свойства, которые находятся под контролем генов профага. Изменение свойств микроорганизмов под влиянием профага получило название фаговой конверсии, при которой у бактерий могут изменяться культуральные, биохимические, токсигенные, антигенные свойства, чувствительность к антибиотикам. Примером изменения свойств бактерии может быть переход нетоксигенного штамма возбудителя дифтерии в токсигенный.

Иногда, переходя из интегрированного состояния в вирулентную форму, умеренный фаг может захватить часть хромосомы клетки и при лизисе её, переносить эту часть хромосомы в другую клетку. Перенос ДНК или её части от одной бактерии другой при участии умеренного фага называется трансдукцией.

Практическое применение бактериофагов основано на их строгой специфичности действия.

#### **Фаги применяют:**

- В диагностике инфекционных болезней – с помощью известных (диагностических) фагов проводят идентификацию выделенных культур микроорганизмов. Вследствие высокой специфичности фагов можно определить вид возбудителя или варианты (типы) внутри вида. Для этого применяют метод фаготипирования: на чашку с плотной питательной средой, засеянной «газоном» чистой культуры возбудителя, наносят капли различных диагностических типоспецифических фагов. Фаговар бактерий определяются тем типом фага, который вызвал ее лизис (образование стерильного пятна «бляшки» или «негативной колонии»).
- Фаготипирование имеет большое эпидемиологическое значение. Так как позволяет установить источник и пути распространения инфекции. Выделение бактерий одного вида от разных больных указывает на общий источник их заражения.
- По содержанию бактериофагов в объектах окружающей среды, например, в воде можно судить о присутствии в них соответствующих патогенных бактерий. Подобные исследования проводят при эпидемиологическом анализе вспышек инфекционных болезней.

- Фаги применяют также для лечения и профилактики ряда бактериальных инфекций. Производят брюшнотифозный, сальмонеллезный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый, стрептококковый фаги и комбинированные препараты (колипротейный, пиобактериофаги и др.)

**Лечебно-профилактические препараты бактериофагов** составлены из поликлональных вирулентных бактериофагов широкого диапазона действия, активные в отношении бактерий, устойчивых к антибиотикам. Их выпускают в жидком виде, таблетках, в виде суппозитория, мазей. Назначают внутрь, местно для орошения ран и слизистых, для введения в полость матки, мочевого пузыря, уха, придаточных пазух носа, а также в дренированные полости – брюшную, плевральную, в полости абсцессов после удаления экссудата. Бактериофаги способны быстро проникать в кровь и лимфу. Выводятся фаги через почки с мочой, из кишечника – с фекалиями.

Бактериофаги широко применяют в генной инженерии в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.

### **Методические рекомендации к выполнению практических заданий**

Изучить на таблицах и электронограммах:

- Морфологию и структуру вирионов.
- Схему строения бактериофагов
- Схему приготовления культуры клеток из куриного эмбриона.
- Различные типы однослойных культур клеток.
- Типы ЦПД вирусов.
- Бляшкообразование и реакция гемадсорбции в культуре клеток.
- Строение куриного эмбриона, способы заражения.

### **Демонстрация**

- флаконов с питательными Средами 199 (Паркера), Игла.
- с солевыми растворами Хенкса, Эрла.
- готовых результатов РГА, РТГА в лунках плексиглазовых панелей.

### **Задание:**

Поставить опыт – Идентификация культуры грамотрицательного микроба с помощью воздействия специфического фага.

В две пробирки с МПБ засевают грамотрицательную культуру. В одну из пробирок добавляют петлей дизентерийный бактериофаг (опыт). Обе пробирки ставят в термостат. Через 18–20 часов в пробирке, куда бактериофаг не добавляется (контроль), наблюдается сильное помутнение бульона – произошло размножение посеянной культуры. Бульон в опытной пробирке остается прозрачным вследствие лизиса культуры под влиянием бактериофага.

Вывод: грамотрицательная культура *Shigella dysenteriae*.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Природа, происхождение и общая характеристика вирусов.
2. Чем объясняется паразитизм на генетическом уровне?
3. Какие свойства лежат в основе классификации вирусов?
4. Морфология, ультраструктура и химический состав вирусов.
5. Репродукция вирусов.
6. Типы взаимодействия вируса с клеткой.
7. Дефектные вирусы.
8. Персистенция, вирогения.
9. Методы культивирования вирусов.
10. Культура ткани, источники получения, виды (первичные, перевиваемые, полуперевиваемые, суспендированные).
11. Методы индикации вирусов в культуре клеток (ЦПД, метод иммунофлюоресценции, бляшкообразование, включения, реакция гемадсорбции, цветная проба).
12. Оболочки и полости развивающегося куриного эмбриона.
13. Способы заражения куриного эмбриона исследуемым материалом.
14. Методы индикации вирусов в курином эмбрионе (визуальные изменения, реакция гемагглютинации).
15. Природа, ультраструктура и свойства бактериофагов.

16. Типы и основные стадии взаимодействия фага с бактериальной клеткой.

17. Вирулентные и умеренные фаги. Фаговая конверсия. Профаг, дефектный фаг. Фаги родовые, видовые, типовые.

18. Применение бактериофагов в медицинской практике.

## УИР № 10

### Тема: ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

#### План

1. Организация генетического аппарата у бактерий и вирусов. Генотип и фенотип.
2. Модификации. Диссоциации.
3. Мутации.
4. Генетические рекомбинации у бактерий: трансформация, трансдукция, конъюгация.
5. Идентификация нуклеиновых кислот. Полимеразно-цепная реакция (ПЦР).
6. Генная инженерия.

#### Учебный материал

##### Генетика микроорганизмов

**Генетика** – наука, изучающая механизмы и закономерности наследственности и изменчивости организмов, а также методы управления этими процессами.

*Наследственную функцию у бактерий* выполняет ДНК. Молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепочек. Каждый нуклеотид состоит из 3-х компонентов: азотистого основания, пятиуглеродного сахара и фосфорной кислоты. Азотистые основания представлены пуринами (аденин, гуанин) и пиримидинами (тимин, цитозин). Две длинные цепи, состоящие из нуклеотидов, спирально закручиваются вокруг друг друга, а пуриновые и пиримидиновые основания одной цепи соединяется водородными связями с основаниями другой цепи. Аденин всегда соединяется с тиминном, а гуанин – с цитозином.

Наследственная информация у бактерий хранится в форме последовательности нуклеотидов, которые определяют последовательность аминокислот в молекуле белка. Каждому белку соответствует свой ген.

**Ген** – участок молекулы ДНК, ответственный за синтез определенного белка.

**Генотип** – совокупность всех генов организма, его наследственная, материальная основа.

**Фенотип** – совокупность всех признаков и свойств организма, сформировавшихся на основе взаимодействия генотипа с условиями внешней среды.

**Генетический материал** у бактерий содержится в нуклеоиде и во внехромосомных генетических структурах. Нуклеоид (бактериальная хромосома) – хранитель наследственной информации, представлен двуцепочной молекулой ДНК кольцевой формы, имеет гаплоидный набор генов, кодирует жизненно важные для клетки функции. Способен к самостоятельному воспроизведению.

**Внехромосомные генетические элементы** – *плазмиды* представлены кольцевой молекулой ДНК, расположенной в цитоплазме микробной клетки. Плазмиды не являются жизненно важными для бактериальной клетки, но придают им дополнительные свойства, которые в определенных условиях окружающей среды обеспечивают им временные преимущества.

Возможные состояния плазмид:

- автономные и расположенные в цитоплазме клетки,
- интегрированные в нуклеоид.

### **Основные группы плазмид**

- Плазмиды обеспечивающие устойчивость бактерии к антибиотикам – это R-плазмиды, обнаруженные у различных видов бактерий. R-плазмиды содержат гены, ответственные за множественную устойчивость к лекарственным препаратам – антибиотикам, сульфаниламидам и др. препаратам. R-плазмиды содержат гены, кодирующие синтез ферментов: инактивирующий антибиотик, модифицирующий антибиотик, снижающий проницаемость клеточной стенки бактерий к антибиотику. Передача R-плазмиды привела их к широкому распространению среди бактерий и значительно осложнила химиотерапию инфекционных заболеваний.

- Плазмиды обеспечивающие продукцию факторов патогенности:
  1. Col-плазмиды – детерминируют синтез колицинов, обладающих бактерицидной активностью по отношению к колиформным бактериям.
  2. Hly-плазмиды, кодируют синтез гемолизина у *E. coli*.
  3. Ent-плазмиды определяют синтез энтеротоксина.
- F-плазида – половой фактор определяет способность бактерий к конъюгации и образованию половых килей, которые способствуют эффективному спариванию бактерий-доноров с реципиентными клетками при конъюгации. F-плазида реплицируется в независимости от хромосомы и передается при конъюгации в клетки бактерии – реципиентов. F-плазида может встраиваться в бактериальную хромосому и находиться в ней в интегрированном состоянии.

Пути передачи F-плазмиды: при конъюгации (грамотрицательные бактерии), при трансдукции (грамположительные бактерии).

**Подвижные генетические элементы** – реплицируются только в составе репликона (нуклеоида или плазмиды) – это Is-последовательности, транспозоны, умеренные фаги.

**Is-последовательности** простейший тип генетических элементов, мигрирующих от одной бактериальной хромосомы к другой или между хромосомой и плазмидой. Содержат только гены, необходимые для собственной миграции. Фенотипических признаков не кодируют, самостоятельно не реплицируются.

Свойства Is-последовательностей: небольшие размеры (800–1400) пар нуклеотидов, в свободном состоянии не существуют, способны перемещаться по геному.

Функции Is-последовательностей: координация взаимодействия внехромосомных факторов наследственности с бактериальной хромосомой и между собой, индукция мутаций (инверсии, дупликация нуклеотидов).

**Транспозоны** – нуклеотидные последовательности, способные менять место своей локализации в молекуле ДНК и способные мигрировать из одной молекулы ДНК в другую.

Свойства транспозонов: относительно большие генетические элементы, состоят из 2000 до 25000 пар нуклеотидов. Могут нахо-

даться в свободном состоянии в виде кольцевой молекулы. Могут мигрировать с одного репликона на другой. Могут нести информацию о синтезе бактериальных токсинов и ферментов, модифицирующих антибиотики.

**Изменчивость бактерий** может быть ненаследственной *фенотипической* – модификации, и наследственной *генотипической* – мутации, рекомбинации.

**Фенотипические изменения** микроорганизмов носят характер временных физиологических нарушений и легко обратимы. Эти изменения исчезают сразу же после прекращения воздействия факторов, вызывающих их. Такие временные, наследственно не закрепленные изменения получили название – *модификации*. Модификации возникают как адаптивные реакции бактерий на изменение окружающей среды. Модификации находятся под контролем генома, но не сопровождаются изменениями первичной структуры ДНК и вскоре утрачиваются. Модификации проявляются в изменении морфологических, биохимических и ряда других признаков. Примером модификации является нарушение синтеза клеточной стенки.

Под воздействием пенициллина или иммунной сыворотки появляются L-формы бактерий. Они могут сохраняться внутри клеток хозяина и вновь реверсировать к исходной форме после прекращения действия пенициллина. Своеобразной формой изменчивости является R-S-диссоциация бактерий – это образование двух форм бактериальных клеток, которые отличаются друг от друга по характеру образуемых ими колоний на плотной питательной среде. Один тип – R-колонии характеризуется неровными краями и шероховатой поверхностью, второй тип – S-колонии имеют круглую форму, гладкую поверхность, ровные края. Процесс диссоциации обычно протекает в одном направлении: от S- к R-форме. Обратный переход R-формы в S-форму наблюдается реже. Для большинства вирулентных бактерий характерен рост в виде S-формы колоний. Исключение составляют: туберкулезные, чумные, сибиреязвенные микробы. В процессе диссоциации одновременно с изменением морфологии колоний, меняются биохимические, антигенные, патогенные свойства бактерий, их устойчивость к физи-

ческим и химическим факторам внешней среды. R-S-диссоциация во многих случаях усложняет бактериологическую диагностику инфекционных болезней.

**Генотипическая изменчивость.** Изменение бактериального генома, следовательно, и свойств бактерий могут происходить в результате мутаций и рекомбинаций.

*Мутации.* Основу составляют изменения в последовательности нуклеотидов в ДНК. Мутации могут быть точечными, когда повреждение ограничивается одной парой нуклеотидов или хромосомными – протяженными (абберации), возникающими в результате выпадения большего или меньшего числа нуклеотидов (делеция), либо перестановки нуклеотидных пар (транслокация) либо повторения какого-либо фрагмента ДНК – дупликация. Мутации у бактерий обнаруживаются по изменению любого известного признака микроорганизма. Например, возникновение потребностей в факторах роста – аминокислотах, витаминах, т. е. ауксотрофности, устойчивости к антибактериальным препаратам, снижение вирулентности и так далее.

Существуют различные типы мутаций. По происхождению мутации могут быть спонтанными или индуцированными. Спонтанные возникают самопроизвольно, без воздействия извне, индуцированные под влиянием внешних факторов – мутагенов.

Мутагены бывают физической природы (ультрафиолетовые лучи, радиация), химической природы (нитраты, нитриты, бромурацил), биологического происхождения (транспозоны, Is-последовательности).

Перемещение Is-последовательностей, транспозонов из одного участка ДНК в другой или из хромосомы в плазмиду и, наоборот, может индуцировать мутации типа делеций и инверсий.

Мутации по направленности подразделяют на прямые и обратные. Мутации, возникающие в геноме у бактерий в естественных условиях обитания, называются прямыми. Образовавшиеся особи являются мутантами. Мутации, завершающиеся возвратом от мутагенного типа к дикому, называются обратными, или реверсией. Особи, возникшие в результате обратных мутаций, называются ревертантами. Реверсии возникают под действием тех же факторов окружающей среды, которые вызывают появление пря-

мых мутаций. Большинство происходящих в ДНК изменений приводит к вредным мутациям, либо вызывает гибель микроорганизмов. Поэтому все клетки имеют особые механизмы реконструкции, исправления повреждений.

**Генетические рекомбинации.** Длительное время считали, что бактерии – изолированные генетические системы, и каждая особь имеет одного родителя, т. е. их изменчивость может быть вызвана только мутациями. Позже выяснилось, что подобно высшим организмам, бактерии способны обмениваться генетическим материалом и, по аналогичным с половым размножением, давать потомство с новыми свойствами. Принципиальное отличие заключается в том, что при половом процессе женская и мужская половые клетки сливаются с полным перемешиванием признаков, в то время как при генетической рекомбинации слияния клеток не происходит, а только часть генетического материала донорской клетки переносится в реципиентную клетку, с образованием хромосомы имеющий части чужой ДНК. В итоге таких изменений ДНК бактерий появляются рекомбинантные штаммы, или рекомбинанты. В процессе генетического переноса участвуют бактерия-реципиент и бактерия-донор. Степень участия их не равномерна: в реципиентную клетку попадает лишь фрагмент ДНК бактерии-донора, который взаимодействует с цельной хромосомой реципиента, в результате чего происходит частичное перераспределение (рекомбинация) генетического материала с образованием одного рекомбинанта, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента с включенным в него фрагментом ДНК донора. Передача генетического материала между бактериями осуществляется тремя механизмами: трансформация, конъюгация, трансдукция.

*Трансформация* заключается в том, что ДНК, выделенная из бактерий в свободной растворимой форме, передаётся бактерии-реципиенту. При трансформации рекомбинация происходит, если ДНК бактерий родственны друг другу. В этом случае возможен обмен гомологичных участков собственной и проникшей извне ДНК.

Трансформация была обнаружена впервые у пневмококков. Пневмококки, содержащиеся в мокроте или тканях больного пневмонией, всегда имеют отчетливо выраженную полисахаридную капсулу и на чашках с сывороточным агаром образуют

S-колонии. Если культуру капсульных пневмококков многократно пересеивать на питательную среду, то появляются R-колонии в которых микробы лишены капсулы и авирулентны.

В 1928 году Гриффитс обнаружил, что если ввести мышам подкожно большое количество живых бескапсульных пневмококков вместе с убитыми нагреванием капсулами пневмококками, то через несколько дней мышь погибает. На вскрытии из крови и органов высеваются капсульные пневмококки, т. е. получился парадоксальный результат: капсульные пневмококки были убитые и размножаться не могли. Тем не менее в крови присутствовали капсульные пневмококки. Следовательно, из мёртвых клеток капсульного пневмококка выделилась ДНК и встроилась в хромосому бескапсульного пневмококка. В результате пневмококки приобрели способность синтезировать капсулу. Таким образом, трансформация – форма генетической изменчивости, при которой бактерия-реципиент поглощает и встраивает в свою хромосому фрагменты ДНК бактерии-донора. Это приводит к образованию рекомбинантных бактерий, обладающих некоторыми свойствами донорских клеток.

*Трансдукция* – передача ДНК от бактерии донора к бактерии-реципиенту при участии бактериофага. Различают неспецифическую трансдукцию, при которой возможен перенос любого фрагмента ДНК донора, и специфическую – перенос определенного фрагмента ДНК донора в определенные участки ДНК реципиента. Так, с помощью фага можно перенести любые гены, контролирующие способность синтезировать аминокислоты, пурины, пиримидины, гены резистентности к антибиотикам, ферментативные свойства, токсигенность, вирулентность и другие признаки.

*Конъюгация* – передача генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент путем непосредственного контакта клеток.

Необходимым условием является наличие в клетке-донора фактора плодovitости – F-фактора. F-фактор располагается в цитоплазме в виде кольцевой двуцепочной молекулы ДНК, является плазмидой. Он содержит гены, контролирующие процесс конъюгации и синтез F-пилей. Клетки-доноры, обладающие F-фактором, обозначаются как F<sup>+</sup>-клетки, а клетки-реципиенты, не

имеющие F-фактора – F-клетки. F-пили представляют собой конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которой плазмидная ДНК передается из бактерии-донора в бактерию-реципиент. В результате такого переноса клетка-реципиент получает донорские свойства. Если F-фактор встраивается в хромосому клетки-донора, то хромосома донора приобретает способность с высокой частотой передаваться в клетку-реципиент. Поэтому донорские клетки, имеющие встроенную в хромосому F-фактор, называются Hfr-клетками. Перенос хромосомных генов при конъюгации всегда имеет одинаковую направленность и поэтому используется для картирования генома бактерий и построения генетической карты.

### **Особенности генетики вирусов**

Особенность строения вирусного генома заключается в том, что наследственная информация может быть записана как на ДНК, так и на РНК в зависимости от типа вируса. Мутации у вирусов могут возникать спонтанно, в процессе репликации нуклеиновой кислоты вируса, а также под влиянием тех же внешних факторов, мутагенов, что и у бактерий. Мутации вирусного генома проявляются изменениями в антигенной структуре, неспособности вызывать продуктивную инфекцию в чувствительной клетке. Свойства вирусов могут изменяться при одновременном заражении чувствительной клетки несколькими вирусами. Причем изменения свойств могут происходить, как в результате обмена генетическим материалом, принадлежащим разным вирусам – при генетических рекомбинациях и генетической реактивации, так и в результате процессов, не сопровождающихся обменом генетического материала – при комплементации.

### **Генная инженерия**

Генная инженерия – это процесс получения рекомбинантных ДНК. Метод состоит из нескольких этапов:

- 1) выделение ДНК из клеток организма;
- 2) получение гибридных молекул ДНК путем встройки в исходную ДНК чужого гена, выделенного из другой ДНК или полученного химическим синтезом;

3) введение рекомбинантной ДНК в живую клетку – бактерий, дрожжей, растений, животных, человека;

4) создание условий для проявления генов рекомбинантной ДНК в живой клетке и секреции нового продукта, кодируемого чужим геном.

На этом принципе в настоящее время получены сотни рекомбинантных штаммов бактерий, дрожжей, способных продуцировать антигены, антитела, ферменты, гормоны, интерфероны.

### **Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней**

**Метод молекулярной гибридизации** позволяет выявить степень сходства различной ДНК. Он применяется при идентификации микробов для определения их точного таксономического положения. Метод основан на способности двунитовой ДНК при температуре 90 °С в щелочной среде расплетаться на две нити, а при понижении температуры на 10 °С вновь восстанавливать исходную двунитовую структуру.

Для проведения молекулярной гибридизации молекулу исследуемой ДНК расплетают, одну нить закрепляют на специальном фильтре, который помещают в раствор, содержащий радиоактивный зонд. Зондом называется одноцепочная молекула нуклеиновой кислоты, меченная радионуклеидами, с которой сравнивают исследуемую ДНК. При наличии комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют между собой двойную спираль.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Метод ПЦР основан на принципе естественной репликации ДНК: расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и комплементарное достраивание обеих нитей с помощью термостабильной ДНК-полимеразы, полученной из бактерий *Thermophilus aquaticus* (Тақ – ДНК-полимеразы).

ПЦР позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале по наличию ДНК микроба. Из исследуемого материала выделяют ДНК, а наличие возбудителя определяют по обнаружению в выделенной ДНК специфического для данного микроба гена.

Для обнаружения гена, его накапливают, затем нагревают. При этом ДНК распадается на 2 нити. Добавляют праймеры, затем

смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры, при наличии в смеси ДНК искомого гена, связываются с его комплементарными участками.

*Детекция продуктов ПЦР.* Для учета результатов ПЦР проводится электрофорез продуктов реакции в геле агарозы, окрашенном бромистым этидием. Реакция считается положительной, если полоса ДНК из исследуемого материала располагается на том же уровне, что и полоса положительного контроля. Толщина полосы оценивается по четырехбалльной системе. В отрицательном контроле ПЦР продукты отсутствуют.

### **Методические рекомендации к выполнению практической работы**

1. *Постановка опыта по трансформации ДНК донора *Bas. subtilis Try+* реципиенту *Bas. subtilis Try-*.*

К 1 мл 3-часовой бульонной культуры реципиента *Bas. subtilis Try-* добавляют в том же количестве ДНК донора *Bas. subtilis Try+*. Смесь инкубируют при 37 °С в течение часа, после чего 0,1 мл высевают на сектор в чашку Петри с минимальной средой *Try-*. В качестве контроля на два других сектора этой среды высевают ДНК *Try+* донора и культуру *Bas. subtilis Try-*. Посевы ставят на сутки в термостат. Учитывают результат по росту колоний рекомбинантных штаммов.

2. *Постановка опыта по трансдукции от донора *E. coli lac+* реципиенту *E. coli lac-* через трансдуцирующий фаг.*

К 1 мл 3-часовой бульонной культуры реципиента *E. coli lac* добавляют в том же количестве трансдуцирующий фаг, выделенный из культуры *E. coli lac+* в концентрации  $10^6$ – $10^7$ , смесь инкубируют при 37 °С в течение часа, после чего 0,1 мл высевают на среду Эндо. В качестве контроля на среду Эндо высевают также культуру *E. coli lac-* (реципиент без фага) и трансдуцирующий фаг *lac+*. Посевы ставят на сутки в термостат. Учет результатов производят по числу выросших окрашенных в малиново-красный цвет с металлическим блеском колоний.

3. *Постановка опыта по конъюгации от донора *E. coli Hfr* с генотипом *Thr+ Leu-* реципиенту с генотипом *Thr- Leu+*.*

Сущность опыта заключается в том, что от донорских клеток путем конъюгации передаются гены, контролирующие способность синтезировать *Thr*<sup>+</sup> клеткам-реципиентам, ауксотрофным по этой аминокислоте. В качестве донора используется культура *E. coli Hfr* с генотипом *Thr*<sup>+</sup> *Leu*<sup>-</sup>. Реципиентом служит культура *E. coli F* – с генотипом *Thr*<sup>-</sup> *Leu*<sup>+</sup>. Для выделения рекомбинантов используют минимальную среду *Thr*<sup>-</sup> *Leu*<sup>-</sup>. На этой среде могут расти только рекомбинанты. Культуры донорского и реципиентного штаммов не растут, так как первая ауксотрофна по *Leu*<sup>-</sup>, а вторая ауксотрофна по *Thr*<sup>-</sup>.

К 1 мл 3-часовой бульонной культуры реципиента добавляют 1 мл 3-часовой бульонной культуры донора. Смесь инкубируют при 37 °С в течение часа. Затем смесь в количестве 0,1 мл засевают на среду. В качестве контроля рядом на секторы высевают культуры донора и реципиента в том же объеме.

На следующие сутки регистрируют результаты опыта. На секторах с посевами контролей роста нет. На секторе с посевом рекомбинанта есть рост.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Основы медицинской генетики: понятия ген, фенотип, генотип, наследственность, изменчивость.

2. Виды изменчивости: ненаследственная (фенотипическая, модификационная), наследственная (рекомбинационная, мутационная).

3. Виды мутаций: спонтанные, индуцированные, генные, хромосомные, прямые, обратные.

4. Какова роль мутаций в изменении вирулентности микробов, в формировании лекарственной устойчивости?

5. Мутагенные факторы (физические, химические, биологические).

6. Диссоциации и формы её проявления.

7. Генетические рекомбинации у бактерий и механизмы передачи генетической информации: трансформация (опыт Гриффитса), трансдукция, конъюгация.

8. Плазмиды, эписомы, их основные генетические функции. Классы плазмид.

9. Генетический анализ. Картирование хромосом.

10. Транспозоны, Is-последовательности, их роль в передаче наследственной информации.

11. Генетика вирусов. Внутривидовой и межвидовой обмен генетическим материалом.

12. Роль мутаций и генетических рекомбинаций в селекции и эволюции микробов.

13. Генная инженерия, сущность, области применения, достижения в микробиологии.

