СРЕДНЕЕ
ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ
ОБРАЗОВАНИЕ

В.Б. Сбойчаков, А.В. Москалев, М.М. Карапац, Л.И. Клецко

ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ

Рекомендовано
Экспертным советом УМО в системе ВО и СПО
в качестве **учебника** для студентов,
обучающихся по укрупненным группам специальностей
«Здравоохранение и медицинские науки»

Рекомендовано для освоения профессий
из списка ТОП-50 наиболее востребованных на рынке труда,
новых и перспективных профессий

BOOK.ru
ЭЛЕКТРОННО-БИБЛИОТЕЧНАЯ СИСТЕМА
КНОРУС • МОСКВА • 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Раздел I.
ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 1. ВВЕДЕНИЕ В КУРС «МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ» 8

1.1. Предмет, цель и задачи курса «Медицинская микробиология, вирусология и иммунология» 8
1.2. История развития микробиологии, вирусологии и иммунологии 9
1.3. Принципы классификации микроорганизмов 13
1.4. Устройство микробиологических лабораторий 19
Учебно-методические материалы 23
Вопросы и задания для предварительного изучения 23

Глава 2. ОСНОВЫ МОРФОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ 24

2.1. Морфология бактерий 24
2.2. Грамположительные бактерии 35
2.3. Грамотрицательные бактерии 37
2.4. Методы микроскопии 38
2.5. Способы окраски 42
Учебно-методические материалы 46
Вопросы и задания для предварительного изучения 46

Глава 3. ФИЗИОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ 47

3.1. Химический состав бактериальной клетки. Ферменты бактерий. Питание, дыхание, рост и размножение бактерий 47
3.2. Особенности генетики бактерий 55

3.3. Питательные среды, их назначение, применение. Первичный посев и пересев. Условия культивирования бактерий ... 73
3.4. Выделение чистой культуры бактерий. Культуральные и биохимические свойства бактерий, их значение для дифференциации бактерий ... 78
Учебно-методические материалы ... 82
Вопросы и задания для предварительного изучения ... 82

Глава 4. УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИОННОМ И ЭПИДЕМИЧЕСКОМ ПРОЦЕССАХ. ИНФЕКЦИИ, СВЯЗАННЫЕ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ ... 83

4.1. Понятие об инфекции ... 83
4.2. Общая характеристика инфекционного процесса ... 86
4.3. Патогенные свойства микробов ... 87
4.4. Микроэкология человека ... 89
4.5. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи ... 95
Учебно-методические материалы ... 96
Вопросы и задания для предварительного изучения ... 96

Глава 5. УЧЕНИЕ ОБ ИММУНИТЕТЕ. ИММУННАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА ... 97

5.1. Роль иммунной системы в защите человека от инфекций ... 97
5.2. Строение иммунной системы ... 99
5.3. Т-система иммунитета ... 103
5.4. В-система иммунитета ... 104
5.5. Цитокины ... 104
5.6. Система интерферонов ... 109
5.7. Клеточные антигеннеспецифические факторы ... 111
5.8. Структура антител и их функции ... 119
5.9. Аллергия ... 132
Учебно-методические материалы ... 148
Вопросы и задания для предварительного изучения ... 148

Глава 6. ОСНОВЫ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ И ИММУНОТЕРАПИИ ... 149

6.1. Основы иммунопрофилактики ... 149
6.2. Основы иммунотерапии ... 162
6.3. Методы иммунодиагностики ... 166
Учебно-методические материалы ... 176
Вопросы и задания для предварительного изучения ... 176


СПО
BOOK.ru
УЧЕБНИК
В.Б. Сбойчаков, А.В. Москалев, М.М. Карапац, Л.И. Клецко
ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ
СООТВЕТСТВУЕТ ФГОС СПО 3+
КНОРУС

10.3. Морфология и биохимия вирусов 227
10.4. Бактериофаги 234
10.5. Методы вирусологических исследований 237
10.6. ВИЧ-инфекция 252
Учебно-методические материалы 256
Вопросы и задания для предварительного изучения 256

Раздел IV
КЛИНИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 11. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ, СБОР, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ 258
11.1. Определение термина «клиническая микробиология» 258
11.2. Отбор материалов для микробиологического исследования (преаналитический этап) 259

ЛИТЕРАТУРА 272

10.3. Морфология и биохимия вирусов 227
10.4. Бактериофаги 234
10.5. Методы вирусологических исследований 237
10.6. ВИЧ-инфекция 252
Учебно-методические материалы 256
Вопросы и задания для предварительного изучения 256

Раздел IV
КЛИНИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 11. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ, СБОР, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ 258
11.1. Определение термина «клиническая микробиология» 258
11.2. Отбор материалов для микробиологического исследования (преаналитический этап) 259

ЛИТЕРАТУРА 272

Глава 1

ВВЕДЕНИЕ В КУРС «МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ»

Студент должен знать: классификацию микроорганизмов, их морфологию, организацию микробиологической службы в Российской Федерации.

Ключевые слова и термины: бактерии. Вирусы. Прионы. Микробиология. Вирусология. Иммунология. Клеточная стенка, капсула, жгутики. Споры. Цитоплазма. Нуклеоид.

1.1. ПРЕДМЕТ, ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ КУРСА «МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ»

Микробиология — наука, изучающая мельчайшие на нашей планете существа — микробы. Название этой науки происходит от древнегреческих слов «микрос» — малый, «биос» — жизнь и «логос» — наука. Одним словом, микробиология — это наука, которая изучает живые объекты, невидимые человеческому глазу.

Итак, *объектом* медицинской микробиологии являются микробы, а *предметом* изучения являются те свойства микробов, которые тем или иным образом влияют на организм человека. *Цель* курса «Медицинская микробиология, вирусология и иммунология» состоит в изучении жизнедеятельности микробов с медицинской точки зрения.

Задачи курса «Медицинская микробиология, вирусология и иммунология» — изучить:

- физиологию и морфологию бактерий, грибов и вирусов;
- экологию бактерий, грибов и вирусов;
- учение об инфекционном и эпидемическом процессе;
- основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней.

1.2. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

Первым на планете Земля увидел микробы голландский ученый Антон ван Левенгук еще в XVIII в. (рис. 1.1).