14. Генетические методы диагностики инфекционных заболеваний: иммуноблотинг, ПЦР методики постановки

## УТР № 11

### КОЛЛОКВИУМ № 1 по разделу «ФИЗИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА МИКРОБОВ» (собеседование, тестовый контроль, ситуационные задачи)

#### Билет № 1

1. Какие источники углерода, азота используют микроорганизмы и на какие группы их подразделяют по типу усвоения углерода? Механизмы транспорта питательных веществ из внешней среды в бактериальную клетку.

2. Вирусы. Морфология, классификация, стадии репродукции.

3. Трансдукция. Вирулентные и умеренные фаги, профаг, фаговая конверсия.

4. Условия стерилизации в автоклаве (что стерилизуют, температура, время). Контроль стерилизации.

5. Назовите  $\beta$ -лактамы антибиотики, механизм действия на бактерии. С чем связана устойчивость к ним многих бактерий? Какие меры позволяют бороться с антибиотикоустойчивостью бактерий к  $\beta$ -лактамам антибиотикам. Перечислите антибиотики устойчивые к  $\beta$ -лактамазам.

#### ТЕСТЫ

**1. Микроорганизмы, не способные самостоятельно синтезировать какие-либо необходимые им органические соединения (углеводы, аминокислоты) называются:**

- 1) прототрофы;
- 2) гетеротрофы;
- 3) ауксотрофы;
- 4) аутотрофы;
- 5) хемотрофы.

**2. Расположите в нужной последовательности действия при бактериологическом методе исследования:**

- 1) просев чистой культуры в среду Гисса;

- 2) получение изолированных колоний;
- 3) оценка результата идентификации чистой культуры бактерий;
- 4) получение чистой культуры бактерий;
- 5) посев для определения чувствительности к антибиотикам.

### **3. Полная стерилизация материала достигается:**

- 1) паром под давлением;
- 2) фильтрованием;
- 3) тиндализацией;
- 4) прокаливанием;
- 5) гамма-излучением.

### **4. Чистая культура бактерий используется:**

- 1) для диагностики инфекционных заболеваний;
- 2) в производстве вакцин;
- 3) для приготовления диагностических препаратов;
- 4) в производстве антибиотиков;
- 5) ни в одном из указанных.

### **5. Для ферментов бактерий характерно:**

- 1) белковая природа;
- 2) высокомолекулярная структура;
- 3) неспецифичность действия;
- 4) важнейшая роль в обмене веществ;
- 5) специфичность действия.

## **Билет № 2**

1. Основные требования, предъявляемые к питательным средам. Классификация питательных сред по консистенции, составу, назначению. Простые питательные среды. Приготовление, применение. Потребность микроорганизмов в факторах роста, их химическая природа. Понятие об ауксотрофах и прототрофах.

2. Первичные культуры клеток, почему их так называют, из каких тканей получают? Техника приготовления культуры клеток. Индикация вируса по его цитопатическому действию (ЦПД). Каковы видимые проявления ЦПД вируса в культуре клеток? Индикация вируса по нейтрализации ЦПД.

3. Мутации у бактерий. Характеристика различных типов мутаций: точечные, протяженные, прямые, обратные. Мутагены химические, физические, механизм их действия.

4. Стерилизация сухим жаром. Печь Пастера (сухожаровая камера). Что стерилизуют и режим стерилизации (температура, время).

5. Микробный антагонизм. Причины, приводящие к антагонизму.

## ТЕСТЫ

### 1. К культуральным свойствам бактерий относятся:

- 1) морфология бактериальных клеток при микроскопии;
- 2) отношение возбудителя к окраске по Граму;
- 3) характер роста на питательной среде;
- 4) характерные признаки колонии;
- 5) ферментация углеводов на среде Гисса.

### 2. Плазмиды способны:

- 1) синтезировать цитоплазматическую мембрану бактериальной клетки;
- 2) интегрироваться в хромосому и реплицироваться вместе с ней;
- 3) автономно реплицироваться и существовать в цитоплазме клетки;
- 4) обеспечивать бактериям временные преимущества;
- 5) обуславливать пластический и энергетический метаболизм клетки.

### 3. Ферменты микроорганизмов:

- 1) способствуют проявлению патогенности бактерий;
- 2) позволяют идентифицировать виды и варианты бактерий;
- 3) расщепляют белки, жиры, углеводы до более простых соединений;
- 4) осуществляют окислительно-восстановительный процесс в клетке;
- 5) передают наследственную информацию.

### 4. Чистая культура микробов – это:

- 1) рост на питательной среде одного вида микробов;
- 2) микроорганизмы одного и того же вида, выделенные из различных источников;

3) микроорганизмы одного и того же вида, выделенные в разное время года;

4) культуры бактерий, полученные путем пересева изолированных колоний;

5) культуры бактерий, полученные путем пересева разных колоний.

#### **5. Ферментный состав любого микроорганизма:**

1) определяется геномом;

2) отвечает за наследственность;

3) является стабильным признаком;

4) используется для дифференциации бактерий;

5) способствует проявлению патогенных свойств.

### **Билет № 3**

1. Этапы выделения чистой культуры. Какие свойства бактерий позволяют их дифференцировать, а какие идентифицировать?

2. Формы существования вирусов. В чем заключается паразитизм на генетическом уровне, для каких микроорганизмов он характерен. Первичные культуры клеток, почему их так называют, из каких тканей получают? Схема приготовления культуры клеток.

3. Строение развивающегося куриного эмбриона (КЭ). Подготовка к заражению КЭ. Способы заражения КЭ.

4. Генетические рекомбинации. Трансформация. Опыт Гриффитса.

5. Микробный антагонизм, причины, приводящие к антагонизму. Дать определение, что такое антибиотики. Их подразделение в зависимости от источников получения, примеры.

### **ТЕСТЫ**

#### **1. К дифференциально-диагностическим относятся среды:**

1) Левенштейна – Йенсена;

2) Эндо;

3) Ресселя;

4) Гисса;

5. Китта – Тароцци.

**2. Питательные вещества проникают в бактериальную клетку в результате:**

- 1) простой диффузии;
- 2) облегченной диффузии;
- 3) процессов окисления;
- 4) активного транспорта;
- 5) транслокации групп.

**3. Чистая культура бактерий используется:**

- 1) для диагностики инфекционных заболеваний;
- 2) в производстве вакцин;
- 3) для приготовления диагностических препаратов;
- 4) в производстве антибиотиков;
- 5) в производстве сульфаниламидных препаратов.

**4. Сахарилитические свойства изучают на средах:**

- 1) Китта – Тароцци;
- 2) висмут-сульфит агаре;
- 3) Гисса;
- 4) МПБ;
- 5) Ресселя.

**5. К генетическим рекомбинациям относятся:**

- 1) конъюгация;
- 2) модификация;
- 3) трансформация;
- 4) диссоциация;
- 5) трансдукция.

**Билет № 4**

1. Ферменты бактерий. Классификация. Значение для микробной клетки, какие из них используются для идентификации.

2. Вирулентные фаги, стадии их взаимодействия с чувствительными бактериальными клетками (продуктивный тип). Умеренные фаги, особенности взаимодействия их с чувствительными бактериями. Профаг, явление лизогении.

3. Фенотипическая и генотипическая изменчивость микробов, их сущность. Организация генетического аппарата прокариот, бактериальная хромосома и внехромосомные генетические элементы.

4. Химический метод дезинфекции. Перечислите наиболее распространенные химические дезинфицирующие средства

5. Антибиотики, источники их получения. Перечислите антибиотики, полученные из грибов, механизм их антибактериального действия. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

## **ТЕСТЫ**

**1. Возникновению антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов способствует применение антибиотиков:**

- 1) без определения их чувствительности;
- 2) без достаточных показаний;
- 3) одних и тех же для лечения людей, животных и птиц;
- 4) высокими дозами и в комбинации с химиопрепаратами;
- 5) в качестве консервантов пищевых продуктов.

**2. Наследственная информация в бактериальной клетке локализуется в:**

- 1) цитоплазматической мембране;
- 2) митохондриях;
- 3) мезосомах;
- 4) нуклеоиде;
- 5) плазидах.

**3. Мутации характеризуются изменением:**

- 1) свойств клетки под действием ДНК умеренного фага;
- 2) наследственно закрепленной утратой или изменением признака микроорганизма;
- 3) отсутствием изменений в первичной структуре ДНК;
- 4) частичной утратой нуклеотидов в ДНК;
- 5) изменениями последовательности нуклеотидов в ДНК.

**4. Трансдукция состоит из следующих этапов:**

- 1) встраивание фрагментов ДНК бактерии в геном фага;
- 2) перенос фрагментов ДНК через конъюгативный мостик;

- 3) расщепление бактериальной хромосомы под действием фага;
- 4) инвазия фага в новую бактериальную клетку;
- 5) перераспределение генетического материала с образованием рекомбинанта.

**5. Микроорганизмы с наиболее выраженными антагонистическими свойствами:**

- 1) микобактерии;
- 2) актиномицеты;
- 3) грибы;
- 4) микоплазмы;
- 5) бактерии.

### **Билет № 5**

1. Методы стерилизации: физические, химические, механические, биологические. Контроль качества стерилизации. Антисептика. Асептика.

2. Методы культивирования и индикации вирусов. Типы тканевых культур. Приготовление культуры клеток.

3. Внехромосомные источники генетической информации бактерий: плазмиды, эписомы, транспозоны, Is-последовательности.

4. Колония, ее характеристика, особенности, имеющие значение для идентификации бактерий. С какой целью и как производится подсчет колоний?

5. Механизмы формирования антибиотикорезистентных культур. Что способствует формированию антибиотикорезистентности у бактерий. Мероприятия, способствующие предупреждению развития антибиотикорезистентности у бактерий.

### **ТЕСТЫ**

**1. Трансформация представляет собой:**

- 1) передачу генетического материала от одних бактерий другим с помощью фагов;
- 2) переход ДНК из клетки в клетку при контакте;
- 3) изменения в структуре ДНК реципиента в результате включения в него фрагментов ДНК донора;

4) адаптивную реакцию микробных клеток в ответ на изменения условий окружающей среды;

5) непосредственную передачу фрагмента ДНК донора реципиентной клетке.

### **2. Трансформация осуществляется с помощью:**

- 1) умеренного фага;
- 2) фактора фертильности;
- 3) плазмиды;
- 4) ДНК культуры донора;
- 5) транспозона.

### **3. Бактериологический метод исследования включает:**

1) приготовление мазка из исследуемого материала и окраска его по Граму;

2) рассев исследуемого материала с целью получения изолированных колоний;

3) выявление у бактерий капсулы, подвижности, спор;

4) выделение чистой культуры аэробных и анаэробных микроорганизмов;

5) дифференциацию и идентификацию чистой культуры выделенных бактерий.

### **4. Генная инженерия:**

1) используется для получения новых препаратов, не существующих в природе;

2) заменяет методы получения лечебных и диагностических сывороток;

3) не имеет решающего значения в развитии биотехнологии;

4) позволяет получить живые вакцины, несущие антигены нескольких микроорганизмов;

5) играет важную роль в экологии патогенных бактерий.

### **5. Медицинские препараты, полученные методами генетической инженерии:**

1) лейкоцитарный интерферон;

2) человеческий инсулин;

3) гормон роста;

4) моноклональные антитела;

5) диагностикумы.

## Билет № 6

1. Ферменты микробов. Классификация, значение для жизнедеятельности микроорганизмов. Какие ферменты используются для дифференциации бактерий и как это осуществляется?

2. Методы культивирования вирусов. Виды тканевых культур, метод приготовления. Индикация вирусов в культуре клеток.

3. Генетические рекомбинации у бактерий, сущность и значение. Конъюгация у бактерий, сущность. Донорские и реципиентные клетки, их отличие. F-плазида и ее свойства. Hfr-клетки, их особенности.

4. Пигменты бактерий, роль, условия образования, классификация.

5. Классификация антибиотиков по происхождению, механизму и спектру действия. Перечислите антибиотики, нарушающие функции ЦПМ.

## ТЕСТЫ

**1. К внехромосомным факторам наследственности относятся:**

- 1) рибосомы;
- 2) транспозоны;
- 3) мезосомы;
- 4) плазмиды;
- 5) Is-последовательности.

**2. Плазмиды:**

1) генетические элементы, жизненно необходимые бактериальной клетке;

2) генетические элементы, придающие бактериям определенные селективные преимущества;

3) замкнутые кольца двунигчатой ДНК;

4) однонигчатая линейная РНК;

5) внехромосомные генетические структуры бактерии.

**3. Идентификацию бактерий производят по расщеплению:**

1) углеводов;

2) липидов;

3) солей;

- 4) желатина;
- 5) пептона.

**4. Особенности колоний, имеющие значение для идентификации бактерий:**

- 1) величина;
- 2) форма;
- 3) край;
- 4) цвет;
- 5) температура.

**5. Значение пигментов в жизнедеятельности микробов:**

- 1) защищают от ультрафиолетовых лучей;
- 2) повышают ферментативную активность бактерий;
- 3) участвуют в дыхании;
- 4) обладают антибиотическим действием;
- 5) не учитываются при идентификации бактерий.

### **Билет № 7**

1. Дифференциально-диагностические среды, принцип работы среды, с какой целью применяют, примеры.

2. Вирусы, морфология, классификация, репродукция.

3. Генетические рекомбинации. Трансформация. Опыт Гриффитса.

4. Этапы выделения чистой культуры. Какие свойства бактерий позволяют их дифференцировать, а какие идентифицировать.

5. Осложнения при антибиотикотерапии. Принципы рациональной антибиотикотерапии.

### **ТЕСТЫ**

**1. Первый этап бактериологического метода исследования включает:**

- 1) идентификацию чистой культуры бактерий;
- 2) определения чувствительности к антибиотикам;
- 3) посев с целью получения изолированных колоний;
- 4) получение чистой культуры;
- 5) изучение характера роста.

**2. Второй этап бактериологического метода исследования включает:**

- 1) макроскопическую характеристику колоний;
- 2) идентификацию выделенной чистой культуры;
- 3) определение чувствительности к антибиотикам;
- 4) фаготипирование;
- 5) пересев характерной колонии на скошенный агар.

**3. Дифференциация бактерий на среде Эндо основана на:**

- 1) расщеплении лактозы;
- 2) разложении пептона;
- 3) образовании кислот;
- 4) восстановлении основного фуксина;
- 5) расщеплении глюкозы.

**4. Способы полной стерилизации материала:**

- 1) пар под давлением;
- 2) фильтрование;
- 3) прокаливание;
- 4) тиндализация;
- 5) гамма-излучение.

**5. Основные свойства плазмид:**

- 1) обязательный компонент бактериальной клетки;
- 2) продуцируют биологически активные вещества;
- 3) несут определенную генетическую информацию;
- 4) способны встраиваться в геном бактериальной клетки;
- 5) являются факторами патогенности.

**Билет № 8**

1. Дыхание микробов. Аэробный и анаэробный типы биологического окисления. Перечислите облигатных анаэробов. Методы создания анаэробных условий.

2. Формы существования вирусов. В чем заключается паразитизм на генетическом уровне, для каких микроорганизмов он характерен? Первичные культуры клеток, почему их так называют, из каких тканей получают? Схема приготовления культуры клеток.

3. Особенности культивирования облигатных внутриклеточных бактерий (риккетсий, хламидий). Как проводится индикация роста хламидий и риккетсий?

4. Питание бактерий. Классификация бактерий по типам питания. Механизмы поступления питательных веществ в бактериальную клетку.

5. Перечислите антибиотики, влияющие на синтез клеточной стенки. На какие группы делятся антибиотики по антимикробному спектру действия.

## ТЕСТЫ

### 1. Is-последовательности:

- 1) специфические мигрирующие фрагменты ДНК;
- 2) гены, необходимые для интеграции с негомологичными участками репликонов;
- 3) гены, способные реплицироваться самостоятельно и существовать автономно;
- 4) содержат информацию, необходимую только для перемещения в различные участки ДНК;
- 5) кодируют взаимодействие транспозонов, плазмид, умеренных фагов между собой и с хромосомой бактериальной клетки.

### 2. Транспозоны:

- 1) сложные генетические структуры, способные к самостоятельной репликации;
- 2) обособленные фрагменты ДНК, неспособные к репликации;
- 3) выполняют регуляторные и кодирующие функции;
- 4) способны к перемещению с одного репликона (хромосомная ДНК) на другой (плазида) и наоборот;
- 5) не участвуют в формировании антибиотикорезистентности бактерий.

### 3. На средах Гисса биохимическая активность учитывается по:

- 1) образованию пленки на поверхности среды;
- 2) изменению цвета среды;
- 3) образованию осадка;
- 4) выделению индола и сероводорода;
- 5) газообразованию.

#### **4. Принципы рациональной антибиотикотерапии:**

- 1) назначать строго по показаниям, после определения чувствительности возбудителя болезни к антибиотикам;
- 2) правильная дозировка и возможность сочетания различных лекарственных средств;
- 3) лечение назначать в минимальных дозах, давая микроорганизмам адаптироваться;
- 4) учитывать антибиотикорезистентность бактерий в среде, окружающей больного (в отделении больницы, географическом регионе);
- 5) прекращать введение антибиотиков немедленно после снижения температуры и улучшения состояния больного (игнорировать продолжительность антибиотикотерапии).

#### **5. облигатные анаэробы:**

- 1) растут и размножаются как в присутствии кислорода, так и без него;
2. нуждаются в свободном кислороде;
- 3) получают энергию при помощи брожения;
- 4) нет патогенных представителей;
- 5) используют бескислородный тип дыхания.

### **Билет № 9**

1. Типы дыхания бактерий. Назовите патогенные микробы облигатные анаэробы. Способы создания бескислородных условий. Аппаратура для культивирования облигатных анаэробов.

2. Вирусы. Морфология, ультраструктура, классификация, стадии репродукции, типы взаимодействия с клеткой хозяина продуктивный, интегративный. Перевиваемые культуры клеток, примеры таких культур, их характеристика.

3. Генетические рекомбинации у бактерий, сущность и значение. Трансдукция. Умеренные и вирулентные фаги. Профаг. Фаговая конверсия.

4. Белковый обмен, его значение, методы изучения.

5. Какие микроорганизмы являются продуцентами антибиотиков. Приведите примеры антибиотиков, вырабатываемых такими микроорганизмами. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

## ТЕСТЫ

### **1. Антибиотики:**

- 1) высокоактивные метаболические продукты микроорганизмов;
- 2) избирательно подавляют рост различных бактерий и некоторых опухолей;
- 3) по механизму действия не отличаются друг от друга;
- 4) оказывают на микроорганизмы бактериостатическое или бактерицидное действие;
- 5) антимикробный спектр действия у всех одинаковый.

### **2. Антибиотики классифицируют по:**

- 1) происхождению;
- 2) химическому составу;
- 3) механизму ингибирующего действия;
- 4) растворимости в спирте;
- 5) способу получения.

### **3. Дифференциально-диагностические среды применяются для:**

- 1) изучения биохимической активности;
- 2) изучения культуральных свойств;
- 3) чувствительности к антибиотикам;
- 4) дифференциации различных видов бактерий;
- 5) транспортировки материала в лабораторию.

### **4. Ионизирующая радиация, ультразвук используются для стерилизации:**

- 1) помещения;
- 2) пищевых продуктов;
- 3) питательных сред;
- 4) вакцин и сывороток;
- 5) лабораторной посуды.

### **5. Антагонизм микроорганизмов обуславливается:**

- 1) разной скоростью роста микроорганизмов, нуждающихся в одних и тех же питательных веществах;
- 2) образованием микроорганизмами кислот, спиртов и иных продуктов обмена, изменяющих условия существования других микроорганизмов в среде;

3) выделением микроорганизмами ростовых веществ (аминокислот, витаминов и др.), стимулирующих рост других микроорганизмов;

4) выделением в окружающую среду антибиотических веществ, бактериоцинов;

5) питанием одного микроорганизма за счет другого.

### **Билет № 10**

1. Что такое колония? По каким признакам дифференцируют колонии? Этапы выделения чистой культуры микроорганизмов. Цель и методы выделения чистой культуры микробов.

2. Морфология, ультраструктура и химический состав вирусов. Отличие вирусов от бактерий. Перевиваемые культуры клеток, примеры таких культур, их характеристика.

3. Плазмиды. Химическая природа и свойства Col-, Ent-, Nly-плазмид. Транспозоны, Is-последовательности; их генетические функции.

4. Дробные методы стерилизации, условия применения и режим.

5. Основные механизмы формирования резистентности микробов к антибиотикам.

### **ТЕСТЫ**

#### **1. Вирогения:**

1) обязательный этап репродукции вирусов;

2) Встраивание нуклеиновой кислоты вируса в хромосому клетки;

3) характерна только для ДНК вирусов; ДНК-содержащих вирусов;

4) механизм персистенции вирусов;

5) причина возникновения опухолей, аутоиммунных заболеваний.

#### **2. Характерные свойства вирусов:**

1) клеточная структура;

2) один тип нуклеиновой кислоты;

3) дизъюнктивный способ размножения;

- 4) абсолютный внутриклеточный паразитизм;
- 5) возможность интеграции в клеточный геном.

**3. Размножение бактериофагов происходит:**

- 1) в куриных эмбрионах;
- 2) на искусственных питательных средах;
- 3) в клетках бактерий определенного вида;
- 4) в организме животных;
- 5) в клетках любых бактериальных культур.

**4. Бактериофаги характеризуются:**

- 1) клеточной структурой;
- 2) содержанием нуклеиновых кислот – ДНК и РНК;
- 3) содержанием одной нуклеиновой кислоты ДНК или РНК;
- 4) внутриклеточным паразитизмом;
- 5) широкой распространенностью в природе.

**5. К элективным средам относятся:**

- 1) кровяной агар;
- 2) щелочной агар;
- 3) желточно-солевой агар;
- 4) желчный бульон;
- 5) свернутая сыворотка.

**Билет № 11**

1. Обмен веществ у микробов: углеводный, белковый. Значение и способы изучения.

2. Бактериофаг. Морфология, применение.

3. Генная инженерия, цель и области применения. Этапы получения организмов с новыми свойствами с помощью методов генной инженерии.

4. Требования, предъявляемые к питательным средам. Классификация питательных сред по составу и назначению.

5. Перечислите методы холодной стерилизации. Какие фильтры используют для стерилизации фильтрованием? Методы механической и физической дезинфекции.

## ТЕСТЫ

### 1. Чистая культура микробов – это:

- 1) рост бактерий одного вида на питательной среде;
- 2) микроорганизмы одного и того же вида, выделенные из различных источников;
- 3) микроорганизмы одного и того же вида, выделенные в разное время года;
- 4) культуры бактерий, полученные путем пересева изолированных колоний;
- 5) культуры бактерий, полученные путем пересева разных колоний.

### 2. Чистая культура бактерий используется:

- 1) для диагностики инфекционных заболеваний;
- 2) в производстве вакцин;
- 3) для приготовления диагностических препаратов;
- 4) в производстве антибиотиков;
- 5) в производстве сульфаниламидных препаратов.

### 3. Генетическая информация у бактерий заключена в:

- 1) нуклеоиде;
- 2) лизосомах;
- 3) плазмидах;
- 4) мезосомах;
- 5) цитоплазматической мембране.

### 4. Стерилизация – это:

- 1) уничтожение патогенных для человека микроорганизмов;
- 2) обеззараживание объектов внешней среды;
- 3) обеспложивание материала;
- 4) полное уничтожение микроорганизмов в различных материалах;
- 5) предупреждение попадания микробов в ткани человеческого организма.

### 5. Фаги применяют для:

- 1) типирования бактерий;
- 2) диагностики;

- 3) профилактики;
- 4) терапии;
- 5) индикации бактерий.

## **Билет № 12**

1. Модификации. S-, R-диссоциации у бактерий как проявление мутационной изменчивости, причинный фактор и значение.

2. Дыхание микробов. Назовите ферменты биологического окисления и как их выявляют. Методы выращивания облигатных анаэробов. Перечислите кластридиальных и некластридиальных облигатных анаэробов.

3. Особенности культивирования облигатных внутриклеточных бактерий (риккетсий, хламидий). Как проводится индикация роста хламидий и риккетсий?

4. Вирусы, морфология, ультраструктура, классификация, стадии репродукции. Что значит продуктивный и интегративный тип репродукции; вирогения; персистенция? Признаки, отличающие вирусы от бактерий.

5. Механизмы формирования антибиотикорезистентных культур. Факторы, способствующие формированию антибиотикорезистентности у бактерий. Мероприятия, способствующие предупреждению развития антибиотикорезистентности у бактерий.

## **ТЕСТЫ**

### **1. Бактериологический метод исследования включает:**

- 1) приготовление мазка из исследуемого материала и окраска его по Граму;
- 2) рассев исследуемого материала с целью получения изолированных колоний;
- 3) способы выявления у бактерий капсулы, подвижности, спор;
- 4) методы выделения чистой культуры аэробных и анаэробных микроорганизмов;
- 5) дифференциацию и идентификацию чистой культуры выделенных бактерий.

## **2. Осложнения антибиотикотерапии:**

- 1) аллергическая реакция;
- 2) дисбактериоз;
- 3) образование атипичных форм бактерий;
- 4) антибиотикорезистентность бактерий;
- 5) токсическое действие на организм человека.

## **3. Окраска по методу Ожешко является модификацией способа по:**

- 1) Бурри – Гинсу;
- 2) Романовскому – Гимзе;
- 3) Нейссеру;
- 4) Цилю – Нильсену;
- 5) Граму.