Он сконструировал такой микроскоп, при помощи которого можно было различать мельчайшие объекты размерами в несколько микрометров, и увидел «живых зверьков». Однако Левенгук не смог понять, для чего существуют микробы и какова их роль в природе. Это смог сделать через столетие великий французский ученый Луи Пастер (рис. 1.2).

Именно он впервые выяснил роль микробов в природе и жизни человечества. В 1875 г. Пастер впервые показал, что процессы брожения и гниения обусловлены жизнедеятельностью микробов, а не химических веществ. Заслугой Пастера следует также считать доказательства анаэробного (без доступа воздуха) существования бактерий.

Он разработал метод прогревания пищевых продуктов при относительно высокой температуре (+60—90 °С), что позволило разрушить так называемые микробы порчи и сохранить вкусовые качества. Этот метод сейчас называется пастеризацией. Пастер пришел к революционному выводу, что болезни человека и животных также вызываются микробами. Он показал, что каждый микроб вызывает характерное, специфическое для него заболевание. Пастером были открыты возбудители куриной холеры, родильной горячки, остеомиелита и газовой гангрены.

В процессе изучения инфекционных болезней Пастер сделал еще одно величайшее открытие. Он открыл принцип и метод получения таких микробов, которые, теряя свою заразительность, стали обладать способностью при введении в организм предохранять его от последующего заражения, или создавать иммунитет. Таким образом, Пастер явился одним из первых биотехнологов и получил вакцины против сибирской язвы и бешенства.



Рис. 1.1. Антон ван Левенгук



Рис. 1.2. Луи Пастер

Прогресс в медицинской микробиологии связан также с именем выдающегося немецкого микробиолога Роберта Коха (рис. 1.3).

Серией чрезвычайно тщательно подготовленных экспериментов Кох доказал роль микробов в развитии туберкулеза, холеры и сибирской язвы. Кох известен как первооткрыватель плотных питательных сред. Разработанные Кохом методы выделения и культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях дали возможность его ученикам открыть ряд возбудителей инфекционных заболеваний. Не случайно конец XIX и начало XX вв. называют «золотым веком микробиологии».

К числу основоположников медицинской микробиологии следует отнести и русского ученого И.И. Мечникова, который создал новую эпоху в микробиологии — учение о защите организма от чужеродных веществ (инфекционная иммунология), помимо этого, И.И. Мечников — создатель одного из первых пробиотиков — «мечниковской простокваши». В 1909 году И.И. Мечникову была присуждена Нобелевская премия за открытие теории иммунитета. Его учениками были такие всемирно известные микробиологи, как Ж. Борде, А.М. Безредка, Л.А. Тарасевич, П.В. Циклинская, Д.К. Заболотный.



Рис. 1.3. Роберт Кох

Среди выдающихся деятелей отечественной микробиологии следует назвать имя Л.С. Ценковского, который на основе принципа аттенуации, разработанного Пастером, получил свой вариант вакцинного штамма возбудителя сибирской язвы, который до сих пор применяется для профилактики этого заболевания у животных. Именно

Л.С. Ценковский наметил основные направления изучения микроорганизмов в России. Он способствовал дифференциации микробиологии на ряд самостоятельных дисциплин: общую, медицинскую, ветеринарную, сельскохозяйственную, промышленную и т.д.

С.Н. Виноградский сыграл выдающуюся роль в становлении и развитии общей микробиологии и микроэкологии. Он разработал и внедрил в практику метод элективных культур, с помощью которого установил значение микроорганизмов в круговороте азота, серы, железа и углерода. С.Н. Виноградский воспитал плеяду выдающихся учеников, среди которых прежде всего следует выделить В.Л. Омелянского, работавшего в области общей и технической микробиологии.

В.Л. Омелянский — автор одного из первых в России руководства «Основы микробиологии». Он исследовал процесс распада клетчатки и экологию почвенных микроорганизмов.

Формированию и общему развитию микробиологии в России способствовали замечательные исследования Н.Ф. Гамалеи, который организовал первую в России Пастеровскую станцию. Ему принадлежат капитальные труды по изучению бешенства, холеры, туберкулеза. Н.Ф. Гамалея открыл и описал «мечниковский вибрион», названный так в честь именитого друга. Автор идеи создания химических вакцин. В честь Н.Ф. Гамалеи был назван научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии АМН.

Выдающимся микробиологом и эпидемиологом был Даниил Кириллович Заболотный, профессор, доктор медицины, академик АН СССР и АН УССР, который возглавлял ряд кафедр микробиологии в России. В 1903 году, задолго до открытия возбудителя сифилиса, он уже демонстрировал бледную трепонему в своих препаратах. В 1909 году Д.К. Заболотный блестяще защитил докторскую диссертацию «Сифилис, его патогенез и этиология». Блестящие научные изыскания выдвинули Д.К. Заболотного в число наиболее авторитетных сифилидологов мира. Впоследствии Д.К. Заболотный занимался проблемами опасных инфекций, он впервые доказал природную очаговость чумы и роль переносчиков.

Академиком Д.К. Заболотным была создана видная школа эпидемиологов и микробиологов (Л.В. Громашевский, В.Н. Космодамианский, П.Н. Кашкин).

В настоящее время благодаря высокому техническому оснащению ученые получили возможность детально изучать внутренние структуры микроорганизмов, вмешиваться в процессы их роста и размноже-

ния, использовать микроорганизмы в биотехнологических процессах. Выяснилось, что бактерии являются активными продуцентами антибиотиков и других биологически активных соединений — витаминов, аминокислот, стимуляторов роста. В последние годы интенсивно изучаются пробиотики (микроорганизмы, нормализующие микрофлору). Все это привело к созданию целой отрасли промышленности.

Создание электронного микроскопа сыграло роль в бурном развитии вирусологии. Генетика микроорганизмов обусловила рождение молекулярной биологии. Собственно говоря, современную микробиологию можно назвать молекулярной биологией. На модели бактерий была доказана роль ДНК в передаче наследственной информации. В настоящее время расшифрован геном почти всех бактерий. Выдающимся ученым-микробиологом, внесшим большой вклад в изучение генетики микроорганизмов, был В.Д. Тимаков.

Расшифровка этиологии ранее неизвестной болезни «Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка» была проведена в 60-е гг. XX в. военными микробиологами В.А. Знаменским, А.К. Вишняковым и А.М. Королюком. Обширные пионерские исследования по микробиологии неклостридиальной анаэробной инфекции выполнены В.И. Кочеровцом, который одним из первых в стране внедрил современную методику исследований при этой инфекции.

Профессор Е.П. Сиволодский является одним из выдающихся отечественных ученых в области создания и усовершенствования экспресс-методов микробиологических исследований. В ходе исследований Е.П. Сиволодского по изучению биохимии и систематики условно-патогенных энтеробактерий и псевдомонад были открыты их уникальные таксономические маркеры.

Бурное развитие претерпела иммунология, которая из раздела микробиологии превратилась в самостоятельную медико-биологическую науку. В конце XX в. были открыты возбудители новых, ранее неизвестных инфекций — возбудители СПИДа, вирусных гепатитов, легионеллеза, болезни Лайма. Наконец, были открыты прионы.

Современный этап развития микробиологии характеризуется созданием сети научно-исследовательских институтов микробиологического профиля и самостоятельных кафедр микробиологии в медицинских вузах. Основная заслуга отечественных микробиологов заключается в том, что они не только проводят научные изыскания, но и ведут обширную практическую работу, находясь непосредственно в очагах эпидемий. В настоящее время создана крупная научная школа отечественных микробиологов. Питомцы этой школы не толь-

ко успешно работают на ниве отечественного здравоохранения, но, к сожалению, успешно пополняют ряды американских и европейских ученых.

1.3. ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы — это невидимые невооруженным глазом представители всех царств жизни.

1. Эукариоты, или ядерные организмы (грибы, простейшие).

2. Прокариоты, или предъядерные организмы (эубактерии, архебактерии).

3. Акариоты (безъядерные организмы) — вирусы.

Их классификацию регламентируют соответствующие Международные комитеты по систематике. Классификация бактерий постоянно совершенствуется, что находит отражение в периодических изданиях «Определителя бактерий Берджи». По этой книге все известные бактерии отнесены к царству прокариотов и распределены по различиям в строении клеточной стенки на 4 отдела.

Отдел I. *Gracilicutes* (от лат. gracilis — изящный, тонкий и cutis — кожа): включает грамотрицательные бактерии.

Отдел II. *Firmicutes* (от лат. firmus — крепкий): включает грамположительные бактерии.

Отдел III. *Tenericutes* (от лат. tener — нежный): включает бактерии, лишенные клеточной стенки (микоплазмы и др.).

Отдел IV. *Mendosicutes* (от лат. mendosus — направленный): включает архебактерии, имеющие клеточную стенку особенного состава и строения.

Далее бактерии распределены на 17 частей, которые содержат представителей различных классов, семейств, родов и видов. Эти группы не являются формальными таксономическими категориями, а предназначены для подразделения бактерий на легко определяемые фенотипические единицы. Далее в пределах групп бактерии распределены по обязательным таксонам (класс, порядок, семейство, род, вид). Патогенные для человека бактерии входят в состав ограниченного числа групп.

Группа 1. Спирохеты. Патогенными для человека являются представители родов *Borrelia, Leptospira, Treponema*.

Группа 2. Грамотрицательные, аэробные и микроаэрофильные, подвижные, извитые и изогнутые бактерии. Патогенные для человека виды входят в состав родов *Campylobacter, Helicobacter, Spirillum*.

Группа 3. Грамотрицательные, неподвижные (редко подвижные), изогнутые бактерии. Не содержит патогенных для человека видов.

Группа 4. Грамотрицательные, аэробные и микроаэрофильные палочки и кокки. Патогенные и условно-патогенные для человека виды входят в состав семейств *Legionellaceae, Neisseriaceae, Pseudomonaceae и ряда родов Acinetobacter, Alcaligenes, Afipia, Bordetella, Brucella, Chryseomonas, Flavobacterium, Francisella, Moraxella, Oligella*.

Группа 5. Грамотрицательные, факультативно-анаэробные палочки. Патогенные и условно-патогенные виды входят в состав семейств *Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pasteurellaceae, а также родов Galymmatobacterium, Cardiobacterium, Eikanella, Gardnerella, Streptobacillus*.

Группа 6. Грамотрицательные, анаэробные, прямые, изогнутые и спиральные бактерии. Патогенные и условно-патогенные виды входят в состав родов *Bacteroides, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella*.

Группа 7. Бактерии, осуществляющие диссимиляционное восстановление сульфата или серы. Не содержит патогенных для человека видов.

Группа 8. Грамотрицательные, анаэробные, кокки. Включает условно-патогенные бактерии рода *Veilonella*.

Группа 9. Риккетсии и хламидии. Патогенные для человека виды содержат семейства *Rickettsiaceae, Bartonellaceae, Chlamydiaceae*.

Группа 10. Аноксигенные, фототрофные бактерии. Не содержит патогенных для человека видов.

Группа 11. Оксигенные, фототрофные бактерии. Не содержит патогенных для человека видов.

Группа 12. Аэробные, хемолитотрофные бактерии и родственные микроорганизмы. Не содержит патогенных для человека видов.

Группа 13. Почкующиеся и (или) обладающие выростами бактерии. Не имеет видов, патогенных для человека.

Группа 14. Бактерии, обладающие чехлом. Не содержит патогенных для человека видов.

Группа 15. Нефотосинтезирующие, не образующие плодовых тел, скользящие бактерии. Не содержит патогенных для человека видов.

Группа 16. Скользящие бактерии, образующие плодовые тела: миксобактерии. Не содержит видов, патогенных для человека.

Группа 17. Грамположительные кокки. Содержит патогенные и условно-патогенные виды родов *Enterococcus, Leuconostoc, Peptococcus, Peptostreptococcus, Sarcina, Staphylococcus, Stomatococcus, Streptococcus*.

Группа 18. Грамположительные, спорообразующие палочки и кокки. Включает патогенные и условно-патогенные виды родов *Clostridium* и *Bacillus*.

Группа 19. Грамположительные, правильной формы, неспорообразующие палочки. Включает условно-патогенные виды родов *Erysipelothrix, Listeria, Kurthia*.

Группа 20. Грамположительные, неправильной формы, неспорообразующие палочки. Содержит патогенные и условно-патогенные виды родов *Actinomyces, Corynebacterium, Gardnerella, Mobiluncus*.