## **4. К фенотипической изменчивости бактерий относятся:**

- 1) рекомбинация;
- 2) мутация;
- 3) модификация;
- 4) репликация;
- 5) транскрипция.

## **5. Механизм действия антибиотиков обусловлен:**

- 1) нарушением функции цитоплазматической мембраны;
- 2) изменением антигенной структуры бактерий;
- 3) подавлением синтеза бактериальной клеточной стенки;
- 4) блокированием синтеза белка на рибосомах;
- 5) усилением биохимической активности бактерий.

## **Билет № 13**

1. Какие физические факторы неблагоприятно действуют на микроорганизм? Назовите методы тепловой стерилизации, обеспечивающие полное обеспложивание при однократном применении.

2. Стадии репродукции вирусов. Методы культивирования и индикации вирусов. Строение развивающегося куриного эмбриона (КЭ). Подготовка к заражению КЭ. Способы заражения КЭ.

3. Генная инженерия, цели и области применения. Этапы получения организмов с новыми свойствами с помощью методов генной инженерии.

4. Требования к питательным средам, принцип приготовления. Классификация питательных сред по назначению.

5. Противоопухолевые антибиотики. Каков механизм их действия? Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

## ТЕСТЫ

### **1. Механизмы формирования резистентности микроорганизмов к антибиотикам:**

- 1) синтез ферментов, разрушающих антибиотики ( $\beta$ -лактамазы, пенициллиназы);
- 2) утрата проницаемости клеточной стенки;
- 3) нарушение транспорта антибиотика в бактериальную клетку;
- 4) изменение структуры клеточной стенки, ЦПМ, рибосом, нуклеоида в результате модификаций, мутаций, рекомбинаций;
- 5) передача бактериям генов резистентности (R-генов) плазмидами и транспозонами.

### **2. Факторы, способствующие формированию антибиотикорезистентности у бактерий:**

- 1) бесконтрольное применение антибиотиков без достаточных показаний;
- 2) применение антибиотиков для профилактики инфекционных заболеваний;
- 3) использование пищевых продуктов, содержащих антибиотики;
- 4) предварительное, до назначения больному, определение чувствительности выделенных бактерий к антибиотикам;
- 5) применение антибиотиков с истекшим сроком годности.

### **3. Трансдукция состоит из следующих этапов:**

- 1) встраивание фрагментов ДНК бактерий в геном фага;
- 2) перенос фрагментов ДНК через конъюгативный мостик;
- 3) расщепление бактериальной хромосомы под действием фага;
- 4) инвазия фага в новую бактериальную клетку;

5) перераспределение генетического материала с образованием рекомбинанта.

**4. В опыте трансдукции применяется:**

- 1) вирулентный фаг;
- 2) умеренный фаг;
- 3) раствор ДНК;
- 4) селективная среда;
- 5) культура реципиента.

**5. Стеклоянную лабораторную посуду стерилизуют:**

- 1) тиндализацией;
- 2) текучим паром;
- 3) автоклавированием;
- 4) пастеризацией;
- 5) сухим жаром.

### **Билет № 14**

1. Пигменты, их роль в жизнедеятельности бактерий, примеры пигментообразующих бактерий, значение.

2. Углеводный и белковый обмен микроорганизмов. Цель изучения и методы.

3. Этапы выделения чистой культуры. Какие свойства бактерий позволяют их дифференцировать, а какие идентифицировать?

4. Бактериофаг, структура, применение.

5. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам. Какие осложнения развиваются при антибиотикотерапии? Как предупредить развитие дисбактериоза?

### **ТЕСТЫ**

**1. К генетическим рекомбинациям относятся:**

- 1) конъюгация;
- 2) модификация;
- 3) трансформация;
- 4) диссоциация;
- 5) трансдукция.

**2. Изменение последовательности нуклеотидов в ДНК называется:**

- 1) рекомбинация;
- 2) мутация;
- 3) трансформация;
- 4) конъюгация;
- 5) транскрипция.

**3. Пути преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов:**

- 1) химическая модификация известных антибиотиков;
- 2) получение новых химиотерапевтических препаратов;
- 3) изыскание ингибиторов, подавляющих бактериальные ферменты;
- 4) получение препаратов, препятствующих адгезии бактерий на клетках;
- 5) применение антибиотиков без показаний.

**4. Возникновению антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов способствует применение антибиотиков:**

- 1) без определения их чувствительности;
- 2) без достаточных показаний;
- 3) одних и тех же для лечения людей, животных и птиц;
- 4) высокими дозами и в комбинации с химиопрепаратами;
- 5) в качестве консервантов пищевых продуктов.

**5. Свойства, необходимые для идентификации выделенной чистой культуры бактерий:**

- 1) морфологические;
- 2) биохимические;
- 3) факторы вирулентности;
- 4) чувствительность к антибиотикам;
- 5) подвижность.

## УИР № 12

### Тема: УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ

#### План

1. Инфекционный процесс, динамика развития инфекционного процесса, формы его проявления.
2. Патогенность, вирулентность микроорганизмов, методы выявления и оценки.
3. Экспериментальное заражение и иммунизация животных.
4. Бактериологическое исследование трупов экспериментальных животных.

#### Учебный материал

**Инфекция** – это внедрение и размножение микроорганизмов в макроорганизме с последующим развитием сложного комплекса их взаимодействия – от носительства возбудителя до выраженной болезни. Комплекс физиологических и патологических процессов, наступающих в организме при внедрении в него патогенных микробов, вызывающих нарушение постоянства его внутренней среды и физиологических функций, носит название **инфекционного процесса**. Крайняя степень инфекционного процесса – болезнь. Инфекционные болезни имеют ряд характерных особенностей, отличающих их от других болезней:

- имеют своего возбудителя;
- контагиозны, т. е. способны передаваться от больного к здоровому;
- оставляют после себя более или менее выраженную невосприимчивость, или повышенную чувствительность к данному заболеванию;
- имеют четко выраженную стадийность (этапность) развития процесса.

## Динамика развития инфекционного процесса

*Входные ворота инфекции* – ткани организма, через которые микроорганизм проникает в макроорганизм. Для одних микроорганизмов входные ворота строго определены: для вируса кори, гриппа – верхние дыхательные пути, для энтеробактерий – желудочно-кишечный тракт, для других – входные ворота могут быть различны, например, сибиреязвенные микроорганизмы способны проникать в организм человека через кожу, слизистые оболочки верхних дыхательных путей или желудочно-кишечного тракта.

Возбудители инфекционных болезней распространяются в организме различными *механизмами и путями*:

а) воздушно-капельным, характерен для ветряной оспы, туберкулеза, коклюша, гриппа;

б) фекально-оральным, характерен для дизентерии, брюшного тифа, холеры;

в) трансмиссивным, через инфицированную кровь, который делится на: перенос через человека-носителя (например, вирусов гепатита В, ВИЧ-инфекции) или через насекомого-переносчика (например, вируса клещевого энцефалита, риккетсий);

г) контактно-бытовым, который делится на прямой (непосредственный) контакт с больным (например, половым путем передаются ВИЧ-инфекция, сифилис, гонорея) и косвенный, через промежуточный бытовой объект (например, через грязные руки или различные предметы – посуду, полотенце, одежду, игрушки).

По *длительности течения* различают острые инфекции (внезапно начинаются и быстро заканчиваются) и хронические. Иногда выделяют промежуточную форму – подострую. Некоторые инфекции протекают всегда остро (грипп, оспа, холера), другие – хронически (лепра, сифилис). Многие инфекции могут принимать как острое, так и хроническое течение (дизентерия, туберкулез, бруцеллез).

По *выраженности клинических симптомов* различают явные, стертые и бессимптомные (инаппарантные) формы инфекций. Явные формы инфекции подразделяются на типичные, т. е. наиболее характерные по клиническим проявлениям и атипичные с различными отклонениями от первых. К атипичным формам относят, как случаи с особо тяжелым течением (например, молниеносная фор-

ма холеры со смертельным исходом), так и случаи с легким течением или выпадением ряда характерных симптомов (абортивные формы).

Крайняя форма бессимптомной инфекции – это *носительство* патогенных микроорганизмов. При этом в организме находятся патогенные микробы, но симптомов заболевания нет. Такие люди очень опасны в эпидемиологическом отношении.

От бессимптомной инфекции надо отличать *латентную* (скрытую) инфекцию, наблюдающуюся при хронических инфекциях. Обычно латентная инфекция является фазой инфекционного процесса. Так, при сифилисе после развития первичного поражения в месте внедрения спирохет следует более или менее продолжительная стадия латентной инфекции, когда клинически симптомы отсутствуют, а дальше развивается вторичный сифилис. В некоторых случаях весь инфекционный процесс протекает в виде латентной инфекции и принимает клинически выраженную форму под влиянием провоцирующих факторов – переохлаждение, стресс (например, при герпесе). Бессимптомное нахождение микроорганизмов в макроорганизме носит название *персистенция*. Персистировать могут вирусы гепатита В, краснухи, кори и др. Персистенция может не давать клинических проявлений или проявиться в сложных поражениях ЦНС, появлении уродств при рождении детей от матери, зараженной вирусом краснухи, токсоплазмами и др.

По *происхождению* различают экзогенные инфекции, когда патогенный микроб проникает в организм из внешней среды, и эндогенные инфекции, или аутоинфекции, когда источник инфекции находится внутри организма, например, стрептококк находится в миндалинах и периодически вызывает ангину. Часто причиной эндогенной инфекции являются условно-патогенные микроорганизмы, обитающие в организме человека – стрептококки, стафилококки, пневмококки, кишечная палочка, грибы кандиды, аденовирусы, герпесвирусы и др. Прогрессирующее в таком случае заболевание возникает при ослаблении защитных свойств организма.

Наряду с инфекциями, вызванными одним возбудителем – *моноинфекциями*, наблюдаются *смешанные* (ассоциированные) инфекции. От них надо отличать *вторичную* инфекцию, при которой к основной, первоначальной, уже развившейся, присоединяется

другая, вызываемая новым возбудителем. Так, грипп почти всегда сопровождается развитием вторичной инфекции, вызванной стафилококками, стрептококками и др. Вторичная инфекция также развивается при кори, дифтерии, дизентерии.

По *степени тяжести* все инфекционные заболевания делят на легкие, средней тяжести и тяжелые. Степень тяжести инфекционного заболевания зависит от вирулентности микроорганизма и от защитных механизмов макроорганизма. Инфекцию, протекающую без выраженных симптомов, называют бессимптомной, а при наличии характерного симптомокомплекса – манифестной.

*Распространение* бактерий, вирусов и их токсинов в организме может происходить с кровью (гематогенно), по лимфатическим путям (лимфогенно), путем контакта пораженных и непораженных тканей, по мочевыводящим путям (уриногенно), по нервным стволам (периневрально). Нахождение микробов в крови носит название бактериемии, вирусов – вирусемии, токсинов – токсинемии.

По *локализации* возбудителя в макроорганизме различают инфекции очаговые, при которых микроорганизмы локализуются в местном очаге и не распространяются по организму (например, ангина, фурункулез) и генерализованные, при которых возбудитель распространяется лимфогенным или гематогенным путем. Наиболее тяжелой формой генерализованной инфекции является сепсис, который характеризуется размножением возбудителя в крови и, как правило, тяжелым течением заболевания. Сепсис отличается от бактериемии, при которой кровь выполняет только транспортную роль, а размножение в ней возбудителя не происходит. При сепсисе, как правило, возникают вторичные очаги гнойного воспаления в органах. Это состояние называют септикопиемией. Нередко при массовом поступлении в кровь бактерий и их токсинов развивается токсико-септический или бактериальный шок, вызывающий летальный исход.

По *механизму передачи* инфекции могут быть антропонозными, которыми человек заражается лишь от человека (корь, дизентерия, дифтерия, гонорея, сифилис, гепатит В, менингококковая инфекция и др.); зоонозными, при которых источником возбудителя является животное – сибирская язва, бруцеллез, туляремия, бешенство; зооантропонозными, при которых источником является больной или носитель – человек и животное – чума, туберкулез.

После проникновения микроба в организм, заболевание возникает через определенное время. Период от проникновения микроба до появления первых клинических симптомов заболевания называют *инкубационным*. Продолжительность инкубационного периода разная – при гриппе 1–2 дня, при лепре – до 10 лет, при медленных инфекциях – 20 и более лет. В течение инкубационного периода происходит размножение микроба в организме, выработка токсина. Затем наступает *продромальный* период – период первых проявлений болезни: повышается температура, появляется головная боль, недомогание. Признаки эти неспецифичны, бывают при многих заболеваниях, поставить диагноз в это время трудно. В период *разгара* заболевания проявляются специфические симптомы, сопровождающиеся также выделением возбудителя из организма, вследствие чего он представляет эпидемическую опасность для окружающих.

*Исход* заболевания: в этот период может наступить:

1) *рецидив* заболевания – возврат клинических проявлений болезни без повторного заражения за счет оставшихся в организме возбудителей;

2) *суперинфекция* – инфицирование макроорганизма тем же возбудителем до выздоровления;

3) *реинфекция* – инфицирование происходит после выздоровления, т. е. она возникает в результате нового заражения тем же возбудителем, как это часто бывает при дизентерии, гонорее;

4) *бактерионосительство*;

5) полное выздоровление – *реконвалесценция*;

6) летальный исход.

Трупы инфекционных больных подлежат обязательной дезинфекции, так как представляют определенную эпидемиологическую опасность.

По *распространенности* различают *эндемические* заболевания – регистрируются строго на определенных территориях и *эпидемические*, распространенные на разных территориях. Эндемии тесно связаны с местом обитания переносчиков, к ним относятся эндемические риккетсиозы, клещевой возвратный тиф, клещевые энцефалиты.

Существуют такие понятия, как «спорадическая заболеваемость» – единичные случаи болезни; «эпидемии» – число заболевших измеряется несколькими сотнями или тысячами, т. е. может охватывать большое количество людей на больших территориях (грипп, эпидемический вшивый сыпной тиф), и «пандемии» – заболевание охватывает несколько стран и даже континенты, например, пандемии чумы, холеры, гриппа.

Таким образом, инфекционная болезнь является примером паразитического симбиоза, когда в борьбу вступают два живых организма. На исход этой борьбы влияют 3 основных фактора: микроорганизм, макроорганизм и окружающая среда.

**Микроорганизм** определяет возникновение инфекционного процесса, его специфичность, а также влияет на его течение и исход.

К основным свойствам микроорганизма относится *патогенность* – это генетически закрепленная способность микроорганизмов вызывать болезнь. Одни микробы вызывают заболевание очень часто, почти у всех хозяев и при попадании в небольшом количестве (например, возбудители чумы, гриппа). Другие – лишь у некоторых индивидуумов. Это зависит от патогенности микроорганизмов. Степень патогенности измеряется *вирулентностью*, которая может быть разной даже у одного и того же штамма. Например, коринебактерии дифтерии могут быть высоковирулентными, низковирулентными и даже авирулентными. Вирулентность – это фенотипическое проявление степени патогенности. Является признаком штамма, но не вида.

Для характеристики вирулентности применяют ряд стандартных единиц.

**Dosis letalis minima Dlm** – наименьшая доза инфекции, которая вызывает гибель примерно 80 % животных. Чаще применяют **LD<sub>50</sub>** – это доза, вызывающая гибель половины животных. Иногда применяют характеристику по полной гибели животных. Эта единица называется **Dosis certa letalis Dcl** – безусловная смертельная доза – минимальное количество микробов, вызывающее гибель всех 100 % подопытных животных.

Вирулентность микробов связана со следующими основными факторами:

**Адгезия** – способность микроорганизмов прикрепляться на чувствительных клетках с последующим размножением возбудителя на поверхности этих клеток – **колонизация**. На поверхности микробных клеток расположены адгезины – химические группировки, соответствующие рецепторам клеток хозяина. У каждого вида микроорганизма имеются свои адгезины, что обеспечивает высокую специфичность взаимодействия бактериальной клетки с клеткой хозяина. С этим связана тропность, т. е. избирательность связывания бактерий с теми или иными клетками организма. Например, пневмококки тропны к клеткам легочной ткани, шигеллы – к клеткам эпителия толстого кишечника и т. д. Адгезивность многих бактерий связана с фимбриями, с белками или липотейхоевыми кислотами клеточной стенки.

**Агрессивность** – способность подавлять защитные силы организма, зависит от:

а) различных структур бактериальной клетки – капсулы, клеточной стенки, липополисахаридов грамотрицательных бактерий, которые подавляют миграцию лейкоцитов, препятствуют фагоцитозу;

б) ферментов, разрушающих иммуноглобулины.

**Инвазивность** – способность проникать в подлежащие ткани зависит от ферментов патогенности: гиалуронидаза, являясь «фактором распространения», гидролизует гиалуроновую кислоту – основной компонент соединительной ткани, тем самым повышая проницаемость слизистых оболочек и соединительной ткани; коллагеназа – протеолитический фермент, разрушает коллаген, способствует распространению микробов; плазмокоагулаза – коагулирует плазму, чем затрудняет фагоцитоз и лизис микробов; лецитиназа растворяет лецитин мембран мышечных волокон, эритроцитов; фибринолизин (стрептокиназа) активирует протеолитический фермент плазмы и растворяет фибрин, ограничивающий местный воспалительный очаг, что приводит к распространению стафилококков, стрептококков в тканях и генерализации инфекций; нейраминидаза – действует на сиаловую кислоту, входящую в состав оболочек клеток слизистых, что позволяет микробам преодолевать не только слизистую оболочку, но и проникать внутрь клеток и распространяться в межклеточном пространстве.

**Токсичность.** Различают два вида токсинов: экзотоксины и эндотоксины.

**Эзотоксины**, или истинные токсины, вырабатываются микробной клеткой при жизни и выделяются в ткани организма или питательную среду, в которой они культивируются.

Эзотоксины продуцируют, в основном, грамположительные микроорганизмы – возбудители дифтерии, столбняка, газовой гангрены, ботулизма, некоторые виды стафилококков и стрептококков, а среди грамотрицательных – холерный вибрион, шигеллы (Григорьева – Шига).

Для возбудителей чумы, коклюша, сибирской язвы характерно наличие токсинов частично секретируемых, и частично связанных с микробной клеткой.

Гены токсигенности истинных токсинов (tox-ген) могут быть локализованы в геноме бактерии, а также в профагах или плазмидах. Утрата плазмиды или профага делает бактериальную клетку в таком случае нетоксигенной.

Эзотоксины обладают следующими свойствами:

1. *По химической природе* экзотоксины являются белковыми веществами, обладают свойствами ферментов, отличаются высокой специфичностью действия, избирательно поражают отдельные органы и ткани, что находит отражение в клинических симптомах заболевания.

2. *По механизму действия* на клетки макроорганизма выделяют:

- а) мембранотоксины – гемолизины, лейкоцидины;
- б) функциональные блокаторы или нейротоксины – тетано-спазмин, ботулинический токсин – блокируют передачу нервных импульсов в клетках спинного и головного мозга;
- в) цитотоксины – блокируют синтез белка на клеточном, субклеточном уровне, например, энтеротоксины золотистых стафилококков, дермонекротоксины стафилококков, палочек сибирской язвы, сине-зеленого гноя, возбудителя дифтерии;
- г) эксфолиатины некоторых штаммов золотистого стафилококка влияют на процесс взаимодействия клеток между собой и с межклеточным веществом, вызывают пузырчатку новорожденных; эритрогенины – продуцируют пиогенные штаммы стрептококка, вызывающие скарлатину;

д) энтеротоксины активизируют клеточную аденилатциклазу, что приводит к повышению проницаемости стенки тонкой кишки и увеличению выхода жидкости в просвет кишечника – диарее. Такие токсины продуцируют холерный вибрион (холероген), энтеротоксигенные кишечные палочки.

3. *Высокая токсигенность* даже в минимальных дозах. Микробные экзотоксины – это наиболее сильные из известных биологических ядов. Например, токсин палочки ботулизма вызывает гибель человека в дозе 0,001 мл.

4. *Инкубационный*, или скрытый, период в действии экзотоксина исчисляется от нескольких часов до суток и более. Этим микробные экзотоксины отличаются от всех других ядов немикробного происхождения.

5. *Термолабильность* – температура 58–60 °С инактивирует экзотоксины в течение 20 минут – 1 часа. Иммуногенность – это способность экзотоксинов при введении в организм вызывать в нем образование антител – антитоксинов, обладающих свойствами нейтрализовать действие токсина.

6. *Антигенность* – способность экзотоксина вступать во взаимодействие с антитоксином.

7. Под действием 0,3–0,4%-го формалина и температуры 38–39 °С экзотоксины в течение 30 суток утрачивают свои токсические свойства, сохраняют антигенные свойства и превращаются в анатоксин.

**Эндотоксины** – это липополисахариды, находятся в наружных слоях клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Липополисахарид имеет два вида активности: он обладает пирогенностью и токсичностью. Пирогенные свойства (повышение температуры) связано с тем, что под влиянием эндотоксинов разрушаются лейкоциты, из которых выделяются вещества, действующие на терморегулирующий центр. В отличие от экзотоксинов, эндотоксины не обладают строгой специфичностью действия на организм и вызывают общие признаки интоксикации, головную боль, слабость, одышку и т. д. Токсичность эндотоксинов для организма гораздо слабее по сравнению с экзотоксинами. Они термостабильны, некоторые из них не разрушаются даже при кипячении.

В настоящее время к факторам патогенности микробов относят «антигенную мимикрию» – способность к временному или длительному приобретению микроорганизмом антигенов человека. Встречается у возбудителей кишечных инфекций, чумы, гриппа. Антигенная мимикрия приводит к снижению иммунного ответа на внедрение ВИЧ, стрептококков.

### Экспериментальная инфекция

Заражение лабораторных животных проводят с различными целями:

- а) моделирование инфекционных заболеваний;
- б) выделение чистой культуры возбудителя болезни;
- в) определение факторов вирулентности и измерения летальной дозы;
- г) для получения лечебных и диагностических препаратов (сывороток, вакцин);
- д) для проверки качества вакцин и иммунных сывороток;
- ж) для испытания лечебного действия химио-терапевтических препаратов.

*Отбор животных.* Для целей эксперимента служат белые мыши, белые крысы, кролики, морские свинки (кошки, собаки, крупные животные, птицы в микробиологической практике используются редко). В опыт берутся животные по возможности одного возраста, одинакового веса и содержащиеся в одинаковых условиях.

*Подготовка животного.* Перед опытом животных взвешивают (взвешивание повторяют в течение опыта). Иногда для специальных целей в течение нескольких дней до опыта и в ходе его производится измерение температуры специальными термометрами через прямую кишку. Каждое взятое в опыт животное нумеруется. Кроликам и морским свинкам продевают в уши металлические пластинки, на которых выдавлен номер. Белым мышам и крысам окрашивают стойкими красками (например, спиртовым раствором пикриновой кислоты) различные участки тела, которые соответствуют определенным номерам.

Для введения материала необходимо фиксировать животное в спокойном неподвижном состоянии. Это делается при помощи

специальных приспособлений – различного типа досок, ящиков, держателей, или животное держит помощник. При работе с мелкими животными (мыши) фиксирование и введение материала производится без помощи и без особых приспособлений, самим работающим. Затем следует подготовить место инъекции: выстригают (выбривают или выщипывают) шерсть, место инъекции дезинфицируют спиртом, йодной настойкой.

*Подготовка инструментов и материалов.* Шприцы и иглы стерилизуют кипячением. Материал, нужный для инъекции, помещают в стерильную посуду. Осторожно и медленно набирают в цилиндр шприца немного большее количество материала, чем требуется. Повернув шприц вертикально и иглой вверх, покрывают конец её стерильной ватой, выталкивают из шприца пузырьки воздуха, следя за тем, чтобы материал ни в коем случае не разбрызгался. Затем вату сбрасывают в дезинфицирующий раствор.

### **Способы заражения животных**

Заражение животных производят разными способами (подкожно, внутрикожно, накожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно, в мозг, интраорбитально и др.) в зависимости от задач исследования и используемых животных.

Введение *под кожу* – наиболее частый способ заражения. Кожу животного захватывают в складку и вводят в неё иглу примерно до половины, медленно вводят материал (0,5–1–2 мл) затем отпускают складку, накладывают стерильную вату на иглу и быстро извлекают её.

*Внутрикожный* метод применяется только со специальной целью (для «кожных проб» с токсином). Материал в небольшом объеме (0,1–0,2 мл) вводят тонкой иглой в толщу кожи. Иглу держат отверстием кверху. Если игла введена правильно, то она видна сквозь эпидермис и на месте инъекции образуется характерный пузырь.

*Накожный*, или кожный, способ заражения представляет собой втирание материала в выбритый участок кожи или в скарифицированную кожу. Втирание производят осторожно (лучше под прикрытием стеклянной воронки) гладкой стеклянной палочкой или шпателем. Животное должно оставаться фиксиро-

ванным до тех пор, пока материал совершенно не высохнет. Этим способом пользуются лишь при тех инъекциях, возбудители которых способны проникать через неповрежденную кожу (чумная палочка, спирохета).

При *внутримышечном* способе заражения, материал вводится в мышечную ткань верхней части задней конечности лабораторного животного.

При *внутрибрюшинном* заражении животное держат головой вниз, чтобы избежать ранения кишечника иглой. С этой целью пользуются иглой с притупленным концом. Инъекцию делают в нижней части живота, сбоку от средней линии. Сначала, захватив в складку кожу, прокалывают её, вводя иглу под острым углом. Затем, повернув шприц под прямым углом, толчкообразным движением прокалывают брюшную стенку. При этом ощущается своего рода «провал» иглы в брюшную полость.

Инъекции в *ток крови* производятся по-разному у различных животных: мышам, крысам и кроликам – в вену, морским свинкам – в вену и внутрисердечным способом. Внутривенное вливание кроликам осуществляется очень легко благодаря поверхностному расположению ушных вен. Перед введением материала в вену кролика следует фиксировать, завернув его в полотенце, которое должно плотно прижать к туловищу передние и задние лапы животного. После этого помощник крепко держит кролика одной рукой у себя на коленях или на столе, а другой сжимает ухо у корня, надавив при этом на вену, вследствие чего она сильно набухает. Инъекцию лучше производить в наружную вену, так как она плотно лежит в окружающей ткани. После прокола вены иглой, сдавливание уха следует прекратить, и тогда жидкость свободно вливается в вену при самом легком надавливании поршня шприца. Окончив введение материала, прижимают вену в месте укола стерильной ватой, извлекают иглу, и тотчас же зажимают этой ватой место инъекции, чтобы не было кровотечения.

Внутривенное заражение белых мышей и крыс производят через хвостовую вену.

При введении заразного материала в ток крови наблюдается самый короткий инкубационный период и быстрое течение инфекции.

Для заражения морских свинок в ток крови, пользуются введением в яремную вену или в сердце. Животное надо привязать животом вверх за четыре лапы на специальном станке или доске. Помощник удерживает животное в неподвижном состоянии, положив ему на живот руку. Для введения в яремную вену её предварительно отсепааровывают. Материал вводят тонкой иглой. Затем на кожу накладывают швы.

При внутрисердечном заражении животных вкалывают иглу в «толчке» сердца через межреберный промежуток. Если игла введена правильно, то в шприце показывается кровь, и тогда осторожно вводят заразный материал в объеме не более 1,5–2 мл.

Заражение через *пищеварительный тракт* осуществляется примешиванием заразного материала к корму или введения его животному в рот, непосредственно в желудок через зонд. Последний способ наиболее точный.

*Вскрытие и исследование органов белой мыши.* Животное захватывают пинцетом, кладут брюшком вверх на деревянную доску, помещенную в эмалированную или оцинкованную кювету, и прикрепляют к доске за четыре лапки, широко раздвинув их. Производят осмотр трупа и отмечают внешние патологические изменения, если таковые имеются. На некоторое время покрывают труп ватой, смоченной дезинфицированным раствором, чтобы при вскрытии не разлеталась шерсть, содержащая микробы, и были умерщвлены насекомые (эктопаразиты животных).

Перед самым вскрытием тщательно протирают кожу дезинфицирующим раствором или спиртом, или обжигают шерсть пламенем горелки. Вскрытие и исследование трупа животного делится на три этапа:

- 1) вскрытие и исследование наружных покровов;
- 2) вскрытие и исследование грудной полости;
- 3) вскрытие и исследование брюшной полости.

Инструменты перед вскрытием переносят из стерилизаторов в стакан со спиртом и ватой на дне. Перед использованием инструменты обжигают над пламенем.

*Вскрытие и исследование наружных покровов.* Делают разрез кожи (не повреждая при этом нижележащих тканей) по прямой ли-

нии от нижней челюсти до лобка, а затем боковые разрезы к лапкам. Отсепаровывают кожу в обе стороны от разреза. Отмечают изменения в подкожной клетчатке: расширение сосудов, кровоизлияние, отек, состояние лимфатических узлов и т. д. Если имеется припухание или нагноение узлов, делают из них мазки и посевы.

*Вскрытие и исследование грудной клетки.* Захватив пинцетом мечевидный отросток, делают под ним надрез и вставив в него ножницы, перерезают с обеих сторон ребра в местах их соединения с хрящами. Откидывают грудину вверх, производят осмотр открывшейся грудной полости, отмечают наличие или отсутствие жидкости в ней, обращают внимание на внешний вид легких, сердца. Производят обязательный посев крови, взятой из полости сердца. Для этого прижигают поверхность верхушки сердца скальпелем и через прижженный участок вкалывают капилляр стерильной пастеровской пипетки (запаянный конец капилляра перед посевом обламывают и проводят через пламя). Кровь выдувают по несколько капель в пробирки с бульоном и агаром. Из оставшейся крови делают мазки. После посева органы грудной полости осматривают более подробно, и все наблюдения заносят в протокол. В случае надобности делают посев и мазки из ткани легких, плевры, экссудата.

*Вскрытие и исследование брюшной полости* производят после исследования грудной полости. Приподняв пинцетом брюшную стенку, разрезают её ножницами от диафрагмы до лобка (при этом ни в коем случае нельзя поранить кишечник!) и образовавшиеся лоскуты отводят в сторону. Если нужно, делают посев из экссудата. Осматривают и отмечают в протоколе состояние органов брюшной полости. Особенно внимательно осматривают печень, селезенку, делают посев и мазки. В случае надобности, делают посевы и мазки из других органов брюшной полости.

*Материал для посева* из органов берут следующим образом. Прижигают поверхность органов и на этом месте делают разрез. С поверхности разреза соскабливают петлей ткань и засевают на бульон и агар.

*Мазки из органов* готовят размазыванием по стеклу поверхностью разреза или отпечатками, для чего вырезают из органа небольшой кусочек и, взяв его пинцетом, несколько раз прикасаются

поверхностью разреза, как печатью, к предметному стеклу. Фиксируют мазки на пламени или, если хотят сохранить структуру клеточных элементов органа, в жидком фиксаторе – смеси Никифорова (спирт + эфир поровну) – 10–15 мин, метиловом спирте – 3–5 мин. Окрашивают мазки фуксином (или метиленовым синим) и по Граму.

Во время вскрытия нужно тщательно следить за тем, чтобы зараженный материал не попадал на стол. Категорически запрещается класть прямо на стол употреблявшиеся при вскрытии инструменты. После вскрытия производят тщательную уборку рабочего места. Все инструменты кипятят, доску и кювету протирают тампонами со спиртом и обжигают или заливают на сутки дезинфицирующим раствором. Труп животного сжигают или автоклавируют. Посевы надписывают и помещают в термостат.

### **Методические рекомендации к выполнению практической работы по определению факторов патогенности**

**Инвазивной активностью** обладают: гиалуронидаза (ее образуют стафилококки, стрептококки, бордетеллы и др), нейраминидаза (холерный вибрион, вирусы гриппа и др.), коллагеназа, ДНК-аза, фибринолизин (стафилококки, стрептококки, возбудители чумы), лецитиназа и плазмокоагулаза (оба фермента образуют стафилококки).

**Гиалуронидазную активность** определяют в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования суточной бульонной культуры стафилококка. К надосадочной жидкости добавляют смесь раствора гиалуроновой кислоты и лошадиной сыворотки. Инкубируют 20 мин при 37 °С затем добавляют уксусную кислоту и учитывают результат. Если гиалуронидаза отсутствует и гиалуроновая кислота осталась неизменной, она при реакции с белком сыворотки в кислой среде образует муциновый сгусток – результат отрицательный. Положительным результатом остается отсутствие сгустка в пробирке. Это указывает на присутствие в надосадочной жидкости гиалуронидазы, которая, ферментирует гиалуроновую кислоту.

**Определение лецитиназной активности** стафилококков: испытываемые культуры засевают на чашки с желточно-солевым агаром (ЖСА). Вокруг колоний стафилококков, образующих лецитиназу, видны зоны помутнения с перламутровым оттенком, что указывает на расщепление лецитина.

**Определение плазмокоагулазной активности** стафилококка. Испытываемые культуры вносят в пробирку, содержащую цитратную плазму и инкубируют при 37 °С. Результаты учитывают через 1, 2, 4, 8 часов. Коагулазопозитивные штаммы вызывают свертывание плазмы в пробирке, виден плотный сгусток; в контроле плазма остается жидкой.

**Токсичность** – способность микробов синтезировать токсины – вещества белковой или липополисахаридной природы, нарушающие метаболические процессы в макроорганизме. Токсины играют основную роль в патогенезе инфекционного процесса. Клинические проявления инфекционного заболевания связаны с действием токсинов микроорганизма.

**Токсины белковой природы.** Экзотоксины бывают секретиромые или частично секретиромые. Они отличаются по сложности строения, имеют различные механизмы действия и различную специфичность.

**Токсичные липополисахариды (ЛПС)** клеточной стенки грамотрицательных бактерий являются эндотоксинами. Они освобождаются только при гибели и распаде бактериальных клеток в организме. По сравнению с белковыми токсинами, эндотоксины менее токсичны и менее специфичны.

**Определение гемолизина-токсина**, лизирующего эритроциты, производят на чашках с кровяным агаром, засеянным стафилококками. При наличии гемолизина вокруг колоний стафилококка видны прозрачные зоны гемолиза.

Факторы с *антифагоцитарными* и *адгезивными* свойствами. Факторы с антифагоцитарной активностью представляют собой поверхностные структуры капсул и клеточных стенок. Они способствуют выживанию микробов, противодействуют фагоцитозу:

а) выявляют капсулу в препаратах-мазках из мокроты больного пневмонией, окрашенных водным раствором фуксина. При микроскопировании на разовом фоне видны пневмококки, окруженные неокрашенной капсулой;

б) обнаруживают корд-фактор в мазке из мокроты туберкулезного больного, приготовленном методом микрокультивирования на предметном стекле и окрашенном по Цилю – Нильсену. В поле зрения видны скопления тесно склеенных палочек красного цвета в виде жгутов (кордов). Такое расположение туберкулезных микобактерий указывает на присутствие в клеточной стенке токсического вещества корд-фактора.

### **Демонстрация**

1. Чашка с результатом посевов кусочков органов зараженной мыши.
2. Чашки с проявлением действия ферментов патогенности: на кровяном агаре – гемолизина, на ЖСА – лецитиназы; на цитратной плазме – плазмокоагулазы.
3. Таблицы по экспериментальной технике.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Формы взаимодействия микро- и макроорганизмов, мутуализм, комменсализм, паразитизм. Паразитизм факультативный, облигатный, внеклеточный и внутриклеточный. Особенности паразитизма бактерий, хламидий, риккетсий, микоплазм, вирусов и грибов.

2. Определение понятия «инфекция» «инфекционный процесс», «инфекционная болезнь», условия развития этих состояний.

3. Стадии (фазы) инфекционного процесса адсорбция и адгезия, колонизация, инвазия продукция токсических субстанций.

4. Понятие о патогенезе инфекционных болезней. Формы инфекции. Источники инфекции. Понятие об антропонозных, зоонозных и сапронозных инфекциях. Входные ворота инфекций, механизмы передачи инфекции: воздушно-капельный и воздушно-пылевой, контактно-бытовой, половой, фекально-оральный, трансмиссивный, ятрогенный. Пути распространения микробов в организме (местная, очаговая, генерализованная, антигенемия, бактериемия, вирусемия, токсинемия, сепсис, септицемия, септикопиемия. Динамика развития инфекционной болезни, периоды (инкубационный, продромальный разгар, реконвалесценции

Формы инфекции: экзогенная, эндогенная, моноинфекция и смешанная (микст), острая и хроническая, персистирующая, медленная, типичная и атипичная, манифестная и бессиптомная, рецидив, реинфекция, суперинфекция, вторичная инфекция, бактерионосительство.

5. Патогенность и вирулентность. Единицы измерения вирулентности, методы определения вирулентности микробов.

6. Факторы патогенности у микробов: адгезия, колонизация, пенетрация, инвазивность, агрессивность, токсигенность, антифагоцитарная активность.

7. Ферменты патогенности микроорганизмов, их определение.

8. Токсины микроорганизмов, их свойства и механизмы действия: белковые токсины (экзотоксины) их отличия от эндотоксинов, классификация:

а) по механизму действия – мембранотоксины, цитотоксины, функциональные блокаторы, токсины-эксфолианты;

б) в зависимости от поражаемых мишеней энтеротоксины, нейротоксины, дермонекротоксины, гемолизины, лейкоцидины. Экзо-, эндотоксины бактерий.

9. Роль макроорганизма в развитии инфекционного процесса.

10. Роль внешней среды в развитии инфекционного процесса.

11. Экспериментальная техника: цели и задачи. Способы заражения животных.

12. Каковы критерии отбора животных для эксперимента?

13. Вскрытие и бактериологическое исследование трупа животного, погибшего от экспериментальной инфекции.

## Тема: ИНФЕКЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ И ПРИКЛАДНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

### План

1. Доиммунные неспецифические механизмы резистентности к инфекции.
2. Инфекционный иммунитет.

### Учебный материал

У человека различают два уровня защиты от инфекции: а) доиммунный, неспецифический; б) иммунный, специфический.

К *доиммунным неспецифическим* врожденным факторам противомикробной защиты организма относятся: состояние кожных и слизистых покровов, нормальная микрофлора, ферменты полости рта и желудочно-кишечного тракта, фагоцитирующие клетки, естественные киллеры, система комплемента, интерферон, лизоцим, интерлейкины,  $\beta$ -лизины, система пропердина.

Первым барьером на пути проникновения микробов во внутреннюю среду организма являются *кожа и слизистые оболочки*. Здоровая неповрежденная кожа и слизистые не проницаемы для большинства микробов. Через них способны проходить лишь возбудители особо опасных инфекций – чумы, бруцеллеза, сибирской язвы, поэтому работа с ними проводится в специальных защитных костюмах. Помимо чисто механической функции, кожа и слизистые оболочки обладают бактерицидным действием. Большинство бактерий не способны долго существовать на коже из-за прямого губительного действия молочной кислоты и жирных кислот, содержащихся в поте и секрете сальных желез.

*Реснитчатый эпителий* верхних дыхательных путей осуществляет механическую защиту, так как движение ресничек постоянно удаляет слизь вместе с попавшими в дыхательные пути микроорганизмами. Такую же функцию выполняет эпителий ЖКТ, мочевыводящих путей. Так, желудочный сок с его кислотностью и выраженной ферментативной активностью убивает различных

микробов, поступающих с пищей (опыт Петенкофера, Мечникова, Жупиля).

*Нормальная микрофлора* организма является антагонистом патогенных микробов, препятствует адгезии и колонизации слизистых оболочек и кожных покровов, способствует созреванию иммунной системы.

Некоторые микробы, преодолев кожно-слизистый барьер, попадают в подкожную клетчатку, где возникает очаг воспаления. Место внедрения и размножения возбудителей отграничивается от окружающих тканей. Активность микробов угнетается, они поглощаются и перевариваются фагоцитами. Продукты распада удаляются из организма.

*Фагоцитоз* (греч. phago – пожираю и cytos – клетка) представляет собой процесс поглощения и переваривания микроорганизмов или других антигенных веществ клетками мезодермального происхождения.

Фагоцитоз открыл И.И. Мечников. Клетки, способные к фагоцитозу, он назвал фагоцитами и разделил на микрофаги и макрофаги. К микрофагам были отнесены полиморфно-ядерные лейкоциты, к макрофагам – клетки соединительной ткани, эндотелия сосудов, ретикулярные клетки печени, почек, легких и др.

### **Механизм и стадии фагоцитоза**

*Первая стадия* – положительный хемотаксис или направленное движение фагоцита в сторону объекта захвата – микроба или др. частиц в результате реакции на аттрактант – физический или химический фактор, например, липолисахарид микробной клетки, метаболиты.

*Вторая стадия* – адсорбция частиц на поверхности макрофага происходит в результате рецептор-опосредованного взаимодействия.

*Третья стадия* – инвагинация клеточной мембраны, захват микроба и погружение его в протоплазму.

*Четвертая стадия* – образование фагосомы, т. е. вакуоли в протоплазме вокруг поглощенного микроба.

*Пятая стадия* – слияние фагосомы с лизосомой фагоцита, содержащей десятки ферментов и образование фаголизосомы. В фаго-

лизосоме происходит переваривание захваченного микроба, ферментами. Такой фагоцитоз считается завершенным неимунным.

В некоторых случаях, при незавершенности фагоцитоза, захваченные фагоцитом микроорганизмы выживают и размножаются в нем, например, гонококки, туберкулезная палочка. Завершенности фагоцитоза препятствуют наличие капсулы у микробов, продукция веществ, подавляюще воздействующих на разные стадии фагоцитоза. При некоторых инфекциях для усиления фагоцитоза включаются иммунные механизмы (бруцеллез). Такое усиление фагоцитоза называется опсонизацией. Опсонины (*лат.* *Opsonin* – усиливать) – это: Ig, M, G, C-реактивный белок, липополисахарид связывающий протеин, маннан-связывающий лектин, сурфактантные белки A, D. Они обрабатывают антиген, облегчая захват фагоцитом. Для характеристики активности фагоцитоза определяют фагоцитарный показатель – среднее число бактерий, поглощенных одним фагоцитом и опсонофагоцитарный индекс – отношение фагоцитарных показателей, полученных с иммунной и неиммунной сыворотками.

Если воспалительный барьер прорывается, микробы попадают в лимфатические сосуды, а оттуда – в регионарные лимфоузлы, которые задерживают микроорганизмы чисто механически и, кроме того, в них идет усиленный фагоцитоз. Так осуществляется барьерфиксирующая функция лимфоузлов.

Прорвав лимфатический барьер, возбудитель попадает в кровь. В норме кровь стерильна и обладает сильно выраженным бактерицидным действием, которое обеспечивается фагоцитарной активностью нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, эндотелия сосудов, активностью естественных киллеров, обладающих неспецифической противовирусной, противопаразитарной и противоопухолевой активностью.

В крови содержатся многочисленные гуморальные механизмы неспецифической защиты. Это система комплемента, лизоцим,  $\beta$ -лизины, лейкины, интерферон, система пропердина.

*Комплемент* – (*лат.* *completo* – дополняю) представляет собой сложную многокомпонентную систему белков сыворотки крови, которые реагируют между собой в определенной последовательности и обеспечивают растворение микробной или другой клетки.

Комплемент состоит из 9 компонентов, их обозначают С1, С2, С3 ... С9. Белки комплемента являются глобулинами или гликопротеинами, вырабатываются макрофагами, нейтрофилами. В организме комплемент находится в неактивном состоянии и активизируется в момент образования комплекса «антиген – антитело». Существует два пути активации комплемента: классический и альтернативный. При классическом пути происходит присоединение к комплексу «антиген – антитело» вначале компонента С1, затем к образовавшему комплексу «антиген – антитело» присоединяется С2 и далее, последовательно, ранние компоненты комплемента С4, С2, С3. Они активизируют с помощью ферментов компонент С5. Компонент С5 прикрепляется к мембране клетки, и на нем образуется литический комплекс из поздних компонентов комплемента С6, С7, С8, С9. Этот литический комплекс называют мембраноатакующим, так как он осуществляет лизис клетки.

Альтернативный путь активации комплемента происходит без участия антител и осуществляется до выработки антител в организме. Процесс начинается с активации компонента С3 в результате прямого действия антигена, например, липополисахарида микробной клетки или антигенов вирусов. Активированный комплемент взаимодействует с ферментами и белком пропердином. Образовавшийся комплекс активирует компонент С5, на котором и формируется мембраноатакующий комплекс, как и при классическом пути активации комплемента. При этом не участвуют компоненты С1, С2, С4.

Таким образом, классический и альтернативный пути активации комплемента завершаются образованием мембраноатакующего литического комплекса. Этот комплекс внедряется в мембрану и нарушает её целостность, в результате клетка гибнет.

*Интерферон* (ИФ) представляет собой белок, вырабатываемый многими клетками в ответ на внедрение вируса. Интерферон через геном клетки влияет на процессы репродукции вируса или пролиферацию клетки. Значение интерферона:

1) играет большую роль в поддержании резистентности организма к вирусам, поэтому его применяют для профилактики и лечения многих вирусных инфекций (грипп, аденовирусы, герпес, гепатит);

2) антипролиферативное действие используют для лечения злокачественных опухолей;

3) иммуномодулирующее свойство  $\gamma$ -ИФ – для коррекции работы иммунной системы при различных иммунодефицитах. В настоящее время интерферон получают в промышленных масштабах с помощью биотехнологий (генной инженерии). Ген из лейкоцитов, ответственный за синтез интерферона, встраивают в геном кишечной палочки, получают рекомбинантные штаммы кишечной палочки, способные продуцировать интерферон.

*Лизоцим* – белок, содержащийся в крови, слюне, слезной и тканевой жидкости, во всех биосредах макроорганизма за исключением мочи и спинномозговой жидкости. Это протеолитический фермент (мурамидаза), разрушающий клеточную стенку бактерий и других клеток, вызывая их гибель и способствуя фагоцитозу. Снижение содержания лизоцима приводит к учащению воспалительных заболеваний.

*Лейкины* – протеолитические ферменты, освобождающиеся при разрушении лейкоцитов, нарушают целостность поверхностных белков микробных клеток.

*Система пропердина* – комплекс белков, обладающих противовирусной, антибактериальной активностью.

### **Основные механизмы инфекционного иммунитета**

Инфекционный иммунитет – это способ защиты организма от микроорганизмов и их токсинов. К его основным механизмам относятся гуморальный – продукция антител, и клеточный – образование Т-клеток-эффекторов (Т-киллеров). По своей направленности инфекционный иммунитет может быть антибактериальным, антитоксическим, противовирусным, противогрибковым, противопаразитарным. Различают несколько видов инфекционного иммунитета.

Врожденный иммунитет обнаруживается уже при рождении. Это генетический признак, который передается по наследству. Примерами подобной формы невосприимчивости может служить невосприимчивость человека к чуме рогатого скота, к чуме собак и другим заболеваниям животных, а также невосприимчивость

животных к гонорее, кори и дифтерии, а также к другим заболеваниям, свойственным человеку.

Напряженность врожденного иммунитета высокая, но его нельзя считать абсолютным, так как известны случаи, когда животные, невосприимчивые к данной инфекции, при известных условиях становятся восприимчивыми. Можно, например, заразить сибирской язвой курицу, если искусственно снизить температуру тела до 37 °С (нормальная температура у кур 41–42 °С) или голубя, если предварительно отравить его алкоголем; вызвать столбняк у лягушек, невосприимчивых к этому заболеванию, если поместить их в термостат при 37 °С.

Приобретенный иммунитет не передается по наследству, он приобретается в течение жизни. Различают естественный и искусственный приобретенный иммунитет. И тот, и другой может быть активным или пассивным. Естественный активный иммунитет возникает после перенесенной инфекции. Он может быть прочным. Так, после перенесения кори – пожизненно; сыпного тифа, скарлатины – долгие годы. Пассивный передается от матери через плаценту или с грудным молоком. Новорожденные дети устойчивы к дифтерии, скарлатине, кори и др. Длительность пассивного иммунитета – несколько месяцев.

Искусственный активный иммунитет возникает после введения вакцин. Иммунитет при этом формируется не сразу и держится сравнительно долго. Искусственный пассивный иммунитет возникает после введения готовых антител, содержащихся в сыворотке гипериммунизированных животных или клеток – Т-эффекторов, т. е. сам организм их не вырабатывает, поэтому он быстро исчезает.

Иммунитет может быть стерильным, свободным от соответствующего возбудителя и нестерильным, при котором возбудитель соответствующего заболевания сохраняется в организме. Таков иммунитет при туберкулезе, сифилисе и некоторых других болезнях.

### **Методические указания**

Для оценки доиммунных неспецифических механизмов резистентности к инфекции изучить:

1. Содержание лизоцима, комплемента, цитокинов в сыворотке крови, слюне и других биологических жидкостях организма.

2. Фагоцитарную реакцию клеток.

*Содержание лизоцима* в слюне или сыворотке крови определяют методом титрования с использованием культуры *Micrococcus lisodecticus*. Лизис бактерий можно наблюдать по просветлению или измеряя спектрофотометрическим методом изменение оптической плотности микробной взвеси после инкубации ее с разведениями лизоцима.

*Содержание комплемента* сыворотки крови определяют методом титрования по 50%-му гемолизу. Метод основан на комплемент-зависимом лизисе нагруженных антителами эритроцитов барана. За единицу активности комплемента принимается такое количество комплемента, которое вызывает 50%-й гемолиз в стандартных условиях. Отдельные компоненты системы комплемента определяют иммунохимическими методами при помощи моноклональных сывороток.

### **Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов морской свинки в опыте фагоцитоза**

**Реактивы:** 2%-й раствор лимоннокислого натрия, суточная культура стафилококка, краситель Романовского – Гимзы.

*Этапы опыта:*

В чистую пробирку помещают 0,1 мл (половина объема капилляра Панченко) 2%-го раствора лимоннокислого натрия.

Ножницами или лезвием надрезают ушную вену морской свинки; первую каплю крови убирают сухой ваткой, затем капилляром берут 0,2 мл (полный капилляр) крови.

Смешивают кровь с лимоннокислым натрием в пробирке; сюда же добавляют 0,1 мл (полкапилляра) стандартной взвеси стафилококков.

Помещают в термостат на 30 мин, смесь центрифугируют, затем готовят тонкий мазок, фиксируют смесью Никифорова, окрашивают по Романовскому – Гимзе.

Определяют фагоцитарный показатель и фагоцитарное число (на 100 нейтрофилов). Фагоцитарное число – процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего количества подсчитанных

лейкоцитов. Фагоцитарный показатель – среднее число фагоцитированных микробов.

### **Демонстрация**

1. Мазки с незавершенным фагоцитозом:
  - а) стафилококков;
  - б) гонококков.
2. Таблицы по неспецифическим факторам защиты.
3. Задание:
  - а) изучить в приготовленных мазках разные стадии фагоцитоза, зарисовать;
  - б) микроскопировать мазки из гноя больных острой гонореей, зарисовать в поле зрения большое количество лейкоцитов и лейкоциты, фагоцитировавшие много диплококков *Neisseriae gonorrhoeae*.