Группа 21. Микобактерии. Содержит единственный род *Mycobacterium*, содержащий патогенные и условно-патогенные для человека виды.

Группа 22. Нокардиоформные актиномицеты. Содержит патогенные и условно-патогенные виды родов *Gordona, Nocardia, Rhodococcus, Tsukamurella, Jonesia, Oerskovia, Terrabacter*.

Группы 23—29. Актиномицеты. Не содержат патогенных и условно-патогенных для человека видов.

Группа 30. Микоплазмы (молликуты): бактерии без клеточной стенки. Патогенные для человека виды входят в состав родов *Acholeplasma, Mycoplasma, Ureaplasma*.

Группы архебактерий: 31 (метаногены), 32 (сульфатредуцирующие археи), 33 (экстремально галофильные, аэробные бактерии, галобактерии), 34 (архебактерии, лишенные клеточной стенки), 35 (экстремальные термофилы и гипертермофилы, метаболизирующие серу). Не содержат патогенных для человека видов.

Классификация нужна для выяснения родственных отношений между бактериями, объединением их во взаимосвязанные и взаимоподчиненные группы (таксоны). Микробиология как наука возникла раньше, чем генетика. Поэтому классификация бактерий первоначально базировалась исключительно на изучении их фенотипических признаков. На основе методов феносистематики сформировалась традиционная (искусственная) классификация бактерий. Феносистематика изучает таксономические признаки микроорганизмов, т.е. любые признаки, по которым можно установить сходство и отличие классифицируемых групп микроорганизмов. Принято выделять также ключевые таксономические признаки (наиболее существенные, мало варьируемые).

К таксономическим признакам относятся:

- морфология клеток бактерий;
- подвижность;
- спорообразование;

• культуральные особенности;
• тинкториальные свойства (отношение к окраске по Граму);
• физиологические свойства (типы метаболизма, спектры ферментации или утилизации субстратов, отношение к кислороду);
• антигенная структура клеток;
• химический состав клеток (жирнокислотный и липидный состав, белковые спектры и др.);
• чувствительность к бактериофагам и антибиотикам.

Вместе с тем феносистематика имеет ряд существенных недостатков: субъективность выбора изучаемых признаков и их оценки, зависимость проявления признаков от условий их изучения (фенотипическая изменчивость), малая информативность (фенотипически проявляется 5—20% информации генома).

С целью повышения информативности и объективности исследования в конце XX в. получила развитие численная (нумерическая) таксономия. Числовая таксономия применяется в научных таксономических исследованиях, а в практической работе проводят идентификацию микроорганизмов по ограниченному набору (20—30) ключевых таксономических признаков.

Более объективным является построение естественной (филогенетической) классификации бактерий на методах геносистематики. Фенотип и генотип — неразрывные составляющие организма как целого, поэтому методы фено- и геносистематики нельзя противопоставлять. Геносистематика изучает организацию геномов, т.е. генетические программы организмов. Объект ее исследования — ДНК клетки. Первый метод геносистематики, разработанный в 1956—57 гг. отечественными учеными А.Н. Белозерским и А.С. Спириным и сотрудниками Института Пастера в Париже (К. Ли, Р. Вейль, Е. Барбю), состоял в определении гуанин-цитозинового коэффициента, т.е. соотношение молярных процентов гуанина (Г) и цитозина (Ц) нуклеотидного состава суммарной ДНК микроорганизма. Его определяли по температуре плавления ДНК или спектрофотометрически. В настоящее время геносистематика использует ряд методов, позволяющих выявлять родство микроорганизмов на различных таксономических уровнях, и изучать их эволюционные связи. К методам генетического анализа относятся:

1) молекулярная гибридизация ДНК—ДНК (метод выявления гомологии ДНК). Метод позволяет выявить родство на уровне вида и рода. При степени гомологии 70% и более бактерии относятся к одному геновиду;

2) молекулярная гибридизация ДНК с рибосомной РНК. Метод выявляет родство на уровне рода, семейства;

3) секвенирование ДНК — определение нуклеотидной последовательности генов или фрагментов (олигонуклеотидов) ДНК. Метод позволяет выявлять эволюционные связи на уровне царства, отдела, класса, семейства, рода, но недостаточно чувствителен на уровне вида;

4) рестрикционный анализ ДНК («фингерпринтинг»). Метод позволяет осуществлять внутривидовое типирование бактерий.

По «Международному кодексу номенклатуры бактерий» научным языком является латинский. Таксономические категории подразделяются на обязательные и необязательные.

Обязательные таксоны (по убывающей):

- Царство (Regium);
- Класс (Classis);
- Порядок (Ordo);
- Семейство (Familia);
- Род (Genus);
- Вид (Species).

Необязательные таксоны (по убывающей):

- Подкласс (Subclassis);
- Подсемейство (Subfamilia);
- Триба (Tribus):
- Подтриба (Subtribus);
- Подрод (Subgenus);
- Подвид (Subspecies).

Названия таксонов выше вида пишутся одним словом с прописной буквы и соответствующим таксону суффиксом. Род обозначается одним словом с прописной буквы (существительным в единственном числе). Вид обозначается бинарной (биноминальной) комбинацией, состоящей из названия рода (с прописной буквы) и видового эпитета (со строчной буквы). При первом упоминании в тексте приводится полное название вида. При повторном употреблении родовое слово сокращается до первой буквы, видовой эпитет сохраняется полностью. Например, *Yersinia pestis* и *Y.pestis*. Видовой эпитет дается произвольно, но чаще по происхождению вида, его особому свойству или в честь ученого, описавшего вид. Обычно видовой эпитет — существительное в родительном падеже, например *Shigella sonnei*.

Вид может иметь подвиды. Для их обозначения используется тройная комбинация, состоящая из названия рода, видового и подвидового эпитетов. Для разграничения видового и подвидового эпитетов перед

последним ставится сокращенное слово subsp. (от лат. subspecies — подвид), например, *Klebsiella pneumoniae subsp. ozenae*. Вид также может иметь разновидности (varietas): серовары, биовары, хемовары и др., например, *Vibrio cholerae biovar eltor*. Термином штамм называют изолят микроорганизма, полученный из различных источников или в разное время. Его обозначают протокольным номером или по источнику выделения. Термином «клон» обозначают культуру микроорганизмов, полученную из одной клетки. Чистая культура — это популяция микроорганизмов, состоящая из особей одного вида.