### **Роль окружающей среды и социальных условий в развитии инфекционных болезней**

Все факторы, ослабляющие организм, способствуют возникновению инфекции при наличии заражения. Наиболее важными факторами, понижающими резистентность организма к инфекционным заболеваниям, являются: голодание или хроническое недоедание, переутомление, охлаждение, нервные и психические травмы, возраст, гормональные сдвиги и т. д.

Пониженное питание ведет к общему ослаблению всех защитных механизмов организма против болезнетворного действия микробов. При голодании наблюдается нарушение обмена белков, что приводит к истощению имеющихся резервов белка и подавлению синтеза иммуноглобулинов. Кроме того, при белковом голодании снижается фагоцитарная активность макрофагов и уменьшается количество лейкоцитов. Поэтому голодные годы сопровождаются высокой заболеваемостью и смертностью населения от инфекционных болезней.

Особое значение имеет содержание в пище витаминов. При недостатке витамина А происходит нарушение окислительных процессов, в результате резко снижается барьерная функция кожных и слизистых покровов, что облегчает проникновение микро-

организмов через эти ткани. Недостаток витаминов групп В и С способствует понижению сопротивляемости к туберкулезу, проказе, стрептококковым, стафилококковым и другим инфекциям.

Чувствительность к инфекции зависит от возраста макроорганизма. Так, у детей раннего возраста уровень антител низкий, фагоцитарная активность более слабая, это приводит к быстрому распространению инфекционного процесса и более тяжелому исходу заболевания.

В возникновении и течении некоторых инфекционных заболеваний важную роль играет состояние ЦНС и связанная с этим физиологическая активность всех систем организма. Так, при заражении животных, находящихся в зимней спячке, обмен веществ у которых протекает на очень низком уровне, инфекционные заболевания вызвать не удается. В течение всего периода спячки у таких животных можно выделять жизнеспособных патогенных микробов. Лишь при весеннем пробуждении животных эта латентная инфекция вспыхивает и проявляется в виде генерализованного процесса.

Солнечные лучи благотворно действуют на организм и повышают сопротивляемость организма к инфекциям. Особую опасность для организма представляет ионизирующая радиация. При этом снижается резистентность организма к инфекционным заболеваниям, активизируется нормальная микрофлора, нарушается проницаемость слизистых оболочек, уменьшается их барьерная способность, снижаются защитные свойства лимфоидной системы и крови.

Неблагоприятное действие на организм оказывают плохие санитарно-гигиенические условия труда и быта. Недостаток кислорода в помещении, избыток углекислоты и других вредных газов, пыли вызывает хроническое отравление, нарушает целостность слизистых оболочек дыхательных путей и увеличивает возможность заражения туберкулезом, актиномикозом, аспергиллезом, хроническими пневмониями, аллергическими и другими болезнями.

Таким образом, инфекция – это сложный комплекс взаимодействия микроорганизма и макроорганизма в определенных условиях внешней и социальной среды.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Реактивность и резистентность организма, их роль в развитии инфекционного заболевания.

2. Защитные механизмы и факторы естественной резистентности организма: барьерные и бактерицидные свойства кожи, слизистых оболочек, значение нормальной микрофлоры.

3. Лизоцим, комплемент, свойства, роль в естественной резистентности.

4. Бактерицидность сыворотки крови и факторы её обеспечивающие:  $\beta$ -лизины, система пропердина, нормальные антитела.

5. Фагоцитоз как клеточный неспецифический защитный фактор. Виды фагоцитов, стадии фагоцитоза. Завершенный, незавершенный фагоцитоз.

6. Постановка опыта фагоцитоза, определение активности и завершенности реакции. Опсонофагоцитарная реакция.

7. Роль окружающей среды и социального фактора в развитии инфекционного процесса.

## **Тема: ИММУННАЯ СИСТЕМА ЧЕЛОВЕКА. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ИММУННОГО ОТВЕТА**

### **План**

1. Органы иммунной системы: центральные и периферические. Клетки иммунной системы макрофаги, Т- и В-лимфоциты. Субпопуляции Т- и В-клеток.
2. Антигенпредставляющие клетки АПК.
3. Понятие о межклеточной кооперации в иммуногенезе. Медиаторы иммунного ответа (цитокины, лимфокины, интерлейкины).
4. Специфические формы иммунного ответа: гуморальный иммунитет (синтез антител), клеточный иммунитет, реакции гиперчувствительности, иммунологическая толерантность, иммунологическая память.

### **Учебный материал**

Главными задачами иммунитета является распознавание «своего» и «чужого», с целью охраны генетической чистоты вида от этого «чужого» на протяжении жизни организма. Для их решения в ходе эволюции сформировалась специализированная – иммунная система, она представлена центральными и периферическими органами. К центральным органам иммунитета относятся костный мозг и тимус (вилочковая железа), к периферическим – селезенка, лимфатические узлы, миндалины, скопления лимфоидной ткани под слизистыми оболочками желудочно-кишечного, мочевого и дыхательного трактов, лимфа и кровь.

#### **Костный мозг**

Костный мозг выполняет несколько иммунологических функций:

- 1) служит местом происхождения стволовых клеток, которые являются родоначальниками как Т- и В-лимфоцитов, так и макрофагов и других форменных элементов крови;
- 2) от стволовых клеток в костном мозге, в его ретикулярной строме, под влиянием гормоноподобных факторов происходит

дифференцировка и созревание В-лимфоцитов, на поверхности которых формируются иммуноглобулиновые рецепторы для антигенов. При этом на каждом лимфоците формируются рецепторы только для одного антигена. Созревающие лимфоциты покидают костный мозг, поступают в периферические органы иммунной системы и становятся антиген-реактивной клеткой, способной к взаимодействию с одним из многочисленных антигенов, существующих в природе.

### **Тимус (вилочковая железа)**

От стволовых клеток, попавших с кровью в тимус, под влиянием гормонов тимозина, тимопоэтина дифференцируются и созревают Т-лимфоциты. На их поверхности появляются структуры, обладающие антигенными свойствами. Они получили название «Cluster of differentiation» (показатель дифференцировки) и обозначение CD. Основными являются субпопуляции Т-лимфоцитов, содержащие антигены CD4 или CD8. За одни сутки в тимусе возникает 300–500 млн лимфоцитов, при этом на клетках формируются рецепторы как к чужеродным, так и к собственным антигенам. В ходе созревания лимфоцитов происходит отбор Т-лимфоцитов, обладающих рецепторами для молекул главного комплекса тканевой совместимости МНС (Major Histocompatibility Complex). Такие Т-лимфоциты способны после контакта с соответствующими антигенами осуществлять специфическую иммунную реакцию. Т-лимфоциты с рецепторами для собственных антигенов вступают в контакт с ними и погибают из-за избытка антигенного стимула.

Таким образом, в центральных органах иммунной системы происходит первичная дифференцировка лимфоцитов, (лимфопоэз), не зависящая от антигенного раздражения. Она заканчивается образованием основных субпопуляций лимфоцитов Т- и В-клеток. В периферических органах иммунной системы происходит пролиферация и вторичная антигензависящая дифференцировка лимфоцитов (иммунопоэз). Его итогом является образование функционально различных клеток.

## Клетки иммунной системы

В-лимфоциты, выполняющие разные функции, составляют около 20 % всей численности лимфоцитов. Одна часть В-лимфоцитов под влиянием антигена дифференцируется в плазматические клетки, продуцирующие иммуноглобулины. Плазматическая клетка – это конечный продукт дифференцировки В-лимфоцитов. После завершения продукции антител они прекращают естественное существование происходит апоптоз – естественная гибель.

Другая часть В-лимфоцитов в ходе иммунного ответа на антиген превращается в В-лимфоциты памяти. Они отличаются долголетием и способностью быстро отвечать на повторное поступление антигена. В-лимфоциты памяти рециркулируют между кровью, лимфой и лимфоидными органами и больше всего накапливаются в периферических лимфоидных органах.

Есть также В-лимфоциты – антиген-презентирующие клетки (АПК), участвующие в представлении антигенов Т-лимфоцитам. Как и АПК, В-лимфоциты вступают в контакт с антигеном через свои специфические рецепторы, после чего антиген подвергается эндоцитозу и через несколько часов появляются на мембране клетки в комплексе с молекулами МНС II класса. Затем В-лимфоцит вступает в прямой контакт с Т-лимфоцитом и служит сигналом к его активации.

Т-лимфоциты происходят так же, как и В-лимфоциты, от стволовой клетки костного мозга, а созревают и дифференцируются в тимусе. На долю этих клеток приходится около 80 % всей лимфоидной популяции. В процессе дифференцировки и пролиферации Т-лимфоциты образуют субпопуляции, различающиеся по своим функциям: одни выполняют регуляторные функции, другие – эффекторные. Регуляторные клетки – Т-хелперы – обеспечивают развитие иммунного ответа другими клетками, регулируют его дальнейшее течение.

На наружной поверхности их цитоплазматической мембраны определяются молекулы CD<sub>4</sub>, а также αβ-Т-клеточные рецепторы к антигену, представленному в комплексе с МНС II класса. После воздействия антигена Т-хелперы пролиферируют и дифференци-

руются на две субпопуляции Т1-хелпер и Т2-хелпер. Они различаются лишь по функции и по спектру продуцируемых цитокинов. Т1-хелпер образует ИЛ-2, 3,  $\gamma$ -интерферон (ИФ), фактор некроза опухолей (ФНО) и другие, необходимые для развития клеточного иммунного ответа, гиперчувствительности замедленного типа, иммунного воспаления. Т2-хелпер продуцирует ИЛ-4, 6, 9, 10, 13 и др., которые поддерживают гуморальный иммунный ответ, а также гиперчувствительность немедленного типа.

Эффекторные Т-лимфоциты – киллеры – осуществляют эффект иммунологической реакции чаще всего в форме цитолиза клеточных структур, к антигенам которых возникла иммунологическая реакция. Такие Т-лимфоциты еще называют Т-цитотоксические. На поверхности их цитоплазматической мембраны определяются молекулы CD<sub>8</sub>, а также  $\alpha\beta$ -Т-клеточные рецепторы к антигену, представленному в комплексе с МНС I класса, по которому «свои» клетки отличаются от «чужих».

#### **Антигенпредставляющие клетки**

Антигенпредставляющие клетки (АПК) способны отличать собственные антигены от чужеродных и представлять их Т- и В-лимфоцитам. Без этого невозможен иммунный ответ на чужеродные антигены. Роль АПК может играть любая клетка организма, обладающая антигеном главного комплекса тканевой совместимости МНС II класса и способностью сорбировать на своей поверхности чужеродный антиген. В организме человека антигенами МНС II класса обладают, в основном, макрофаги, В-лимфоциты, дендритные клетки, а также клетки Лангерганса, эндотелиальные клетки сосудов, кератиноциты кожи. Они обуславливают гуморальный иммунный ответ.

Антигены МНС I класса имеются практически во всех клетках, их воспринимают рецепторы CD8 лимфоцитов. Они обуславливают клеточный иммунный ответ – цитотоксичность ГЗТ.

## **Взаимодействие (кооперация клеток) при разных формах иммунного ответа**

### **Гуморальный иммунный ответ**

В гуморальном иммунном ответе участвуют макрофаги (или другие антигенпредставляющие клетки), Т-хелперы и В-лимфоциты. Макрофаг поглощает вторгшийся в организм человека микроорганизм, расщепляет его на фрагменты. Фрагменты – антигенные детерминанты – выставляются на поверхности макрофага вместе с собственными антигенами главного комплекса гистосовместимости МНС II класса. Образовавшийся комплекс – антиген микроорганизма и антиген МНС II класса – предъявляется Т-хелперу, при этом макрофаг продуцирует интерлейкин-1 (ИЛ-1), который вызывает пролиферацию Т-хелперов, а они после контакта с антигеном продуцируют ИЛ-2, стимулирующий пролиферацию В-лимфоцитов и их первое деление. ИЛ-2 и другие Т-клеточные цитокины ИЛ-4, ИЛ-5 способствуют дальнейшей трансформации В-лимфоцитов вплоть до формирования плазматических клеток – продуцентов иммуноглобулинов. Одновременно формируются В-лимфоциты памяти, обеспечивающие быстрый и сильный ответ на повторное действие антигена.

### **Клеточный иммунный ответ**

В клеточном иммунном ответе участвуют CD<sub>8</sub> Т-киллеры, они же цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ). Цитотоксические свойства CD<sub>8</sub> лимфоциты приобретают в ходе дифференцировки после контакта с антигеном. Этому способствует ИЛ-2, секретируемый Т-хелперами. В результате активации формируются два вида CD<sub>8</sub> лимфоцитов – цитотоксические лимфоциты и клетки памяти.

Для стимуляции CD<sub>8</sub> лимфоцитов необходим антиген МНС I класса, которым обладают все ядерные клетки организма. Т-киллеры анализируют клетки собственного организма в поисках измененной структуры, отличающейся от структуры комплекса антигенов МНС I класса. Такие признаки генетической чужеродности несут на своей поверхности мутантные клетки, клетки, пораженные вирусом, клетки трансплантата. Поэтому они являются мишенью для Т-киллера. Т-киллер устраняет клетки-мишени путем цитотоксичности, для чего синтезирует ряд токсических суб-

станций – перфорин и гранзимы (гранулизин – перфорин – токсический белок). Перфорин встраивается в цитоплазматическую мембрану клетки мишени, в результате образуется дефект цитоплазматической мембраны, который приводит к осмотическому лизису клетки-мишени.

Гранзимы и лигранулизины вещества с ферментативной активностью. Они запускают в клетках-мишенях апоптоз и гибель клеток-мишеней. Поэтому Т-киллер называют «серийным убийцей». За короткий срок он может уничтожить несколько клеток-мишеней. CD<sub>8</sub>-лимфоциты играют ведущую роль в противовирусном, противоопухолевом и трансплантационном иммунитете.

К цитотоксическим лимфоцитам по происхождению и функциям близки естественные киллеры (ЕК), которые имеют общих предшественников с Т-лимфоцитами. Однако ЕК не попадают в тимус и не подвергаются дифференцировке и селекции. Они не имеют специфических рецепторов для антигенов и поэтому не участвуют в специфических реакциях приобретенного иммунитета. ЕК относятся к системе естественного иммунитета и разрушают в организме любые клетки, зараженные вирусами, а также опухолевые клетки.

### **Иммунологическая толерантность**

Иммунологическая толерантность – это явление обратное иммунному ответу – утрата способности реагировать на антиген. Согласно клонально-селекционной теории Бернетта, толерантность развивается при интенсивном воздействии антигенов на организм. Бернетт это объяснял разрушением иммунокомпетентных клеток. Медавар экспериментально проверил теорию Бернетта. Для опытов использовал линейных мышей. Линейными, или инбредными, считается популяция мышей после 20–40 братско-сестринских скрещиваний. В результате мыши становятся совершенно одинаковыми по антигенному составу, как однояйцевые близнецы. В 1953 году Медавар вместе со своими сотрудниками проводил пересадку кожи между двумя линиями мышей – линия СВА (серые мыши) и линия А (белые). Через 12–14 дней пересаженная кожа (трансплантат) отторгалась. Тогда эмбрионам беременных самок СВА через стенку матки вводили клетки селезенки и почки мышей

линии А. После рождения нормальных мышей через 2 месяца им пересаживали кожный лоскут от мышей А. Кожный лоскут не отторгался. Было доказано, что воздействие антигеном в эмбриональном периоде приводит к утрате способности организма давать иммунный ответ, т. е. к развитию иммунологической толерантности (терпимости). За работы по изучению естественной толерантности Медавар и Бернетт были удостоены Нобелевской премии. Сходные данные были получены и на цыплятах.

Иммунологическая толерантность – это состояние, когда организм не реагирует на повторный контакт с антигеном.

Толерантность во взрослом состоянии – приобретенная, бывает 3-х видов:

I. *Толерантность высокой дозы* – иммунологический паралич – это полная неспособность реагировать на антиген, развивается после введения большого количества антигена.

II. *Толерантность низкой дозы* развивается после многократного введения очень малых количеств антигена.

III. *Лекарственно-индуцированная толерантность* – возникает при подавлении иммунной системы цитостатиками или иммунодепрессантами, такими как 6-меркаптапурин, имуран, антилимфоцитарная сыворотка, рентгеновское облучение и др. Именно этот прием используют, чтобы вызвать толерантность к трансплантату у людей.

В основе механизма толерантности лежат следующие процессы:

1. Разрушение специфически реактивного клона клеток (вытекает из теории Бернетта).

2. Образование блокирующих антител, которые связывают антиген, не давая развиваться видимому иммунному ответу.

3. Образование и активация клеток супрессоров, подавляющих антиген-реактивные клетки.

### **Особенности иммунитета при бактериальных инфекциях**

При бактериальных инфекциях иммунитет может быть антибактериальным или антитоксическим.

Основным механизмом *антибактериальной защиты* является фагоцитоз. В иммунном организме эффективность фагоцитоза повышается за счет опсонизирующего действия специфических ан-

тител. Антитела специфически взаимодействуют с антигенными детерминантами (эпитопами) на поверхности микроорганизмов, образуют с ними иммунные комплексы, что ведет к активации мембраноатакующего комплекса системы комплемента и лизису микробных клеток, которые быстрее и легче захватываются фагоцитами при участии Fc-рецепторов. При этом ускоряется и облегчается внутриклеточная гибель и переваривание.

В *антитоксическом иммунитете* защитная роль антител определяется их способностью нейтрализовать токсины.

Антибактериальная защита слизистых оболочек обеспечивается секреторными антителами класса А, которые, взаимодействуя с поверхностными антигенами бактерий, препятствуют их адгезии на эпителиальных клетках. Вместе с тем, гуморальная защита малоэффективна против внутриклеточно паразитирующих бактерий, риккетсий, хламидий, микоплазм, грибов, простейших, вирусов. Против этих возбудителей более эффективны клеточные механизмы специфического иммунитета-ГЗТ, цитотоксическая активность Т-киллеров, ЕК клеток, макрофагов.

Напряженность клеточного иммунитета измеряется путем постановки кожно-аллергических проб, РБТЛ, РТМЛ. Для выявления специфических антител в сыворотке крови больного при большинстве бактериальных инфекций проводится серодиагностика.

### **Особенности иммунитета при вирусных инфекциях**

Вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, от этого зависит характер иммунитета. Против внутриклеточных форм вирусов антитела не эффективны, они также не действуют на вирусные ДНК и РНК, не влияют на внутриклеточную репродукцию вируса. Антитела против вирусных антигенов могут нейтрализовать внеклеточные формы – вирионы, препятствуя их взаимодействию с клетками организма и распространению вирусной инфекции. Эффективно инактивирует вирус на поверхности слизистых оболочек секреторный IgA, обеспечивая местный противовирусный иммунитет во входных воротах инфекции. О напряженности противовирусного иммунитета судят по нарастанию титра специфических антител в сыворотке крови больного в динамике заболевания. Однако основной механизм противови-

русного иммунитета связан с клеточным иммунным ответом. Поскольку клетки, зараженные вирусом, несут на своей мембране его антигенные детерминанты, они становятся «мишенями» для Т-киллеров и НК клеток, участвующих в реакциях антителозависимой цитотоксичности. При этом зараженные клетки погибают вместе с вирусами.

Мощным фактором противовирусного иммунитета является интерферон, который вызывает в клетке, инфицированной вирусом, индукцию ферментов, подавляющих синтез компонентов вирусов, обуславливая состояние антивирусной резистентности. Поэтому профилактический эффект интерферона выражен сильнее, чем лечебный.

### **Противоопухолевый иммунитет**

Между состоянием иммунной системы и возникновением злокачественных опухолей существует тесная связь и об этом свидетельствуют следующие факторы:

- а) повышенная заболеваемость злокачественными новообразованиями среди лиц с иммунодефицитами первичными и вторичными;
- б) повышенная частота возникновения опухолей в старческом возрасте в связи с пониженной активностью иммунной системы;
- в) наличие у больных с опухолями специфических антител к опухолевым антигенам;
- г) возможность экспериментального воспроизведения иммунитета к опухолям при введении антигенов;
- д) возникновение опухоли при искусственном подавлении иммунитета.

Иммунная система осуществляет иммунологический надзор – постоянно следит за появлением клеток-мутантов, распознает их и уничтожает. В случае ослабления иммунной системы или повышения частоты мутаций возникает возможность сохранения и размножения клеток-мутантов, т. е. образования опухолей. Опухоли имеют свои специфические антигены: вирусные, эмбриональные, канцерогенные, вызванные химическими и физическими (все виды излучений) воздействиями. Поскольку любые опухолевые антигены являются чужеродными для организма, они вызывают гуморальные и клеточные реакции.

Основную роль в противоопухолевом иммунитете играют Т-лимфоциты и особенно естественные киллеры (NK), сенсibilизированные к опухолевым антигенам. Они распознают антигенные детерминанты опухолевых клеток, прикрепляются к поверхности этих клеток, выделяют цитотоксины – ферменты, которые разрушают стенку клетки, делают ее мишенью для фагоцитов. Опухолевая клетка поглощается фагоцитами и лизируется.

Противоопухолевые антитела не играют защитной роли, иногда стимулируют развитие опухоли потому, что они связывают антигенные рецепторы опухолевой клетки и препятствуют их контакту с Т-лимфоцитами киллерами.

Противоопухолевый иммунитет мало влияет на течение уже развившейся опухоли. Это объясняется несколькими причинами:

а) связыванием антиген-распознающих рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов-киллеров опухолевыми антигенами;

б) отсутствием защитного эффекта у противоопухолевых антител;

в) иммуносупрессивным действием опухоли;

г) интенсивностью роста злокачественных новообразований, опережающего скорость развития иммунитета.

Иммунодиагностика опухолей основана на определении в крови опухолевых антигенов и антител, а также лимфоцитов, сенсibilизированных к опухолевым антигенам.

Для лечения опухолей применяют иммуномодуляторы, стимулирующие деятельность иммунной системы: интерлейкины 1,2;  $\gamma$ -интерферон.

### **Демонстрация**

1. Таблицы и схемы по иммунологии.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Система иммунитета, её значение.

2. Иммунитет: врожденный, приобретенный, активный, пассивный, инфекционный, неинфекционный, стерильный, нестерильный.

3. Какие органы иммунной системы относят к центральным и периферическим? Их функции?

4. Назовите основные популяции и субпопуляции клеток иммунной системы. Каковы их основные функции и маркеры?

5. Назовите основные проявления клеточного и гуморального иммунитета.

6. Что такое иммунологическая память и иммунологическая толерантность? Какова их роль?

7. Что такое цитокины? Какова их роль в иммунном ответе?

8. Механизм межклеточной кооперации в реализации первичного иммунного ответа. Какие клетки при этом участвуют?

9. Особенности иммунитета при бактериальных, вирусных инфекциях и онкологических заболеваниях.

## **Тема: АНТИГЕНЫ И АНТИТЕЛА. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **План**

1. Антигены, их природа, свойства, применение (полноценные, неполноценные – гаптены). Антигены бактерий и вирусов. Антигены групп крови, антигены гистосовместимости, аутоантигены, опухолевые, трансплантационные антигены.

2. Антитела (иммуноглобулины), их структура, свойства, функции. Классы иммуноглобулинов, их характеристика. Неполные антитела. Динамика и механизм образования антител.

3. Методы выявления и идентификации специфических антигенов и специфических антител.

4. Реакция агглютинации (РА): механизм, роль ингредиентов и способы их получения, варианты, методы постановки, практическое значение.

5. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). Ингредиенты, цель использования.

6. Реакция преципитации (РП): механизм, ингредиенты, варианты постановки, разновидности (кольцепреципитации, преципитация в агаре, реакция флоккуляции).

7. Реакция нейтрализации (РН) токсина антитоксической сывороткой. Практическое применение.

8. Иммуноблотинг. Практическое применение.

### **Учебный материал**

**Антигены** – это генетически чужеродные вещества, которые, попав в организм или образуясь в нем, вызывают развитие специфического иммунного ответа. Иммунный ответ может быть:

- гуморальный – с выработкой антител;
- клеточный – с накоплением сенсibilизированных лимфоцитов;
- состояние иммунологической толерантности к антигену;
- гиперчувствительность немедленного или замедленного типа;
- иммунологическая память.

Антигенами могут быть белки, соединения белков с различными веществами – это липополисахаридопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды, нуклеопротеиды. Из комплекса антигенов состоят бактерии, простейшие, грибы, вирусы, их токсины, клетки животных, растений, яды змей и др.

Молекула любого антигена состоит из двух функционально различных частей:

- 1 – детерминантной группы, или эпитопа;
- 2 – проводниковой части антигена.

Детерминанта (эпитоп) определяет специфичность антигена, делает его именно этим антигеном, отличает от других. Детерминанты антигена – это те его части, которые распознаются антителами и иммунокомпетентными клетками. Они состоят из 6–25 аминокислот, располагаются на поверхности проводниковой части молекулы антигена, с которой связаны все остальные признаки антигена, в том случае макромолекулярность. Антигенами могут быть вещества с большой молекулярной массой – 10000 дальтон и более. Вещества, имеющие молекулярную массу ниже 5000, являются гаптенами (неполноценные антигены). Из-за небольшой молекулярной массы они не могут фиксироваться иммунокомпетентными клетками макроорганизма и стимулировать иммунный ответ. Если молекулу гаптена искусственно укрупнить, то получится полноценный антиген, специфичность которого будет определять гаптен.

### **Основные свойства антигенов**

*Специфичность* – обуславливает детерминантная группа (эпитоп).

*Чужеродность* – антиген вызывает иммунный ответ только в тех случаях, когда он обладает структурами, отсутствующими в организме, т. е. когда он чужероден для данного организма. Чем дальше друг от друга в филогенетическом развитии отстоят животные, тем большей антигенностью будут обладать их белки по отношению друг к другу. При пересадке органов животного человеку отторжение начинается прямо на операционном столе.

К собственным антигенам организм толерантен, т. е. отсутствует реакция иммунной системы на свои антигены, потому что

клетки иммунной системы, преадаптированные к собственным антигенам, погибают из-за избыточности антигенного стимула (сверхбольшая доза антигена – высокодозовая естественная толерантность). Антигены нервной системы, глаз, репродуктивных органов отделены от иммунной системы физиологическими барьерами. Такие антигены называются забарьерными. В случаях повреждения барьеров при травме или заболевании, забарьерные антигены поступают в общую циркуляцию и могут вызвать иммунопатологический процесс.

*Иммуногенность* – способность индуцировать иммунный ответ. Иммуногенность зависит от состояния организма, дозы, способа введения, интервала между прививками. Иммуногенность лучше всего проявляется при внутрикожном и подкожном введении антигена. При пероральном или ингаляторном введении создается местный, секреторный иммунитет. Иммуногенность можно изменить, если антиген смешать с другими веществами. Вещества, которые вводятся с антигенами и усиливают иммунный ответ на антиген, называются адьювантами. Это минеральные гели – гидроксид алюминия или фосфата, или эмульсия воды в масле, в котором суспензированы убитые высушенные микобактерии туберкулеза (полный адьювант Фрейнда). Адьюванты используются для того, чтобы усилить антигенную активность.

*Антигенность* – способность антигена избирательно реагировать со специфичными к нему антителами или антигенраспознающими рецепторами лимфоцитов.

*Антигенная мимикрия.* Микроорганизмы, инфицирующие человека, приобретают антигены, сходные с антигенами человека. Это называется антигенная мимикрия. К таким антигенам не вырабатывается иммунный ответ поскольку они не воспринимаются организмом как чужеродные и микроорганизмы выживают.

### **Перекрестнореагирующие антигены**

Чужеродные антигены, обладающие структурами, сходными с антигенами хозяина, получили название перекрестно реагирующих антигенов (ПРА). Некоторые штаммы гемолитических стрептококков обладают ПРА с антигенами эндокарда, почечных клубочков и нервной ткани, что способствует развитию таких ауто-

иммунных заболеваний, как ревматизм, гломерулонефрит, хорея потому, что ПРА в комплексе с другими антигенами вызывают образование аутоантител против тканей сердца, почек, нервной системы.

### Антигены микроорганизмов

**Соматический O-антиген** связан с клеточной стенкой грамотрицательных бактерий и представляет собой липополисахарид.

**Жгутиковый H-антиген** состоит из белка флагеллина, входит в состав бактериальных жгутиков.

**Капсульные K-антигены** полисахаридной природы имеются у бактерий, образующих выраженную капсулу (пневмококки, клебсиеллы и др. бактерий).

**Vi-антиген** – антиген вирулентности обнаружен у брюшно-тифозных и некоторых других энтеробактерий.

**Внеклеточные антигены** – вещества, секретируемые бактериями во внешнюю среду, – это экзотоксины, ферменты патогенности и др. факторы вирулентности.

**Антигены вирусов:** S-антиген представляет собой нуклеопротеид и белок, V-антиген – это гемагглютинин и нейраминидаза.

### Антигены человека

**Антигены главного комплекса тканевой совместимости** обозначаются **MHC-антигены** (англ. Major Histocompatibility Complex). Каждый организм обладает уникальным набором антигенов, свойственных только ему. MHC-антигены являются гликопротеинами и содержатся на мембранах клеток организма, определяя его биологическую индивидуальность, что позволяет отличать свое гистосовместимое от чужого несовместимого. MHC-антигены – обязательные структуры в индукции иммунного ответа на любой антиген.

**HLA (Human Leucocyte Antigens)** – трансплантационные антигены системы гистосовместимости наиболее полно представлены на мембране лейкоцитов.

**Групповые антигены крови системы ABO и резус-антигены** обнаруживают на мембране эритроцитов. По ним определяют группу крови.

**Антитела** – это сывороточные глобулины, образующиеся в ответ на действие антигена, поэтому их называют иммуноглобулины (Ig). Иммуноглобулины и антитела – слова-синонимы, они осуществляют гуморальный тип иммунного ответа. Антитела специфичны – способны соединяться только с тем антигеном, под воздействием которого они образовались.

### Функции антител

Антитела могут:

- склеивать (агглютинировать) клетки;
- растворять (лизировать) клетки;
- осаждать (преципитировать) антигены;
- активизировать систему комплемента;
- оказывать опсонизирующее действие (усиливать фагоцитоз);
- осуществлять аллергические реакции немедленного I, II, III типов.

По происхождению иммуноглобулины делятся на нормальные, инфекционные, постинфекционные, поствакцинальные.

**Структура антител.** Расшифровали структуру иммуноглобулина два исследователя – Портер из Англии и Эдельман – из США (1959–1972 гг.). Эдельман обработал, выделенные из крови иммуноглобулины 6-меркаптоэтанолом, который разрывает дисульфидные связи белковой молекулы и делит её на пептидные цепи. В результате такого воздействия Эдельман получил 4 полипептидные цепи. Две цепи одинаковые между собой имели молекулярный вес, примерно, по 25000 каждая. Их назвали L-цепи (от *англ.* light – легкий). Две другие цепи, тоже одинаковые, имели молекулярный вес по 50000 каждая. Их назвали H-цепи (от *англ.* haevi – тяжелый). Если одна пептидная цепь в два раза тяжелее другой, значит она в два раза длиннее. Получилась конструкция иммуноглобулина, напоминающая рогатку, что подтвердилось в дальнейшем на электронно-микроскопических снимках.

Портер обработал молекулу иммуноглобулина ферментом папаином и получил 3 фрагмента, примерно, равной величины и обозначил их 1, 2, 3. Первые два фрагмента оказались идентичными друг другу и состояли из L-цепи и части H-цепи. Они несли на себе

активные центры молекулы и обладали способностью соединяться с антигеном, поэтому их назвали Fab-1 и Fab-2 (от *англ.* fragment antigen binding), т. е. фрагменты, связывающие антиген. Третий фрагмент специфической активностью антител не обладал и состоял только из участков тяжелых цепей. Его назвали Fc-фрагмент (от *англ.* fragment crystalline). Дальше было установлено сколько аминокислот в каждой из 4 пептидных цепей. L-цепи содержали 214–219, H-цепи – 420–700 аминокислот. Была установлена последовательность их расположения, которая может быть постоянной или переменной. Переменные участки соответствуют Fab-фрагментам, постоянные – Fc-фрагментам. Переменные участки содержат примерно 110 аминокислотных остатков как в легких, так и в тяжелых цепях. Участки такой протяженности получили название доменов. Легкая цепь состоит из 2-х доменов, один из которых относится к переменной области, другой – к константной области. Переменная область представлена также одним доменом, а константная область включает 4 или 5 доменов в зависимости от класса иммуноглобулина. В пределах каждого домена полипептидная цепь уложена в виде петель. Три петли переменных доменов легкой и тяжелой цепи составляют гиперпеременный участок в составе антигенсвязывающего центра, специфичность которого определяется последовательностью аминокислот в концевых участках тяжелых и легких цепей. Изменение последовательности аминокислот обеспечивает возможность формирования большого числа различных структур, сочетающихся с детерминантной группой соответствующего антигена, как «ключ с замком».

Fc-фрагменты представляют собой участки тяжелых цепей с одинаковыми аминокислотными последовательностями. Постоянство строения Fc-фрагмента определяет постоянство функций данного класса иммуноглобулинов независимо от специфичности активного центра. Fc-фрагмент осуществляет фиксацию комплемента на комплексе «антиген – антитело», активизирует комплемент по классическому пути, обеспечивает проникновение IgG через плаценту.

Существует 5 разновидностей иммуноглобулинов. Они различаются по физико-химическим, антигенным и функциональным свойствам. Легкие цепи в молекулах иммуноглобулинов представ-

лены двумя изоантигенами:  $\lambda$  (лямбда) или  $\kappa$  (каппа). Тяжелые цепи иммуноглобулинов разных классов построены из разных белков (изоантигенов):  $\gamma$  – гамма,  $\mu$  – мю,  $\alpha$  – альфа,  $\delta$  – дельта,  $\epsilon$  – эpsilon, которые определяют их принадлежность к одному из 5 классов иммуноглобулинов **IgG**, **IgM**, **IgA**, **IgD**, **IgE**, соответственно. Специфичность иммуноглобулинов всех классов зависит от антигенсвязывающего участка, образованного гипервариабельными участками легкой и тяжелой цепи.

- *Имуноглобулины класса G (IgG)* составляют 80 % общего количества сывороточных иммуноглобулинов. Они обладают свойствами агглютининов, преципитинов, антитоксинов, связывают комплемент, могут переносить кожную анафилаксию. IgG единственные антитела, которые способны переходить через плаценту и играют важную роль в защите новорожденного от инфекции.
- *Имуноглобулины класса M (IgM)* составляют около 13 % сывороточных иммуноглобулинов. Это первые антитела, появляющиеся после первичной антигенной стимуляции. Они активизируют систему комплемента, фагоцитоз, оказывают действие на микробы, циркулирующие по крови. Содержат 10 активных центров (пентамеры), поэтому во много раз активнее их агглютинирующая и преципитирующая способность, а также гемолитическая и опсонизирующая активность. IgM принадлежит большая часть нормальных антител – изогемагглютининов, которые присутствуют в сыворотке крови в соответствии с принадлежностью к определенной группе АВО. Они играют важную роль при переливании крови.
- *Имуноглобулины класса A (IgA)* составляют около 20 % общего количества иммуноглобулинов. Встречаются в форме димеров. Имеют 4 активных центра для связывания антигена. По физико-химическим свойствам подразделяют на два вида: сывороточные и секреторные.

*Секреторные IgA* синтезируется лимфоидными клетками слизистых оболочек дыхательных путей, полости рта, кишечника, мочевыводящих путей. Содержатся в молозиве, слюне, слезах, слизи кишечника. Секреторные IgA играют существенную роль в мест-

ном иммунитете, препятствуют адгезии микроорганизмов на эпителиальных клетках слизистых оболочек рта, кишечника, дыхательных и мочевыводящих путей. Они активируют комплемент по альтернативному пути, что приводит к стимуляции местной фагоцитарной защиты. Секреторные IgA препятствуют адсорбции и репродукции вирусов в эпителиальных клетках слизистой оболочки при полиомиелите, кори, аденовирусной инфекции.

*Сывороточные IgA* обезвреживают микробы и их токсины, проникающие в кровь. В норме в крови содержится 0,00025 г/л.

- *IgD* составляют 0,2 % сывороточных иммуноглобулинов. До сих пор неясно, какие функции выполняют *IgD*. Предполагают, что они являются одним из рецепторов В-лимфоцитов.
- *IgE* составляют 0,002 % сывороточных иммуноглобулинов. Это кожно-сенсibiliзирующие антитела, реагены. Обладают выраженной цитотильностью, способностью фиксироваться на клетках различных органов и тканей. Играют важную роль в развитии аллергических реакций немедленного типа (бронхиальная астма, аллергический ринит, анафилактический шок и пр.).

Разные классы иммуноглобулинов отличаются способностью связывать гомологичные антигены. Полные антитела, когда участвуют два активных центра, обуславливают бивалентность антител. При этом каждый активный центр связывается с одним из эпитопов поливалентного антигена, образуя сетевую структуру, которая выпадает в осадок. Наряду с бивалентными существуют моновалентные антитела, у которых функционирует лишь один из двух активных центров, способный связываться лишь с единичной антигенной детерминантой без последующего образования сетевой структуры иммунных комплексов. Такие антитела называются неполными, они выявляются в сыворотке крови с антииммуноглобулиновой сывороткой в реакции Кумбса.

### **Динамика выработки антител**

Когда в организм впервые попадает антиген, то первые 3–4 дня антител нет. Это время называется латентным периодом. Затем в течение нескольких дней содержание антител резко возрастает –

период логарифмического возрастания антител; в период максимума титр антител поддерживается на одном уровне, примерно 2 недели – месяц, после чего наступает период снижения. Такая динамика характерна для первичного иммунного ответа, когда организм первый раз встречается с антигеном.

Если организм встречается с антигеном второй, третий и т. д. раз, латентный период отсутствует. Сразу происходит логарифмическое накопление антител и период максимума достигает более высоких цифр. Поэтому для достижения выраженного иммунного ответа антиген вводят неоднократно. Организм запоминает контакт с антигеном. Это явление носит название иммунологической памяти и лежит в основе приобретенного иммунитета. Носителями иммунологической памяти являются лимфоциты.

### **Гибридомы и моноклональные антитела**

В 1975 году Келлер и Мильштейн разработали методику, позволяющую в пробирке получать любое количество антител любой заданной специфичности. Это было достигнуто путем слияния лимфоцитов иммунизированных животных с миеломными клетками. От миеломных клеток новая гибридная клетка получает способность бесконечно размножаться, а от лимфоцита – способность синтезировать определенное антитело. Полученные в пробирке таким образом антитела могут быть использованы с лечебной и диагностической целью.

### **Теории иммунитета**

Теория Ф. Бернетта предусматривает предсуществование в организме клонов клеток, которые способны вырабатывать антитела на любые антигены. Попавший в организм антиген вызывает активацию «своего» клона лимфоцитов, который избирательно размножается и начинает вырабатывать специфические антитела. Если же доза антигена, воздействующего на организм велика, то клон «своих» лимфоидных клеток разрушается, устраняется из общей популяции, и тогда организм теряет способность реагировать на свой антиген, т. е. он становится к нему толерантным. Так, по Бернетту, в эмбриональном периоде формируется толерантность к собственным антигенам.

По теории Эрне идиотип антиидиотипической регуляции, иммунная система представляет собой цепь взаимодействующих идиотипов и антиидиотипов, т. е. специфических структур активного центра, сформированных под влиянием антигена.

### **Серологический метод диагностики инфекционных заболеваний**

**Серологические реакции** – реакции взаимодействия между антигенами и специфическими антителами *in vitro*, имеющие различные видимые проявления. Это реакции:

- агглютинации (РА);
- непрямой гемагглютинации (РНГА);
- преципитации (РП);
- связывания комплемента (РСК);
- нейтрализации (РН);
- иммуноферментного анализа (ИФА);
- радиоиммунного анализа;
- иммуноблотинга.

Серологические реакции используются в диагностике инфекционных заболеваний:

- с целью определения вида выделенного микроба (неизвестного антигена) с помощью специфической иммунной диагностической сыворотки (известных антител). Такое исследование называется серологической идентификацией возбудителя;
- для обнаружения антител в сыворотке больного (неизвестных антител) с помощью известных антигенов – диагностикумов, приготовленных из соответствующих микробов возбудителей заболевания. Такое исследование называется серологической диагностикой.

### **Методические рекомендации к выполнению практической работы**

**Реакция агглютинации** – склеивание микробов или других клеток (корпускулярных антигенов – агглютиногенов) с образованием видимых глазом хлопьев под действием специфических ан-

тител (агглютининов) в присутствии электролитов (физио­раствора). Реакцию агглютинации ставят как для серологической идентификации, выделенной от больного чистой культуры микроорганизмов, так и для определения антител в сыворотке больного, т. е. для серологической диагностики.

**Постановка реакции агглютинации на предметном стекле для идентификации неизвестной культуры микробов по антигенным свойствам.**

*Ингредиенты:* чистая культура возбудителя болезни, физиологический раствор, диагностическая иммунная сыворотка, которую получают от животных (обычно кроликов, иммунизированных соответствующим видом микроба). На одну половину предметного стекла нанесите каплю диагностической сыворотки (опыт), на другую – каплю физиологического раствора (контроль). Петлей возьмите исследуемую культуру и внесите её сначала в каплю с физиологическим раствором, потом в каплю с иммунной сывороткой. Покачивая стекло, равномерно распределите ингредиенты реакции. Склеивание происходит в течение первых минут наблюдения в капле с сывороткой, где образуются хлопья; контрольная капля остается равномерно мутной.

Постановка *развернутой реакции агглютинации в пробирках* с целью определения титра антител в сыворотке крови больного – серодиагностика. *Ингредиенты:* сыворотка крови больного брюшным тифом; диагностикум – взвесь известных убитых микробов; физиологический раствор.

*Техника постановки реакции* указана в таблице.

Штатив с пробирками поместить в термостат на 2 часа, после чего учитывается предварительный результат. Окончательный результат – через 24 часа после пребывания реакции при комнатной температуре.

*Учет реакции агглютинации*

Положительный результат – образование хлопьев и просветление жидкости, хлопья выпадают в осадок, жидкость над ними становится прозрачная. В контроле антигена и при отсутствии антител в разведенной испытуемой сыворотки (отрицательный результат) содержимое пробирок равномерно мутное.

Титр сыворотки – то наибольшее разведение сыворотки, где еще наблюдается агглютинация.

**Реакция преципитации** – осаждение антигенов (преципити-ногенов) специфическими антителами (преципитинами) в присутствии электролитов. Осаждение комплекса «антиген – антитело» наблюдается при их соответствии.

Реакция преципитации служит для определения антигена по известной преципитирующей сыворотке. Такую диагностическую сыворотку получают иммунизацией животных (чаще кроликов) соответствующими антигенами.

Постановка *реакции кольцепреципитации* с целью определения видовой специфичности белка крови в судебной медицине.

Ингредиенты и техника постановки реакции кольцепреципитации указаны в таблице 2.

В пробирки с преципитирующими сыворотками, держа их в наклонном положении, осторожно насливают по 0,2 мл раствора антигена. Затем пробирки переводят в вертикальное положение.

Учет реакции производят через 1–2 мин. В случае положительной реакции на границе между сывороткой и исследуемым материалом появляется преципитат в виде белого кольца.

Таблица 2 – Постановка реакции кольцепреципитации

Ингредиенты, мл	Пробирки	
	1-я	2-я
1. Преципитирующая сыворотка к антигенам человека	2,0	–
2. Преципитирующая сыворотка к антигенам барана	–	2,0
3. X-антиген	0,2	0,2

Постановка *реакции преципитации в геле* с целью определения токсигенности дифтерийных культур.

На чашку Петри с питательной средой помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную антитоксической противодифтерийной сывороткой. На расстоянии 0,7 см от края полоски засевают методом бляшек исследуемые культуры дифтерийной палочки. Чашки инкубируют при 37 °С в течение суток. При наличии токсигенной культуры в месте взаимодействия токсина с антителами-антитоксинами образуется линия преципитации в виде дуги.

**Реакция иммуноблотинга.** Иммуноблотинг – это иммунологический анализ различных биополимеров, в том числе микробных антигенов и иммуноглобулинов сыворотки крови, путем сочетания трех методов: электрофореза в полиакриламидном геле, электропереноса разделенных белков с геля на подложку и определение их с помощью ИФА.

Иммуноблотинг применяют для выявления антител к отдельным антигенам или для определения антигенных детерминант по известным сывороткам.

Этапы иммуноблотинга:

1. Разделение смеси биологических макромолекул (например, компонентов вируса или белков сыворотки крови) на отдельные фракции с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

2. Перенос разделенных фракций из геля на твердую подложку (блот) путем наложения пластины полиакриламидного геля на активированную нитроцеллюлозу или бумагу.

3. Выявление на подложке искомым макромолекул (антигенов или антител) с помощью прямого или непрямого иммуноферментного анализа.

С помощью иммуноблотинга возможно определить «индивидуальные» антитела к отдельным макромолекулам, например, к различным вирусным белковым антигенам, что способствует достоверности диагностики. Кроме того, определение в изучаемой сыворотке характерных спектров антител к отдельным вирусным белкам и выявление динамики изменения этих показателей имеет прогностическое значение.

Иммуноблотинг применяют при различных бактериальных и вирусных инфекциях и, в частности, при серологической диагностике ВИЧ-инфекции, которая проводится двухэтапно. Первый этап заключается в массовом обследовании образцов сыворотки крови на содержание антител с помощью стандартной тест-системы ИФА для ВИЧ-инфекции. На втором этапе проводят подтверждающую проверку отобранных положительных образцов сыворотки методом иммуноблотинга. При выявлении антител минимум к трем «индивидуальным» антигенам вируса (gp120, gp41, p24), человека считают ВИЧ-инфицированным.

**Радиоиммунный анализ (РИА).** Метод РИА основан на выявлении комплексов «антиген – антитело», которые образуются при их соответствии (один из ингредиентов известен, другой определяют) с помощью радиоактивных изотопов –  $I^{131}$ ,  $H^3$ , которыми метят известный ингредиент. Реакцию учитывают, используя специальные счетчики радио- и  $\gamma$ -излучения, по убыванию или возрастанию радиоактивности (в зависимости от применяемой методики РИА).

Существуют различные модификации РИА, чаще используют твердофазный метод, который по своей технике во многом сходен с твердофазным иммуноферментным анализом. Твердофазный РИА можно проводить прямым, непрямым и конкурентным методами. Наиболее удобен непрямой метод.

С помощью непрямого твердофазного РИА возможно определять неизвестные антигены или антитела, используя меченную изотопами видовую антиглобулиновую сыворотку (против глобулинов человека или кролика).

Для выявления антител в лунках полистироловой планшеты сорбируют известный антиген, соответствующий искомым антителам, затем добавляют разведенную сыворотку больного. При соответствии антигена и антител, они образуют комплексы, остающиеся в лунках после промывания. Далее вносят меченную изотопом антиглобулиновую сыворотку против глобулинов человека, которая присоединится к комплексам «антиген – антитело», и часть радиоактивной метки окажется связанной. Определив оставшуюся несвязанной радиоактивность в жидкой фазе содержащего лунки, решают вопрос о соответствии определяемых антител антигену, а также о количественном содержании антител в сыворотке. Чем больше в сыворотке антител, тем больше радиоактивности окажется связанной и меньше радиоактивности останется в жидкой фазе.

Радиоиммунный анализ наиболее чувствительный из всех серологических методик. РИА позволяет выявить минимальные количества искоемых антигенов или антител, даже при их содержании в пикомолях (10 М). Применение РИА ограничивает небезопасность работы с радиоактивными изотопами и необходимость наличия специфичной сложной аппаратуры.

### **Демонстрация**

1. Титр антител в сыворотке больного брюшным тифом в реакции агглютинации Видаля. Обратит внимание, что при наличии агглютинации в пробирках обнаруживается осадок в виде хлопьев (агглютинат). При отрицательном результате – мутная взвесь микробов.

2. Токсигенность дифтерийной палочки в реакции преципитации *in vitro*. Обратит внимание на образование линий преципитации вблизи культур токсигенных штаммов микробов и их отсутствие около нетоксигенных штаммов.

3. Диагностические препараты: агглютинирующие сыворотки, диагностикумы, преципитирующие сыворотки; анатоксины: столбнячный, дифтерийный, гангренозный, стафилококковый, стрептококковый; антитоксические сыворотки: противостолбнячная, противогангренозная, противоботулиническая.

4. Таблицы по постановке реакций агглютинации, РНГА, преципитации, флукюляции и др.

### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Реакция агглютинации. Ингредиенты реакции: антигены, антитела их характеристика. Методы постановки реакции.

2. Что такое диагностикумы, для чего применяются?

3. Как получается диагностическая иммунная сыворотка, для чего применяется?

4. Реакция преципитации. Техника постановки. Применение на практике.

5. Реакция нейтрализации токсина антитоксической сывороткой (феномен флукюляции). Получение антитоксических сывороток. Практическое использование – диагностическое, лечебное.

6. Реакция иммобилизации.

7. Реакция иммунофлюоресценции прямая и непрямая.

8. Получение и титрование иммунных диагностических сывороток.

9. Понятие о гибридомах и моноклональных антителах.

10. Механизм радиоиммунного анализа.

11. Иммуноблотинг. механизм и техника постановки, цель использования.

12. Иммуноблотинг, сущность метода и этапы постановки. В чем преимущество этого метода?

13. Опишите применение иммуноблотинга в серологической диагностике ВИЧ-инфекции.

14. В чем заключается сущность радиоиммунологического анализа? Преимущества и недостатки этого метода.

## **Тема: РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ КОМПЛЕМЕНТА – РЕАКЦИИ ЛИЗИСА**

### **План**

1. Реакции иммунного лизиса: ингредиенты, механизм реакции, разновидности (гемолиз, бактериолиз).
2. Реакция связывания комплемента.
3. Реакции с использованием меченых антител или антигенов ИФА.
4. Реакция иммунофлюоресценции РИФ.

### **Демонстрация**

1. Флакон стерильный со стеклянными бусами.
2. В ампулах: гемолитическая сыворотка, комплемент, антигены для РСК.
3. Результат реакции бактериолиза в чашках.
4. Тест-системы для постановки ИФА.
5. Таблицы по реакциям лизиса.

### **Методические рекомендации к выполнению практической работы**

1. По схеме (таблица 3) поставить реакцию иммунного гемолиза.