Перечень названий всех изученных (опубликованных) видов бактерий представлен в издании Международного комитета по систематике бактерий. К сожалению, в микробиологии до сих пор нет четкого, общепринятого определения важнейшей таксономической категории вида бактерий. Это обусловлено отсутствием надежных критериев вида у прокариотов. Критерии, используемые для определения вида у растений и животных, непригодны для бактерий. Под термином «вид» у бактерий следует понимать наиболее близкую общность, характеризующихся близким содержанием ГЦ-пар.

Идентификация — определение принадлежности изучаемых бактерий к известному таксону. Для идентификации необходимо иметь чистую культуру исследуемых бактерий. Ее получают посредством рассева бактерий на поверхности плотных питательных сред приемом, обеспечивающим рост изолированных колоний. Колония бактерий — это потомство одной изолированной клетки, содержащее чистую культуру. Однако не всегда колония содержит потомство одной клетки. Чтобы гарантировать чистоту культуры, желательно повторить рассевы из одной колонии на питательные среды без ингибиторов.

Учитывая высокую фенотипическую изменчивость бактерий, необходимо использовать для идентификации стандартизованные методики тестов. Желательно использовать минимальное число наиболее важных и легко выполнимых тестов. Вначале используют тесты, определяющие принадлежность бактерий к определенному отделу и группе по «Определителю бактерий Берджи», например, морфология, окраска по Граму, подвижность, наличие спор, отношение к кислороду. Затем используют наиболее важные тесты, характеризующие предполагаемый таксон (род, вид).

Наиболее важным для идентификации является определение биохимических признаков бактерий. Их определяют преимущественно микрообъемной технологией с использованием соответствующих таксону коммерческих тест-систем или приборов автоматических систем

идентификации. Для идентификации также широко используют серологические реакции, направленные на выявление антигенов бактерий и их таксонов.

Совокупность полученной информации о свойствах бактерий сопоставляют с характеристикой определенных таксонов в «Определителе бактерий Берджи» или других руководствах и дают заключение о таксономическом положении бактерий.

В последние годы все шире используются методы геноиндикации микроорганизмов, которые не требуют выделения чистых культур: метод ДНК-зондов, полимеразная цепная реакция (ПЦР) со специфическими праймерами. Эти методы отличаются высокой чувствительностью и позволяют быстро идентифицировать микроорганизмы непосредственно в исследуемом материале.

1.4. УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

Бактериологические и вирусологические лаборатории входят в состав как лечебно-профилактических, так и санитарно-эпидемиологических учреждений. В лабораториях выполняются бактериологические, вирусологические, серологические и микологические анализы материалов, полученных от больных и контактных лиц, обследуются бактерионосители и проводятся санитарно-микробиологические исследования.

В бактериологических и серологических лабораториях лечебно-профилактических учреждений проводятся диагностические исследования при заболеваниях инфекционной природы. Диагностика особо опасных инфекций (чумы, холеры, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы) проводится в специальных лабораториях. Вирусологические лаборатории предназначены для исследований в интересах диагностики заболеваний вирусной, хламидийной и риккетсиозной природы.

Микробиологическая лаборатория в зависимости от ее профиля обеспечивается необходимым для работы количеством помещений, что регламентируется санитарно-эпидемиологическими правилами: «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (СП 1.3.2322—08).

Микробиологические лаборатории, где проводят работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности, должны размещаться в отдельно стоящем здании или в изолированной части здания. На входной двери лаборатории должны быть обозначены название (номер) лаборатории и международный знак «Биологическая опасность».

Размещение лабораторий в жилых зданиях не допускается. Диагностические лаборатории должны иметь два входа: один — для сотрудников, другой — для доставки материала на исследование. Допускается получение материала через передаточное окно. Лаборатория должна быть обеспечена холодным и горячим водоснабжением, канализацией, электричеством, отоплением и вентиляцией. Все помещения лаборатории должны иметь естественное и искусственное освещение в соответствии с требованиями действующих нормативных документов.

Лаборатории должны иметь набор рабочих и вспомогательных помещений (комнат). Набор помещений и их оснащение оборудованием могут варьироваться в зависимости от конкретных целей и задач лаборатории.

Помещения лабораторий разделяют на «заразную» зону, где осуществляются манипуляции с микроорганизмами III—IV групп и их хранение, и «чистую» зону, где не проводят работы с микроорганизмами и не осуществляется их хранение.

В «чистой» зоне лабораторий должны располагаться следующие помещения:

- гардероб для верхней одежды;
- помещения для проведения подготовительных работ (препараторская, моечная, комната приготовления и разлива питательных сред и др.);
- помещение для стерилизации питательных сред и лабораторной посуды (стерилизационная);
- помещение с холодильной камерой или холодильниками для хранения питательных сред и диагностических препаратов;
- помещение для работы с документами и литературой;
- помещение для отдыха и приема пищи;
- кабинет заведующего;
- помещение для хранения и надевания рабочей одежды;
- подсобные помещения;
- туалет.

В «заразной» зоне должны размещаться:

- помещение для приема и регистрации материала (проб);
- боксированные помещения с предбоксами или помещения, оснащенные боксами биологической безопасности;
- помещение для проведения бактериологических (вирусологических) исследований;
- помещение для проведения иммунологических исследований;

- помещение для люминесцентной микроскопии;
- помещение для проведения зооэнтомологических работ;
- помещение для гельминтологических исследований;
- помещение для работы с лабораторными животными (осуществление процессов заражения, вскрытия);
- помещение для содержания инфицированных лабораторных животных;
- помещение для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики);
- термостатная комната;
- помещение для обеззараживания (автоклавная).

На границе «чистой» и «заразной» зон должен располагаться санитарный пропускник. При отсутствии водопровода и канализации устраивают местный водопровод, канализацию и очистные сооружения с устройствами для обеззараживания сточных вод.

В лаборатории устанавливают водопроводные раковины для мытья рук персонала и раковины, предназначенные для мытья посуды и инвентаря.

Помещения лаборатории оборудуют легко открываемыми фрамугами (форточками), которые в летнее время закрываются мелкоячеистыми сетками. Стены в лабораторных помещениях облицовывают кафелем на высоту 1,5 м или красят масляной краской светлых тонов; в боксах и виварии стены и потолок красят масляной краской. Полы покрывают линолеумом, в боксах и виварии — гладкой плиткой.

Лабораторную мебель красят масляной или эмалевой краской светлых тонов, рабочие поверхности столов покрывают пластиком или другим материалом, не портящимся от применения дезинфектантов. Внутренние и наружные поверхности мебели должны быть без щелей и пазов, затрудняющих проведение дезинфекции.

Приборы, оборудование и средства измерений, используемые в работе лаборатории, должны быть аттестованы, технически исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации с учетом требований биологической безопасности. Температура воздуха в лабораторных помещениях поддерживается в пределах 18—21 °С, в районах с жарким климатом они оборудуются кондиционерами. Помещения лаборатории должны быть непроницаемы для грызунов.

Каждый сотрудник лаборатории должен иметь закрепленное за ним рабочее место. Перед началом работы надевается спецодежда, которая хранится в индивидуальных шкафчиках отдельно от верхней одежды. Тип защитного костюма и частота его смены определяются

в зависимости от характера работы. Выполняя микробиологические исследования, необходимо соблюдать следующие правила:

- с инфицированным материалом работают только с помощью инструментов (пинцетов, петель, корнцангов и др.);
- прикасаться руками к исследуемому материалу и конденсату в засеянных чашках запрещается;
- перед работой тщательно проверяют целость стеклянной посуды, проходимость игл и надежность поршней шприцев;
- при посеве материала делают надпись на пробирках, чашках Петри, колбах, флаконах с названием номера анализа (культуры) и даты посева;
- в пробирки и чашки Петри материал высевают вблизи от огня горелки с обжиганием петли, шпателя, краев пробирки;
- во время работы все чашки с посевами помещают в кюветы или на подносы, пробирки — в штативы;
- растворы, содержащие патогенные микроорганизмы, набирают пипеткой с помощью резинового баллона;
- насасывать ртом и переливать растворы из сосуда в сосуд через край нельзя;
- по окончании работы запрещается оставлять на рабочих столах нефиксированные мазки, чашки Петри, пробирки и другую посуду с инфицированным материалом.

Доставлять инфицированный материал в лабораторию и переносить его из одной лаборатории в другую на территории учреждения нужно в специально приспособленной посуде (металлических биксах, ящиках, баках).

В комнатах, предназначенных для обработки и посева инфекционного материала, нельзя проводить другие работы, выращивать цветы, держать домашних животных, принимать пищу, пить, курить, хранить продукты питания в помещениях, где работают с материалом, зараженным патогенными микроорганизмами или подозрительным на такое заражение, запрещается. Центрифугирование инфекционного материала проводит специально обученный персонал. Если в процессе центрифугирования разбивается пробирка, содержащая инфекционный материал, центрифугу отключают от сети, выжидают время для того, чтобы осели капли аэрозоля, дезинфицируют, а загрязненные места очищают.

Термостаты и термостатные комнаты, предназначенные для выращивания патогенных микроорганизмов, дезинфицируют не реже одного раза в месяц. При хранении инфекционных материалов в хо-

лодильнике необходимо принимать меры, предупреждающие его инфицирование. Оттаивание холодильника, предусмотренное правилами эксплуатации, нужно совмещать с его дезинфекцией.

В лаборатории обязательно должна быть укомплектованная аптечка для экстренной медицинской помощи, включающая этиловый спирт, настойку йода, перевязочные средства, набор необходимых антибиотиков.

Использованные при лабораторных исследованиях предметные стекла, пипетки, шпатели погружают на сутки в банки с дезинфицирующим раствором, затем моют и кипятят. Отработанные чашки Петри и пробирки с посевами патогенных культур, посуду с использованным материалом, взятым от инфекционных больных, собирают в банки с крышками и стерилизуют паром под давлением. Трупы зараженных животных помещают в сосуд с дезинфицирующим раствором и по окончании рабочего дня сжигают в специальной печи (крематории) или автоклавируют в течение одного часа при температуре 120 °С. Бактерицидные лампы включают только в отсутствие персонала. Руки тщательно моют с туалетным мылом, вытирают вафельным полотенцем и смазывают защитным питательным кремом.

Учебно-методические материалы

Практическое занятие на тему **«Правила работы в микробиологической лаборатории»**.

Вопросы и задания для предварительного изучения

1. Каким документом регламентируется устройство микробиологической лаборатории?
2. Перечислите помещения «чистой» и «заразной» зоны.
3. Какие мероприятия необходимо провести после аварии?
4. Какие мероприятия необходимо провести после аварии с разбрызгиванием?

Глава 2

ОСНОВЫ МОРФОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ

Студент должен знать: морфологию бактерий, методы микроскопических исследований, правила окраски бактерий.
Ключевые слова и термины: нуклеоид. Капсула. Спора. Жгутики. Цитоплазматическая мембрана. Клеточная стенка.

2.1. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

Бактерии могут иметь округлую, палочковидную или извитую форму. Круглые бактерии называются кокками (одна клетка — кокк). Слово «кокк» произошло от греческого слова «коккос», что значит семя. Обычно кокки имеют правильную шарообразную форму. Некоторые кокки после деления в одной плоскости остаются связанными парами. Это диплококки. Реже они несколько заострены, как пневмококки — возбудители бактериальных пневмоний (рис. 2.1), или имеют вид кофейных зерен или бобов, как менингококки — возбудители менингитов. Точно так же выглядят и гонококки — возбудители венерической болезни гонореи (рис. 2.2).

По расположению клеток после деления кокки могут быть подразделены на несколько групп, у некоторых из них после деления клетки расходятся и располагаются поодиночке. Такие формы называются микрококками. Иногда кокки при делении образуют скопления, напоминающие по форме гроздья винограда. Подобные формы называются стафилококками (рис. 2.3).