Таблица 3 – Постановка реакции гемолиза

Ингредиенты, мл	Номер пробирки			
	1	2	3	4
1. Гемолитическая сыворотка	0,5	-	0,5	-
2. Суспензия эритроцитов барана 5%-я (антиген)	0,5	0,5	0,5	0,5
3. Комплемент в разведении 1:10	0,5	0,5	-	-
4. Физраствор	1,0	1,5	1,5	2,0
Результат реакции	Гемолиз		Отсутствие гемолиза	

Обратите внимание на гемолиз – растворение эритроцитов под действием антител гемолизинов в присутствии комплемента («лаковая кровь» – прозрачная жидкость алого цвета). При отсутствии гемолиза в пробирке – мутная взвесь эритроцитов.

2. По схеме (таблица 4) поставить реакцию связывания комплемента Борде – Жангу.

Таблица 4 – Постановка РСК

Ингредиенты, мл	Номер пробирки				
	1	2	3	4	5
1. Антиген	0,5	0,5	–	0,5	–
2. Сыворотка	0,5х-S	0,5N-S	0,5х-S	–	–
3. Комплемент	0,5	0,5	0,5	–	0,5
4. Физраствор	–	–	0,5	1,0	1,0
<i>Пробирки поместить в термостат при 37 °С на один час</i>					
5. Гемолитическая система, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>Пробирки поместить в термостат при 37 °С до гемолиза в контролях</i>					
Результат – гемолиз	Нет	Есть	Есть	Нет	Есть
Реакция	Положительная	Отрицательная	Контроль антикомплементарных свойств сыворотки	Контроль гемотоксических свойств антигена	Контроль качества дозы комплемента

Реакция связывания комплемента происходит в 2 фазы:

1-я – взаимодействие антител исследуемой сыворотки с антигеном и комплементом;

2-я – индикаторная – определение наличия в смеси свободного комплемента путем добавления гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к эритроцитам барана. Если в первой фазе реакции происходит образование комплекса «антиген – антитело», комплемент связывается этим комплексом и во 2-й фазе гемолиз эритроцитов отсутствует (реакция положительная). Если в исследуемой

дуемой сыворотке нет антител, комплемент в первой фазе реакции остается свободным и во второй фазе реакции присоединяется к комплексу «эритроцит – гемолитическая сыворотка», вызывая гемолиз (реакция отрицательная).

3. По схеме (таблица 5) поставить реакцию бактериолиза.

Таблица 5 – Постановка реакции бактериолиза

Ингредиенты, мл	Номер пробирки		
	1 (опыт)	2 (контроль)	3 (контроль)
1. Иммунная сыворотка	0,5	0,5	–
2. Нормальная сыворотка	–	–	0,5
3. Комплемент	0,5	–	0,5
4. Взвесь микробов	0,5	0,5	0,5
5. Физраствор	-	0,5	–

Пробирки помещают на 2 часа в термостат при 37 °С, после чего делают посев 0,5 мл на чашки с МПА и ставят посевы на сутки в термостат.

Обратите внимание, что бактериолиз учитывается по результату посева содержимого опытной и контрольных пробирок на чашки Петри с МПА. В опытной пробирке произошел бактериолиз, и поэтому роста на чашке с питательной средой нет. В контрольных пробирках бактерии сохраняют свою жизнедеятельность и в результате – на чашках появляются колонии бактерий.

### **Реакции с применением меченых антител и антигенов**

**Имуноферментный анализ (ИФА)** – выявление антигенов (или антител) с помощью соответствующих им антител (антигенов), конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой или щелочной фосфатазой).

Наиболее распространен твердофазный ИФА, когда один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе – в лунках полистироловой планшеты.

Для выявления антител (непрямой метод) известный антиген адсорбируют в лунках планшеты, затем вносят исследуемую сыворотку, в которой хотят обнаружить антитела к данному антигену. После

инкубации лунки промывают для удаления несвязавшихся белков и вносят в них антииммунноглобулиновые антитела, меченные ферментом пероксидазой. После инкубации и отмывания в лунки добавляют специфичный для фермента субстрат – перекись водорода и хромоген (орто-фенилдиамин) для регистрации конечных продуктов расщепления субстрата. По изменению цвета и интенсивности окраски раствора судят о наличии и количестве антител.

Если необходимо определить в исследуемом материале антиген (прямой метод), в лунку с сорбированными антителами вносят исследуемый материал, добавляют иммунную сыворотку против антигена, меченную ферментом, и смесь растворов субстрата для фермента и хромоген. Измерение количества продуктов ИФА проводят в автоматизированном варианте в приборах-ридерах с помощью спектрофотометра или в автоматических ридерах, измеряя оптическую плотность раствора в лунках при определенной длине волны.

К настоящему времени созданы многочисленные модификации базовой методики ИФА: конкурентные методы ИФА, сэндвич-ИФА (метод двойных антител для определения антигена) и др. Для постановки ИФА выпускаются специальные тест-системы с набором всех необходимых ингредиентов.

**Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)** основана на том, что антитела иммунной сыворотки метят флюорохромами. Образовавшийся комплекс «антиген – антитело» легко обнаружить по наличию этой святящейся метки при люминесцентной микроскопии.

Реакция иммунофлюоресценции может быть поставлена и в непрямом варианте, когда свечение комплексу «антиген – антитело» придает меченная флюорохромом антиглобулиновая сыворотка (чаще всего против глобулинов кролика), вступающая во взаимодействие с антителами иммунной сыворотки.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Реакции иммунного лизиса, разновидности, механизмы.
2. Комплемент, его компоненты, участвующие в иммунных реакциях. Классический и альтернативный пути активации комплемента.

3. Сущность и практическое значение реакции гемолиза. Гемолитическая система её состав и использование.

4. Механизм реакции бактериолиза, практическое значение.

5. Реакция связывания комплемента, системы, участвующие в реакции, ингредиенты, механизм РСК. Понятие о специфическом и неспецифическом антигене. Практическое значение РСК.

6. Механизм РИФ (прямой и непрямой, метод Кунса). Цель использования.

7. Иммуноферментный анализ (ИФА), механизм и техника постановки, цель использования.

# **Тема: АЛЛЕРГИЯ: ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ НЕМЕДЛЕННОГО ТИПА. ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА**

## **План**

1. Немедленные реакции ГНТ.
2. Замедленные реакции ГЗТ.

## **Учебный материал**

### **Реакции гиперчувствительности I типа**

**Аллергия** (allos – другой, ergon – действие). Это необычная иная форма реагирования на антиген, т. е. гиперчувствительность на антиген. Гиперчувствительность – это патологическая чрезмерно сильная иммунная реакция на чужеродный антиген (аллерген), который приводит к повреждению тканей и органов. Аллергия может проявляться по типу гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) и гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Виды аллергенов:

- а) растительного происхождения – пыльца растений;
- б) животного происхождения – эпидермальные антигены, антигены клещей и др.;
- в) бытовые аллергены – пыль и др.;
- г) пищевые аллергены – яйцо, молоко, сыр, мясо, шоколад, ракообразные, орехи, ягоды, грибы и др.;
- д) лекарственные аллергены – антибиотики, сульфаниламиды, гормоны, сыворотки, витамины;
- е) инфекционные аллергены – антигены бактерий, грибов, простейших;
- ж) промышленные аллергены – полимеры, пестициды и др.

Различают 4 основных типа аллергий:

I тип – анафилактический.

II тип – цитотоксический.

III тип – иммунокомплексный.

IV тип – клеточно-опосредованный.

Первые три типа относятся к ГНТ, 4-й тип – к ГЗТ. Немедленные реакции ГНТ связаны с образованием антител, поэтому они называются В-зависимыми. Замедленные реакции ГЗТ связаны с развитием клеточной гиперчувствительности, поэтому они называются Т-зависимыми. К ГНТ относятся аллергические реакции, проявляющиеся через несколько минут после повторной встречи с антигеном, а к ГЗТ – реакции, возникающие через 6–8 часов и позже.

## Реакции гиперчувствительности I типа

### Анафилаксия

Анафилаксия (*греч.* *ana* – отсутствие, *filaxis* – защита. Это повышенная чувствительность организма к повторному введению чужеродного белка. Изменение реактивности организма, повышение его чувствительности, развивающееся после первого контакта с антигеном, называют сенсibilизацией. *Сенсibilизация* происходит не сразу после введения антигена, а требует определенного времени – инкубационного периода. Максимальная степень сенсibilизации наступает примерно через 3 недели, затем ослабевает, но может сохраняться в течение многих лет. Повторное введение в сенсibilизированный организм антигена вызывает острую бурную реакцию, нередко заканчивающуюся смертью от анафилактического шока. Доза антигена, вызывающая сенсibilизацию, т. е. повышенную чувствительность, называется сенсibilизирующей. Она обычно очень мала – 0,0001 мл сыворотки. Доза антигена, введенная уже сенсibilизированному организму и вызывающая анафилаксию, называется разрешающей. Разрешающая доза должна быть значительно больше (0,1 мл), чем сенсibilизирующая. Развитие анафилактической реакции зависит и от способа введения антигена – способ должен быть парентеральным. При введении в пищеварительный тракт белок разрушается и теряет анафилактогенные свойства.

Анафилаксию можно легко вызвать в эксперименте на морских свинках. Для этого их сенсibilизируют введением лошадиной сыворотки в дозе 0,001 мл подкожно. Если таким свинкам через 8–20 дней ввести внутривенно 0,1 мл той же сыворотки, они погибнут от анафилактического шока. Сразу же после повторного

введения сыворотки или через 5 минут животное начинает беспокоиться, затрудняется дыхание, чихает, кашляет, появляется удушье, судороги всего тела, и свинка погибает от асфиксии. На вскрытии – эмфизема легких, кровоизлияния в слизистую ЖКТ. Свертываемость крови понижена, комплемент в ней уменьшен.

Склонность к анафилаксии у разных животных выражена по-разному: у морских свинок преобладают явления бронхиального спазма, эмфиземы и отека легких; у собак резко выражены кишечные расстройства, обусловленные спазмом гладкой мускулатуры кишечника; у человека на первый план выступают сердечно-сосудистые расстройства.

У человека возможность развития анафилаксии возникает при введении антитоксической лошадиной сыворотки с целью лечения дифтерии, столбняка, газовой гангрены, ботулизма.

*Механизм анафилаксии.* После первого контакта организма с антигеном образуется IgE, который адсорбируется на поверхности тучных клеток, базофилов. При повторном попадании в организм этого же антигена он связывается с IgE-антителами. Образовавшийся комплекс «антиген – антитело» повреждает клетки, которые в ответ на это выделяют медиаторы – гистамин, серотонин, гепарин, кинины. Они действуют на клетки, что ведет к сокращению гладкой мускулатуры бронхов, кишечника, мочевого пузыря, повышению проницаемости сосудов и другим функциональным и морфологическим изменениям. Клинически это проявляется в виде одышки, удушья, слабости, беспокойства, судорог непроизвольного мочеиспускания, дефекации и др.

Состояние сенсibilизации после контакта с антигеном сохраняется месяцами, иногда годами. Интенсивность сенсibilизации можно искусственно уменьшить путем введения малых доз антигена, которые связывают в организме часть антител. Этот принцип был использован для десенсibilизации (гипосенсibilизации), т. е. предупреждения анафилактического шока при повторных введениях антигена. Впервые способ десенсibilизации предложил русский ученый А. Безредка в 1907 году. Человеку, ранее получавшему сыворотку, вначале вводят 0,1 мл сыворотки в разведении 1:100, через 30 минут, при отсутствии признаков сенсibilизи-

зации (уртикальная сыпь, зуд), вводят 0,1 мл неразведенной сыворотки подкожно и ещё через 30 минут – всю оставшуюся дозу. Таким приемом обязательно пользуются во всех клиниках для предупреждения развития анафилактического шока.

### **Атопия**

Атопии также относятся к ГНТ. Это слово в дословном переводе означает «странная болезнь»: у людей весной или осенью, без всякой видимой причины развивается насморк или сыпь, или отек, или возникает реакция на пищу, или на лекарства. Часто это носит профессиональный характер – у медсестер – на пенициллин, у парикмахеров – к человеческому волосу, у мукомолов – к мучной пыли и т. д. Атопия может проявиться также в виде бронхиальной астмы, аллергических дерматитов, уртикарии, сенной лихорадки и т. д.

Решающая роль в развитии этих заболеваний принадлежит наследственной предрасположенности к гиперпродукции IgE в ответ на сенсibilизацию определенным аллергеном. Возможно, это связано с наследуемым иммунодефицитным состоянием, при котором избирательно снижена активность супрессоров, контролирующих синтез IgE к данному антигену или повышенная способность клеток адсорбировать гаптены. Гаптены комбинируются с собственными белками и образуют полные антигены, на которые организм отвечает образованием IgE, и когда в организм повторно попадает тот же антиген, развивается атопия. Механизм такой же, как при анафилаксии.

Для лечения атопических болезней применяют принцип десенсибилизации – гипосенсибилизации, заключающийся в многократном введении того антигена, который вызвал сенсibilизацию.

Механизм десенсибилизирующей терапии обусловлен снижением уровня IgE и увеличением числа супрессоров.

### **Реакции гиперчувствительности II типа**

Эти реакции получили название цитотоксические. В их основе лежит выработка IgM и IgG, направленных против антигенов, входящих в состав клеточных мембран. Такими антигенами могут быть аутоантигены печени, почек, сердца, мозга или лекарственные аллергены, вторично фиксированные на клеточных мембра-

нах. Антитела IgM и IgG, образующиеся в результате аутоиммунизации, к компонентам собственных клеток связываются с мембранами этих клеток и вызывают их повреждение с участием комплемента. Таким образом, основным механизмом повреждения и гибели клеток является комплементзависимый цитолиз, что приводит к соответствующим клиническим проявлениям – гемолитической анемии, лейкопении, к аллергическим поражениям, печени, сердца, почек.

### **Реакции гиперчувствительности III типа**

Реакции обусловлены патогенным действием комплексов «антиген – антитело» (или иммунных комплексов ИК). ИК представляет собой макромолекулярную структуру, содержащую множество молекул антигена и антител. ИК активизирует комплемент и присоединяется к фагоцитам. ИК нейтрализует действие токсинов или вирусов, способствует разрушению и фагоцитозу антигенных субстратов, вошедших в состав комплекса. Однако в определенных случаях ИК способствует повреждению клеток и тканей организма, вызывая болезненные состояния. Это возникает, когда иммунные комплексы, вовремя не выведенные из циркуляции, фиксируются в тканях или механически задерживаются в узких капиллярах почек, глаз, кожи, других органов. В результате ИК вызывает повреждение тканей самой разной локализации: кожи, суставов, почек, мышц и др. Болезни иммунных комплексов носят системный характер, например, сывороточная болезнь, системная красная волчанка.

**Сывороточная болезнь** – это реакция, возникающая при разовом парентеральном введении больших доз сыворотки (противостолбнячной, противодифтерийной) или других белковых препаратов. Обычно реакция возникает спустя 10–15 суток. Механизм сывороточной болезни связан с образованием антител против антигенов сыворотки, так как в данном случае вводился избыток антигена, который быстро не выводится из организма и вызывает образование антител. Когда накапливается достаточно антител, образуются комплексы «антиген – антитело», они оседают в стенке сосудов, вызывая воспаление. Клинически это проявляется в виде отека кожи и слизистых оболочек, повышения температуры

тела, отечности суставов, зуда кожи, в крови – лейкоцитоз, эозинофилия.

Профилактика сывороточной болезни – введение препаратов по способу Безредки.

### **Реакции гиперчувствительности IV типа**

Тип IV – реакции гиперчувствительности замедленного типа – ГЗТ. В основе формирования ГЗТ лежит не гуморальный, а клеточный иммунный ответ организма на первый (сенсibilизирующий) контакт с определенным антигеном. Это клеточно-опосредованная сенсibilизация.

Чем отличается ГЗТ от ГНТ:

1. ГЗТ не связана с антителами, поэтому с сывороткой не переносится, но может быть перенесена с лимфоидными клетками.

2. Реакции развиваются не ранее 6–8 часов, максимум – через 24–72 часа.

3. Гистологически при ГЗТ отек минимальный, но в основном мононуклеарная инфильтрация – лимфоциты, макрофаги, моноциты.

ГЗТ развивается при многих бактериальных инфекциях: туберкулезе, туляремии, бруцеллезе, сифилисе, вирусных инфекциях, гельминтозах, протозойных инфекциях. ГЗТ играет основную роль при реакции отторжения трансплантата, при борьбе организма со злокачественными клетками. ГЗТ лежит в основе лекарственной и профессиональной аллергии. В этом случае гаптены-красители, антибиотики, сульфаниламиды и другие лекарственные препараты, растительные яды комбинируются с белками организма, образуют полные антигены, на которые формируется ГЗТ. Результатом являются различные кожные поражения, колиты, пневмонии и т. д.

При первом контакте организма с антигеном-аллергеном развивается сенсibilизация, которая связана с преимущественной пролиферацией Т-лимфоцитов, несущих специфические для данного антигена (аллергена) распознающие рецепторы. После этого в организме надолго сохраняется размножившийся клон сенсibilизированных Т-лимфоцитов, вступающий в реакцию с тем же антигеном при повторном попадании в организм. Основным следствием такого

взаимодействия является пролиферация лимфоцитов с образованием молодых клеток-бластов и активация Т-эффекторов с усилением выработки и секреции клеточных медиаторов – лимфокинов. Различают лимфокины активирующие другие лимфоциты и макрофаги, фактор хемотаксиса, фактор торможения миграции лимфоцитов, а также интерферон. Кроме того, лимфоциты секретируют цитотоксины, повреждающие клетки-мишени. При действии медиаторов развивается местная воспалительная реакция. Она проявляется в скоплении макрофагов, в изменении проницаемости сосудов, активации фагоцитоза, местном накоплении антител, образовании гранулем, ограничивающих очаг инфекции. При отсутствии ГЗТ наблюдается очень тяжелое течение бактериальных, вирусных инфекций, и даже живые вакцины могут вызвать тяжелый инфекционный процесс у людей с подавленной Т-системой.

Однако при очень высокой ГЗТ может наблюдаться утяжеление специфического процесса, так как воспалительная реакция достигает такого уровня, когда она сама несет опасность для больного. Поэтому используют гипосенсибилизацию, хотя её труднее проводить, чем при ГНТ. В основе механизма гипосенсибилизации при ГЗТ лежит возрастание активности Т-супрессоров. При трансплантации тканей ГЗТ снижают путем воздействия ионизирующего облучения, или иммунодепрессантов.

Примером аллергической реакции клеточного типа может служить проба на внутрикожное введение аллергена – туберкулина – в инфицированный или вакцинированный организм. На месте введения туберкулина через 24–48 часов образуется мононуклеарный инфильтрат, величина которого зависит от степени сенсибилизации. Состояние ГЗТ можно также определить в реакциях (РБТЛ) бласттрансформации и РТМЛ (торможения миграции лейкоцитов).

### **Методические рекомендации к выполнению практической работы**

1. Постановка опыта анафилактического шока на сенсибилизированной морской свинке. Ввести сенсибилизированной морской свинке внутрисердечно 1 мл лошадиной сыворотки, наблюдать картину шока.

Павшую свинку зафиксировать и вскрыть. Обратить внимание на раздутые легкие, сокращающееся сердце, несвернувшуюся кровь во вскрытом сердце, перистальтику кишечника.

2. Постановка внутрикожных аллергических проб.

### **Демонстрация**

1. Иммунобиологические препараты: сыворотка лошадиная, крупного рогатого скота во флаконах для сенсibilизации морских свинок; антигены для кожно-аллергических проб (туберкулин, бруцеллин, антраксин, тулярин); антитоксические сыворотки (противостолбнячная, противоботулинические, противогангренозные, противодифтерийная).

2. Таблицы, схемы.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Понятие об аллергии. Типы аллергических реакций, формы их проявления.

2. Состояние сенсibilизации и механизм формирования.

3. Виды аллергенов.

4. Гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ): гуморальный механизм развития, факторы, виды.

5. Анафилаксия, механизм развития. Клиническая картина анафилаксии у животных и человека.

6. Десенсibilизация. Метод Безредки.

7. Что такое атопии? Атопические болезни.

8. Сывороточная болезнь, проявление, механизм развития, профилактика.

9. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ): механизм развития, факторы, виды (инфекционная, контактная, лекарственная).

10. Механизм инфекционной аллергии, в основе которой лежит ГЗТ.

11. Методы выявления инфекционной аллергии *in vivo* – аллергические пробы и *in vitro* – реакция бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ), реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ).

# Тема: ИММУНОПРОФИЛАКТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

## План

1. Иммунобиологические препараты: их классификация, области применения.
2. Биопрепараты для лечения профилактики:
  - а) вакцины;
  - б) сыворотки и иммуноглобулины;
  - в) моноклональные антитела;
  - г) аллергены для аллергических проб.

## Учебный материал

Под иммунопрофилактикой понимают воздействие на систему иммунитета с целью предупреждения инфекционного заболевания или другого патологического процесса (например, при иммунодефицитах), в котором участвует иммунная система. Иммунотерапия направлена на прекращение инфекционного или другого патологического процесса путем воздействия на иммунную систему или замещения ее функций (с помощью введения готовых антител).

По механизму действия различают активную иммунопрофилактику и иммунотерапию, когда вводят антигены (вакцины), иногда иммуномодуляторы, а иммунная система активно отвечает на введенный препарат, пассивную иммунопрофилактику и иммунотерапию, которая заключается во введении в организм готовых защитных факторов – антител в виде иммунных сывороток или иммуноглобулинов.

В основном иммунопрофилактика и иммунотерапия оказывают стимулирующее действие на иммунную систему, но иногда применяют и подавляющие препараты для угнетения иммунных реакций (например, при аллергии и аутоиммунных заболеваниях, при трансплантационном иммунитете). Чаще для этой цели применяют *иммуномодуляторы* – вещества химической или биологической природы, способные модулировать (угнетать, стимули-

ровать) или регулировать иммунные реакции, воздействуя на иммунокомпетентные клетки и другие иммунные процессы.

**Вакцины** – биологические препараты, изготавливаемые из живых аттенуированных или инактивированных микробов, токсинов, микробных антигенов и используемые для создания искусственного специфического активного иммунитета. В основном вакцины применяют с профилактической целью, значительно реже с лечебной (при хронических, затяжных инфекционных заболеваниях).

Подразделение вакцин:

- **Живые вакцины:** из аттенуированных, авирулентных штаммов или вариантов апатогенного вида микробов (из так называемых «вакцинных штаммов»).
- **Инактивированные вакцины:**
  - а) *корпускулярные* (цельноклеточные и цельновирионные) из целостных микробов, инактивированных физическими или химическими факторами;
  - б) *химические* из наиболее активных антигенных компонентов, извлеченных из микробных клеток или вирионов с помощью различных физико-химических методик;
  - в) *анатоксины* из бактериальных экзотоксинов, обезвреженных длительным воздействием формалина при повышенной температуре.
- **Генно-инженерные вакцины**, получаемые путем встраивания генов, контролирующих синтез нужных антигенных детерминант, в геном других непатогенных микробов.

Основные требования к вакцинным препаратам: высокая иммуногенность и остаточная вирулентность для аттенуированных штаммов, безвредность, ареактивность (отсутствие выраженных побочных реакций), гипоаллергенность (минимальное сенсибилизирующее действие).

Многие современные вакцины отвечают этим требованиям не полностью, поэтому продолжается исследовательская работа по их совершенствованию и созданию принципиально новых вакцинных препаратов.

*Живые вакцины* готовят из вакцинных штаммов бактерий, риккетсий, вирусов, полученных различными методами селекции.

Вакцинным штаммам присуща способность «приживаться» в организме человека или животного. При введении биопрепарата аттенуированные микробы благодаря сохранению остаточной вирулентности размножаются на месте введения, проникают в лимфоузлы, попадают во внутреннюю среду организма. Возникает «вакцинная инфекция», по завершении которой организм приобретает иммунитет, по своей напряженности приближающийся к постинфекционному иммунитету.

К преимуществам живых вакцин относятся высокая иммуногенность (и как следствие, длительное сохранение иммунитета), простота способа введения (как правило, однократное накожно, через рот, в аэрозоле). В то же время, живые вакцины очень чувствительны к нарушению режима хранения. После вакцинации не исключено развитие тяжелых осложнений (например, энцефалитов), есть опасность реверсии вакцинного штамма в вирулентный, поэтому необходим постоянный контроль.

Живые вакцины применяются:

- против бактериальных инфекций – туберкулезная ВСГ, сибиреязвенная СТИ, чумная EV, туляремийная Гайского – Эльберта, бруцеллезная ВА-19; против вирусных инфекций: полиомиелитная, гриппозная, коревая, паротитная, против гепатита В, желтой лихорадки;
- против риккетсиозов – против Ку-лихорадки М-44 и сыпного тифа ЖКСВ-Е.

Подавляющее большинство живых вакцин выпускают в сухом виде лиофильно высушенными с добавлением различных стабилизаторов (например, в желатино-сахарозной среде), что способствует сохранению жизнеспособности вакцинного штамма.

Некоторые примеры живых вакцин:

- Вакцина туберкулезная ВСГ из вакцинного штамма, полученного Кальметтом и Гереном путем 13-летнего пассирования туберкулезных бактерий бычьего типа (*Mycobacterium bovis*) на глицериново-картофельной среде с добавлением желчи. Вакцинный штамм является делеционным мутантом, лишенным воска D. Вакцина D выпускается для внутрикож-

ного применения, содержит аттенуированный штамм микобактерий (БЦЖ-1), лиофильно высушенный в 1,5%-м растворе натрия глютамината.