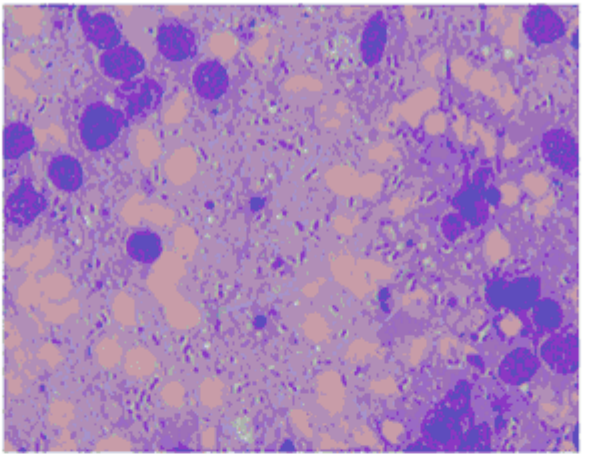

Рис. 2.1. Пневмококки

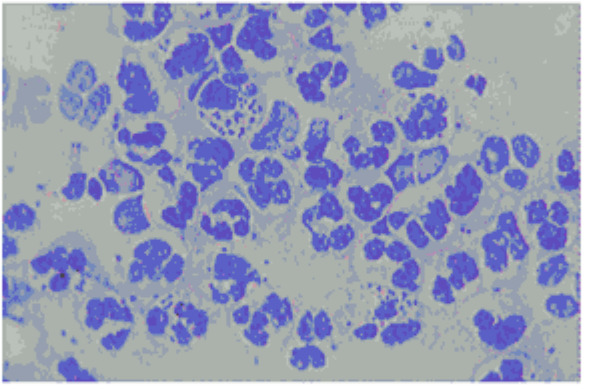

Рис. 2.2. Гонококки

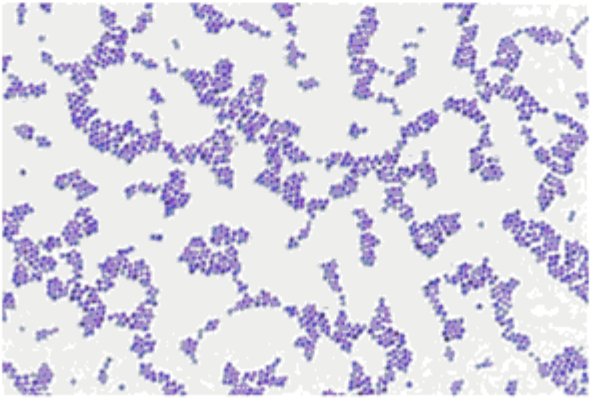

Рис. 2.3. Стафилококки

У стрептококков деление также происходит в одной плоскости, но клетки не отделяются друг от друга, и поэтому образуются различной длины цепочки (рис. 2.4).

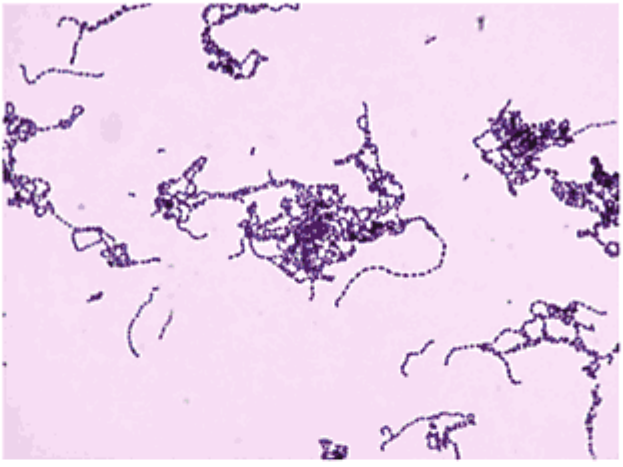

Рис. 2.4. Стрептококки

Некоторые кокки делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, что приводит к образованию своеобразных скоплений кубической формы. Такие скопления кокков называются сарцинами (рис. 2.5). Если после деления в двух взаимно перпендикулярных плоскостях клетки располагаются в виде сочетаний из четырех кокков, то такие скопления называются тетракокками (рис. 2.6).



Рис. 2.5. Сарцины

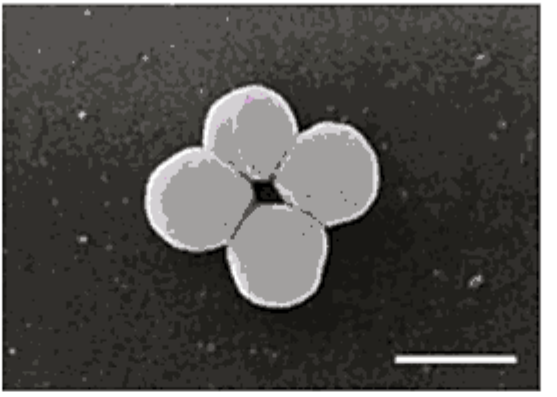

Рис. 2.6. Тетракокки

У палочковидных бактерий концы бывают округлыми или заостренными. Разнообразно и расположение клеток после деления — одиночные палочки, по две, цепочками и т.п. (рис. 2.7).



Рис. 2.7. Палочковидные бактерии

Нередко встречаются извитые, или спиральные, бактерии. Имеются две группы извитых форм бактерий. К первой группе относятся спириллы, имеющие форму длинных изогнутых (один или несколько завитков) палочек и вибрионы, представляющие лишь часть витка спирали и похожие на запятую. Вторая группа извитых бактерий — спирохеты — представляет собой длинные и тонкие клетки с большим количеством мелких завитков (рис. 2.8).

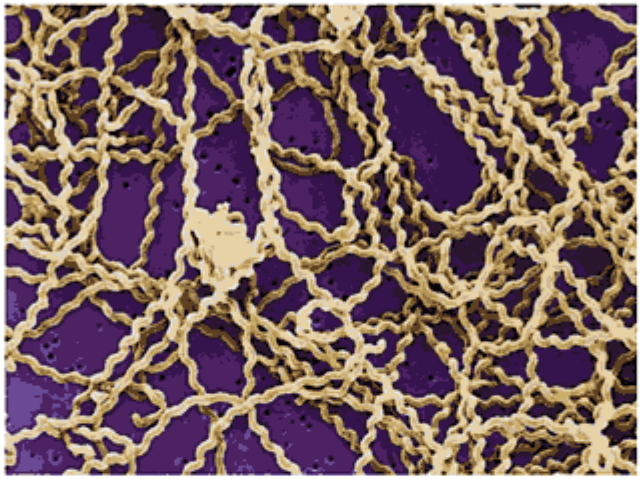

Рис. 2.8. Спирохеты

Бактериальные клетки очень малы, их размеры исчисляются микрометрами (мкм). Кокки имеют диаметр около 0,5—1,0 мкм. Ширина палочковидных форм бактерий составляет от 0,5 до 1,0 мкм, а длина может достигать нескольких десятков мкм. Размер бактерий может значительно изменяться в зависимости от температуры, состава среды и т.д.