- Вакцина сибиреязвенная СТИ (Гинзбург, Тамарин) получена методом селекции из споровой культуры безкапсульных вариантов *Bacillus anthracis*, выращенных на сывороточной среде. Вакцина выпускается для накожного (скарификационного) и подкожного применения и содержит споры аттенуированного бескапсульного штамма СТИ 1 в лиофилизированном виде.
- Вакцина гриппозная аллантоисная очищенная живая сухая (Жданов и др.) из вакцинных штаммов вирусов гриппа, аттенуированных путем пассажей на куриных эмбрионах. Вакцину получают из вируссодержащей аллантоисной жидкости куриного эмбриона, очищенной методом ультрацентрифугирования. Лيوфилизованная вакцина выпускается в виде монопрепаратов, содержащих вакцинные штаммы вирусов гриппа А (Н1N1), А (Н3N2) и В, вводится интраназально.

*Инактивированные вакцины* содержат микробные клетки или вирионы (корпускулярные и вирионные вакцины), извлеченные из них антигенные компоненты (химические вакцины) или обезвреженные экзотоксины (анатоксины). Для приготовления инактивированных вакцин используют, как правило, вирулентные микробы с полноценными антигенными свойствами, которые должны сохраниться после инактивирующего воздействия (нагреванием, УФ-светом, различными химическими веществами спиртом, формалином, фенолом и др.).

Инактивированные вакцины создают менее напряженный иммунитет, чем живые вакцины, требуется их 2–3-кратное введение, проведение повторных курсов иммунизации. Для увеличения иммуногенности в химические вакцины и анатоксины часто добавляют вещества-адьюванты – гидроксид алюминия, фосфат алюминия, полисахариды и др. Адьюванты создают «депо» антигена на месте введения, способствуют его более длительному сохранению в организме и более интенсивному антигенному воздействию; вакцины с адьювантами называются адсорбированными.

### **Примеры инактивированных корпускулярных вакцин, применяемых для профилактики инфекционных заболеваний:**

- брюшнотифозная спиртовая сухая вакцина;
- холерная корпускулярная инактивированная вакцина сухая из убитых нагреванием или формалином холерных вибрионов (сероваров Огава и Инаба);
- вакцина синегнойная поливалентная корпускулярная инактивированная жидкая из 7 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* наиболее распространенных серогрупп, инактивированных эктерицидом;
- вакцина лептоспирозная жидкая взвесь убитых нагреванием культур лептоспир нескольких серогрупп;
- вакцина антирабическая (против бешенства) культуральная инактивированная сухая из вакцинного штамма Внуково 32, выращенного в культуре клеток, инактивированного УФ-светом и очищенного;
- вакцина гриппозная инактивированная жидкая из вирусов гриппа А (H1N1), А(H3N2) и В, выращенных на куриных эмбрионах, инактивированных формалином и УФ-светом, очищенная ультрацентрифугированием;
- вакцина против клещевого энцефалита культуральная инактивированная сухая из очищенной взвеси вируса в культуральной жидкости, зараженной вирусом (штамм «Софьин» или «205») культуры клеток; инактивирована формалином, лиофильно высушена.

### **Инактивированные корпускулярные вакцины, применяемые для иммунотерапии:**

- вакцина бруцеллезная лечебная жидкая из взвеси бруцелл (*Brucella melitensis* и *B. abortus*), убитых нагреванием; вакцина гонококковая инактивированная из 12 свежевыделенных штаммов от больных с разными клиническими формами гонореи;
- вакцина дизентерийная спиртовая Флекснера – Зонне, сухая;
- вакцина стафилококковая инактивированная взвесь из нескольких штаммов стафилококков, консервант фенол;

- герпетическая инактивированная сухая вакцина из вирусов герпеса простого типов I и II, выращенных в культуре фибробластов куриного эмбриона; инактивирована формалином, лиофилизирована.

**Инактивированные вакцины для лечения** иногда готовят из штаммов возбудителей, выделенных от больных, так называемые аутовакцины (например, при стафилококковых инфекциях, гонорее).

*Химические вакцины* содержат антигенные комплексы микробов, в значительной степени очищенные от балластных веществ (иногда их называют субклеточными или субвирионными). Они менее токсичны, чем корпускулярные вакцины (цельноклеточные или цельновирионные), обладают меньшими аллергизирующими свойствами.

Примеры химических вакцин:

- вакцина брюшнотифозная Vi полисахаридная жидкая (вводится совместно с брюшнотифозной спиртовой корпускулярной вакциной или в виде самостоятельной вакцины);
- вакцина менингококковая групп А и С полисахаридная сухая из очищенных капсульных специфических полисахаридов менингококка;
- вакцина сыпнотифозная химическая сухая очищенная и концентрированная иммуногенная субстанция растворимого антигена риккетсий Провацека;
- вакцина стафилококковая сухая для иммунотерапии содержит комплекс антигенов, извлеченных из инактивированных клеток стафилококков;
- О-антиген (сухая и жидкая) из надосадочной жидкости бульонной культуры холерного вибриона (серовар Инаба), инактивированная формалином;
- вакцина гриппозная тривалентная полимер-субъединичная жидкая – высокоочищенный препарат, содержащий только поверхностные антигены вируса гриппа (гемагглютинин и нейраминидазу) трех подтипов. В состав вакцины входит полимерный иммуностимулятор полиоксидоний, обеспечи-

вающий повышение иммуногенности и большую стабильность антигенов.

Вакцины-анатоксины получают из бактериальных экзотоксинов путем 3–5-недельного воздействия формалина (0,3–0,4 %) при температуре 37–40 °С. При совместном действии этих факторов экзотоксин теряет свою ядовитость, сохраняя антигенные и иммуногенные свойства. Полученные анатоксины подвергают очистке от балластных веществ и сорбируют на гидроксиде алюминия. Очищенные адсорбированные анатоксины выпускают в жидком виде. Их применяют для создания антитоксического иммунитета против таких инфекций, как дифтерия, столбняк, газовая анаэробная инфекция, стафилококковая инфекция и другие, возбудители которых выделяют экзотоксины, играющие первостепенную роль в патогенезе заболеваний.

Примеры анатоксинов:

- дифтерийный очищенный адсорбированный анатоксин (АД-анатоксин);
- столбнячный очищенный адсорбированный анатоксин (АС-анатоксин);
- адсорбированный дифтерийно столбнячный анатоксин (АДС-анатоксин);
- анатоксины дифтерийный, столбнячный очищенные, адсорбированные с уменьшенным содержанием антигенов, жидкие (АД-М, АГ-М, АДС-М);
- стафилококковый анатоксин нативный и очищенный адсорбированный;
- анатоксин синегнойной палочки адсорбированный жидкий;
- трианатоксин очищенный адсорбированный (смесь очищенных бутулинических анатоксинов типов А, В и Е, сорбированных на гидроксиде алюминия).

*Ассоциированные вакцины* представляют собой сочетание различных типов вакцин и предназначены для одновременной иммунизации против разных инфекций. Они могут состоять из однородных препаратов (например, нескольких анатоксинов) или из различных типов вакцин.

Компоненты ассоциированных вакцин должны быть взяты в дозировках, не создающих конкуренции, чтобы иммунитет формировался ко всем антигенам.

Примеры ассоциированных вакцин:

- вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина) состоит из взвеси убитых коклюшных бактерий (*Bordetella pertussis*) и очищенного дифтерийного и столбнячного анатоксинов, сорбированных на гидрооксиде алюминия;
- вакцина коревая краснушная паротитная живая сухая (КПК);
- вакцина поликомпонентная из антигенов условно-патогенных микроорганизмов сухая для иммунотерапии (в состав вакцины входят антигены, извлеченные из стафилококков, клебсиелл, протей и кишечной палочки).

*Генно-инженерные вакцины.* Получение вакцин с использованием методов генетической инженерии новый перспективный путь создания усовершенствованных биопрепаратов.

Основной принцип получения таких вакцин – встраивание микробных генов, контролирующих синтез определенных антигенных детерминант, в геном других легко культивируемых клеток (например, в дрожжевые клетки, *E. coli*) и экспрессия этих генов, ведущая к накоплению нужных антигенных компонентов в больших количествах.

Подобная вакцина создана для профилактики вирусного гепатита В: вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая жидкая содержит сорбированный на гидрооксиде алюминия поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs-антиген), выделенный из рекомбинантного штамма – продуцента *Saccharomyces cerevisiae*.

Другой вариант – получение векторных вакцин (например, на основе осповакцины), когда в вакцинный штамм включается ген, контролирующий образование антигенных детерминант других возбудителей. При вакцинации такой рекомбинантной вакциной создается иммунитет против двух инфекций. Например, получена рекомбинантная осповакцина с антигенами вируса бешенства, клещевого энцефалита и др.

В стадии разработки находятся методы получения полусинтетических и синтетических вакцин, а также вакцин на основе антиидиотипических антител.

**Инфекционные аллергены** – применяют для диагностики инфекционных заболеваний путем постановки кожноаллергических проб. Это биопрепараты, содержащие антигены возбудителей и предназначенные для выявления состояния гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), которое возникает при многих инфекционных заболеваниях.

При постановке кожноаллергических проб (обычно на внутренней поверхности предплечья) аллерген вводят внутрикожно с помощью шприца или накожно путем втирания в скарифицированный участок кожи. Через 24–48–72 часа на месте введения возникает воспалительная реакция с покраснением, образованием инфильтрата. Положительной считается интенсивная реакция с определенным размером инфильтрата для каждого аллергена.

Аллергические пробы обладают специфичностью, но нередко бывают положительными у переболевших и привитых.

Аллергены, используемые в диагностике инфекционных заболеваний, это стандартные препараты, выпускаемые промышленностью. Их готовят из очищенных фильтратов бульонных культур возбудителей (или вакцинных штаммов), иногда из взвесей убитых бактерий или из выделенных из них антигенов, белковых фракций.

Примеры инфекционных аллергенов:

- туберкулин PPD (Purified protein derivative) сухой очищенный белок микобактерий туберкулеза;
- альт-туберкулин Коха концентрированный фильтрат бульонной культуры микобактерий туберкулеза (сгущенный до 1/10 объема) только для накожной пробы;
- бруцеллин аллерген бруцеллезный жидкий для внутрикожного применения раствор полисахаридно-белкового комплекса, полученный из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 VA путем уксуснокислого гидролиза;
- антраксин аллерген сибиреязвенный жидкий для внутрикожной пробы из вегетативных клеток сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ, освобожденных от балластных белков и подвергнутых слабому кислотному гидролизу;

- тулярин аллерген туляремийный жидкий для внутривенной пробы – взвесь убитых нагреванием бактерий туляремийного вакцинного штамма;
- актинолизат фильтрат бульонной культуры лизированных штаммов актиномицет.

**Диагностические сыворотки.** Иммунные сыворотки содержат известные антитела к микробам, токсинам, другим антигенам. В зависимости от того, каким антигеном была проведена иммунизация, они подразделяются на диагностические и лечебно-профилактические сыворотки;

*Диагностические сыворотки* содержат известные антитела, их используют в серологических реакциях с целью определения (идентификации) выделенного из организма возбудителя инфекционного заболевания или его токсина, а также для определения неизвестных антигенов непосредственно в исследуемом материале из организма больного (в крови, спинномозговой жидкости, моче и др.).

Диагностические сыворотки обычно получают путем многократной иммунизации кроликов (иногда и других животных) различными антигенами, взвесью микробов, токсинами, анатоксинами, чужеродными сывороточными белками и другими растворимыми антигенами.

Диагностические сыворотки выпускают в ампулах, они бывают жидкими и лиофильно высушенными. Кроме нативных сывороток готовят иммуноглобулины, концентрированные препараты антител с различными метками (флюоресцентными, ферментными, изотопными для радиоиммунного анализа).

Диагностические сыворотки подразделяются на агглютинирующие, преципитирующие, гемолитические, антитоксические и другие в зависимости от серологической реакции, в которой они участвуют.

*Агглютинирующие сыворотки* выпускаются в виде нативных, неадсорбированных и адсорбированных по методу Каstellани. Неадсорбированные (видовые) сыворотки обладают высоким титром (1:25000 и выше), но недостаточно специфичны. Видовые сыворотки содержат несколько антител, соответственно набору антигенов у бактериальных клеток, которыми проводилась иммунизация. Среди этих антигенов могут быть групповые общие с антиге-

нами других, родственных видов бактерий. Поэтому иммунная видовая сыворотка может содержать групповые антитела, за счет которых она будет давать агглютинацию не только с гомологичными бактериями (которыми проводилась иммунизация), но и с гетерологичными родственными бактериями, имеющими общие групповые антигены.

Групповая агглютинация наблюдается как в реакции агглютинации на стекле, так и при постановке развернутой реакции агглютинации в пробирках (в последнем случае она бывает положительной с меньшими разведениями сыворотки, чем специфическая реакция агглютинации с гомологичным антигеном). Особенно часто групповая агглютинация встречается у представителей рода *Salmonella*, к которым относятся возбудители брюшного тифа (*Salmonella typhi*) и паратифа В (*Salmonella paratyphi B*). Чтобы избежать групповой агглютинации, из нативных видовых сывороток получают адсорбированные монорецепторные сыворотки, пользуясь методом адсорбции антител по Каstellани. Для этой цели к видовой иммунной сыворотке добавляют густую взвесь гетерологичных родственных бактерий, содержащих такие групповые антигены, антитела против которых требуется извлечь из сыворотки. После инкубирования в термостате сыворотку центрифугируют, в результате чего образовавшиеся комплексы между групповыми антигенами и антителами оказываются в осадке и удаляются, а в жидкой части сыворотки остаются специфические антитела (к рецепторам обычно одной специфичности). Такая сыворотка называется монорецепторной адсорбированной агглютинирующей сывороткой. Адсорбированные сыворотки характеризуются строгой специфичностью, титры их обычно низкие (1:40–1:320), их применяют в реакции агглютинации на стекле, причем результат реакции считается окончательным (а не ориентировочным, как при реакции агглютинации на стекле с видовой неадсорбированной сывороткой)

**Диагностикумы** – взвеси обезвреженных микроорганизмов или полученные из них растворимые антигены, используемые в качестве известных антигенов при постановке серологических реакций с целью выявления специфических антител в исследуемых сыворотках. Корпускулярные диагностикумы – это стандартные препараты с определенным содержанием микробных тел, они

длительно сохраняются и не представляют опасности для заражения. Такие диагностикумы получают из штаммов микробов с типичными свойствами, инактивированных нагреванием или, что чаще, воздействием различных химических веществ – формалина, фенола, этилового спирта, глицерина и др.

Бывают диагностикумы с полным набором антигенов микробной клетки и содержащие некоторые антигены (О-, Н-, Vi – брюшнотифозные диагностикумы), а также монодиагностикумы, у которых имеются антигенные детерминанты одной специфичности (сальмонеллезные Н – диагностикумы: «а», «в», «с», «д» и др.).

Широко применяются эритроцитарные диагностикумы, приготовленные из формализованных эритроцитов с сорбированными на них растворенными антигенами различных микробов – это эритроцитарные антигенные диагностикумы. Существуют и антительные эритроцитарные диагностикумы с сорбированными на эритроцитах иммуноглобулинами (они выполняют функцию известных антител и используются для идентификации испытуемых антигенов). Носителями антигенов могут быть частицы латекса (латекс-диагностикумы) и другие инертные вещества.

Диагностикумы могут быть растворимыми и содержать дезинтегрированные микробы, тогда их обычно называют антигенами (например, специфический антиген из бледных трепонем, разрушенных ультразвуком). При получении растворимых антигенов применяют экстракцию, обработку ферментами, детергентами и другие воздействия, разрушающие микроорганизмы.

Диагностикумы (антигены) готовят из многих возбудителей кишечных инфекций, бруцелл, гонококков, туляреминых, коклюшных бактерий, хламидий, микоплазм, риккетсий и вирусов. Они участвуют в реакциях агглютинации, непрямой гемагглютинации, реакции связывания комплемента, реакции нейтрализации, иммуноферментном анализе, с помощью которых выявляют специфические антитела в исследуемых сыворотках людей и животных.

Некоторые примеры диагностикумов:

- паратифозный В диагностикум;
- брюшнотифозный Н-диагностикум;
- брюшнотифозный О-диагностикум;
- эритроцитарный брюшнотифозный Vi-диагностикум.

**Лечебно-профилактические сыворотки** применяют для лечения (серотерапии) или экстренной профилактики многих инфекционных заболеваний. При этом создается искусственный пассивный иммунитет, который возникает через несколько часов после введения иммунной сыворотки и исчезает через 2–3 недели. Поэтому серопротекцию проводят только при непосредственной угрозе возникновения заболевания, особенно у детей.

Лечебно-профилактические сыворотки подразделяются на антитоксические и антимикробные, последние делятся на антибактериальные и противовирусные. Сыворотки получают путем гипериммунизации, т. е. многократной интенсивной иммунизации крупных животных, чаще всего лошадей (от которых можно получить много крови для изготовления сыворотки) соответствующими антигенами-анатоксинами, бактериями, вирусами. Сыворотки, полученные от животных, для человека являются гетерологичными. Существуют и гомологичные сыворотки, получаемые от людей-доноров или из плацентарной крови (введенные в организм, они сохраняются в течение 4–5 недель).

Наибольшее практическое значение имеют антитоксические сыворотки, так как они являются единственным специфическим средством, способным нейтрализовать токсическое действие экзотоксинов в организме больного. Особенно эффективно раннее введение сыворотки, так как антитоксин способен нейтрализовать токсин, не связавшийся с клеткой-мишенью.

Антитоксические сыворотки, полученные из крови лошадей, гипериммунизированных соответствующим анатоксином, подвергают концентрации и очистке методом «Диаферм», который включает высаливание альбуминов сернокислым аммонием, ферментативное расщепление неиммунных глобулинов и диализ. Полученную сыворотку титруют (обычно используя реакцию флоккуляции) для определения ее антитоксической активности, измеряемой в международных единицах (МЕ).

Антибактериальные сыворотки с развитием антибиотикотерапии почти утратили свое значение и применяются редко, при немногих инфекционных заболеваниях (например, при чуме, сибирской язве).

Противовирусные сыворотки оказывают хороший эффект при раннем введении в конце инкубационного периода и в первые дни болезни.

В настоящее время из нативных иммунных сывороток (гетерологичных и гомологичных) готовят более совершенные концентрированные и очищенные препараты – иммуноглобулины. Их получают методом спиртового осаждения на холоде и другими способами.

Существует нормальный донорский или плацентарный иммуноглобулин, получаемый от здоровых неиммунизированных людей, который содержит антитела различной специфичности, приобретенные взрослыми людьми в течение жизни. Его применяют для терапии и экстренной профилактики кори, гепатита, коклюша, менингококковой инфекции и др.

Готовят также иммуноглобулины направленного действия, получаемые из сыворотки крови специально иммунизированных доноров. Эти препараты содержат высокий титр антител к соответствующему возбудителю и являются весьма эффективными при экстренной профилактике и терапии гриппа, клещевого энцефалита, стафилококковой инфекции, столбняка и др. (таблица 6).

Таблица 6 – Примеры типов сывороток и иммуноглобулинов

Антитоксические иммуноглобулины (гомологичные)	Альфа-антитоксический, противостолбнячный
Антибактериальные иммуноглобулины (гетерологичные)	Противосибирязевный, противочумный, лептоспирозный
Антивирусные иммуноглобулины (гетерологичные)	Антирабический против клещевого энцефалита
Антивирусные иммуноглобулины (гомологичные)	Иммуноглобулин нормальный, человеческий (противокоревой гаммаглобулин, антирабический, противогриппозный); иммуноглобулин, титрованный на антитела к вирусу клещевого энцефалита (от переболевших людей)

*Примечание.* Предпочтительнее пользоваться гомологичными сывороточными препаратами, так как введение сыворотки животных, даже предварительно очищенной, нередко вызывает осложнения, обычно

в виде сывороточной болезни (развивается гиперчувствительность немедленного типа). Во избежание этого, сыворотку необходимо вводить по методу Безредки.

**Моноклональные антитела** – это высокоспецифичные антитела, продуцируемые одним клоном антителообразующих клеток. Они однородны по своему составу и способны связываться только с одной детерминантой группой (эпитопом) антигена.

Этим они выгодно отличаются от менее специфичных и неоднородных антител, получаемых путем иммунизации антигенами животных. Неоднородность иммунных сывороток зависит от характера антигена, от уровня иммунного ответа экспериментального животного, отличающегося у разных особей, и от того, что введенный антиген активирует различные клоны В-клеток, каждый из которых вырабатывает антитела с индивидуальными отличиями. В итоге полученная поликлональная сыворотка представляет собой смесь антител различных классов, отличающихся по специфичности и аффинности. (Аффинность – сила связывания активного центра антитела с антигенной детерминантой, зависящая от степени их сродства). Приготовление адсорбированных сывороток – сложный многоэтапный процесс, не устраняющий полностью эти недостатки.

Моноклональные антитела получают с помощью специальной гибридомной технологии, позволяющей нарабатывать их в неограниченном количестве. Для этой цели из селезенки иммунизированных определенным антигеном мышей выделяют антителообразующие клетки В-лимфоциты (короткоживущие). Соединяют эти В-лимфоциты с миеломными клетками, которые были выделены из мышинной опухоли и обладают способностью к непрерывному размножению в культуре клеток (но не способны вырабатывать антитела). Проводят слияние В-лимфоцитов и миеломных клеток, воздействуя полиэтиленгликолем, и получают гибридные клетки – гибридомы, обладающие свойствами обеих родительских клеток: способностью к антителообразованию и к непрерывному делению. Клетки-гибридомы культивируют в специальной среде (где не могут размножаться исходные, негибридные клетки) и производят клонирование, т. е. получают различные клоны клеток путем размножения из одной исходной гибридомной антителообразующей

клетки. Каждый клон содержит однородные гибридные клетки способные продуцировать идентичные антитела одной специфичности способные и связываться с единственной антигенной детерминантой, т. е. моноклональные антитела.

Обычно к вирусному, микробному и другим антигенам получают несколько моноклональных антител (так называемая панель моноклональных антител) к разным антигенным детерминантам исследуемого антигена. Кроме того, для серологической идентификации возбудителя получены моноклональные антитела к групповым, видовым, типовым антигенам. Широкое применение моноклональные антитела нашли в следующих серологических методах: иммуноферментном, иммунофлюоресцентном, радиоиммунологическом, иммуноблоттинге. Моноклональные антитела используют в диагностике многих вирусных, бактериальных инфекций и др.

В настоящее время разрабатываются методы, применения моноклональных антител для иммунотерапии и иммунопрофилактики. Основная трудность в получении человеческих гибридом (подавляющее число гибридом было получено на основе слияния клеток мышей или крыс), а также в наличии проблем, связанных с очисткой моноклональных антител от балластных веществ.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Что такое вакцины? Какие требования предъявляют к вакцинным препаратам?
2. Классификация вакцин, краткая характеристика каждого типа.
3. Какой принцип заложен в основу получения живых вакцин, какой ученый его предложил?
4. Что такое аттенуированный штамм, каким требованиям он должен отвечать, как взаимодействует с макроорганизмом?
5. Перечислите живые вакцины:
  - а) против бактериальных инфекций и риккетсиозов;
  - б) против вирусных инфекций.
6. Что представляет собой вакцина БЦЖ? Как получена живая гриппозная вакцина?

7. Преимущества и недостатки живых вакцин по сравнению с убитыми.

8. Что такое инактивированные вакцины, как их подразделяют?

9. Охарактеризуйте инактивированные корпускулярные вакцины, способы их инактивирования, приведите примеры.

10. Что представляют собой химические вакцины? Приведите примеры.

11. В каких случаях вакцины применяют для иммунотерапии, приведите примеры таких вакцин. Что такое, аутовакцины?

12. Что представляют собой анатоксины? Их получение, применение, примеры.

13. Генно-инженерные вакцины, принципы получения, пример такой вакцины.

14. Инфекционные аллергены, принцип их использования в диагностике инфекционных заболеваний.

15. Назовите и охарактеризуйте инфекционные аллергены, применяемые для постановки кожных проб (3–4 примера).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Борисов Л.Б.* Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л.Б. Борисов. – М., 1979.
2. *Борисов Л.Б.* Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Л.Б. Борисов. – М., 2005.
3. *Воробьев А.А.* Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / А.А. Воробьев. – М., 2004. – 690 с.
4. *Зверев В.В.* Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / В.В. Зверев, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.
5. *Зверев В.В.* Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / В.В. Зверев, А.С. Быков. – М.: Изд-во «Медицинское информированное агенство», 2016. – 815 с.
6. *Лабинская А.С.* Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология / А.С. Лабинская, Е.Г. Волина. – М.: Изд-во БИНОМ, 2008. – 1080 с.
7. *Лебедев М.Н.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии / М.Н. Лебедев. – М., 1977.
8. *Царев В.Н.* Основы микробиологии и дезинфектологии / В.Н. Царев. – М., 2016.

Под редакцией  
**Г.К. Садыбакасовой**, д-ра мед. наук, профессора

Составители:  
**Фирюза Сагитовна Мустафина,**  
**Марина Александровна Сабодаха,**  
**Галина Рауфовна Бестужева,**  
**Гулай Курманбековна Садыбакасова**

## ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие  
к практическим занятиям

Редактор *Н.В. Шумкина*  
Компьютерная верстка *Д. Иванова*

Подписано в печать 23.05.2023.  
Печать офсетная. Формат 60×84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Объем 16,5 п. л. Тираж 100 экз. Заказ 51.

Издательство КРСУ  
720000, г. Бишкек, ул. Киевская, 44.

Отпечатано в типографии КРСУ  
720048, г. Бишкек, ул. Анкара, 2а.