Бактериальная клетка окружена оболочкой. В цитоплазме содержатся ядерный аппарат, вакуоли, аналоги митохондрий — мезозомы, рибосомы, а также различного рода включения, обычно образующиеся в процессе обмена веществ (рис. 2.9).

Клеточная оболочка обладает определенной ригидностью (жесткостью), вместе с тем эластичностью и способна изгибаться. Клеточную оболочку можно разрушить ультразвуком, ферментом лизоцимом, тонкой иглой и т.д. При этом содержание клетки — цитоплазма — с ее включениями вытекает и приобретает шаровидную форму. Отсюда следует, что оболочка придает бактериальной клетке определенную форму.

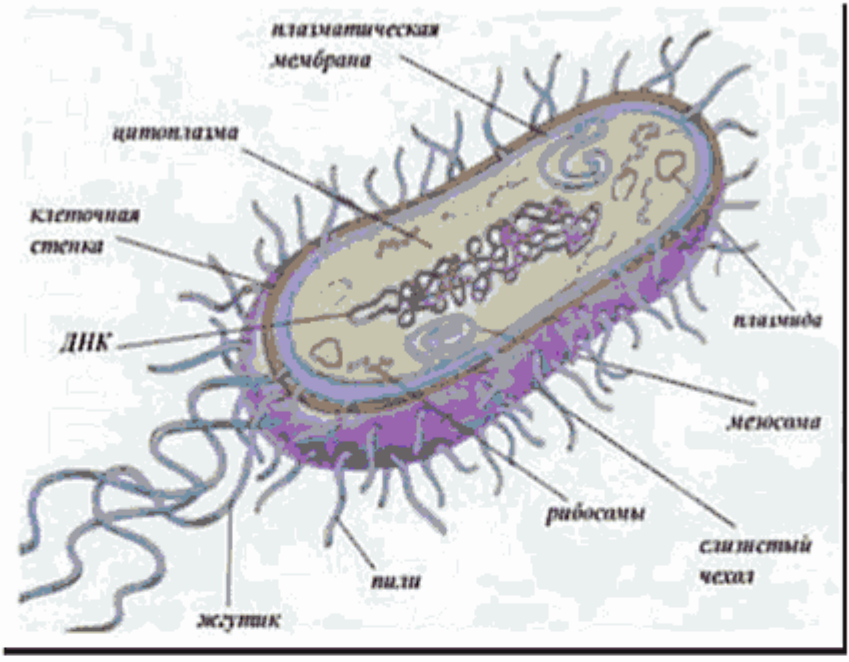

Рис. 2.9. Строение бактериальной клетки

Клеточные оболочки обнаруживают определенную организацию. Масса клеточной оболочки составляет около 20% всей массы клетки. Клеточная оболочка часто бывает окружена слизистым слоем, который различается у отдельных бактерий как по толщине, так и по консистенции. Этот слой называется капсулой (рис. 2.10).

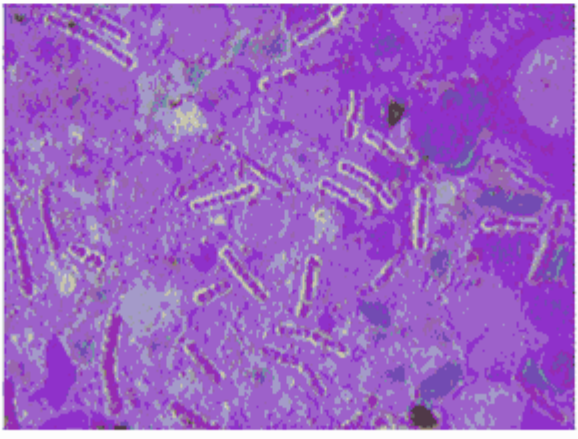

Рис. 2.10. Капсулы бактерий

По химическому составу капсулы бактерий можно разделить на 2 типа. Один тип капсул состоит из полисахаридов — декстранов, другой из полипептидов. Многие бактерии содержат в капсуле пептиды, состоящие главным образом из цепочек молекул глутаминовой кислоты.

Капсула защищает клетку от неблагоприятных воздействий окружающей внешней среды. Бактерии, обладающие капсулами, могут жить в такой среде, в которой рост некапсулированных бактерий ограничен. В некоторых случаях вещество капсулы может использоваться бактериями как пищевой резерв, когда отсутствует другая пища.

К клеточной оболочке бактериальной клетки тесно прилегает внешний слой цитоплазмы — цитоплазматическая мембрана. Это не ригидное образование, иногда называемое осмотическим барьером клетки, действует как полупроницаемая мембрана и контролирует транспорт ионов и молекул в клетку и из клетки. Цитоплазматическая мембрана составляет около 10% сухой массы клетки, состоит из полипротеидов и содержит до 75% липидов клетки. Нередко мембрана дает внутрицитоплазматические ответвления (инвагинации), приводящие к образованию особых телец — мезосом.

Мембрана и мезосомы выполняют функции, свойственные митохондриям высших организмов, в которых локализованы разнообразные ферментные системы.

Под цитоплазматической мембраной находится цитоплазма. Она обычно рассматривается как коллоидная система, состоящая из воды, белков, жиров, углеводов, минеральных соединений и других веществ, соотношение которых зависит от вида бактерий и их возраста.

Детальные исследования микромолекулярной организации и субмикроскопической структуры цитоплазмы выявили ее мелкогранулярный характер. Многие из этих гранул являются рибосомами — частицами с богатым содержанием белка и рибонуклеиновой кислоты. В бактериальной клетке содержится приблизительно до 10 000 рибосом, осуществляющих синтез белков в бактериальной клетке.

В цитоплазме бактерий имеются гранулы запасных питательных веществ. В качестве резервных питательных веществ в клетках бактерий могут накапливаться вещества, состоящие из углеводов — гликогена (животного крахмала) или гранулезы (близкой к крахмалу). При недостаточном поступлении углеродсодержащих веществ в среду гликоген или гранулеза постепенно исчезают из клеток бактерий.

У некоторых видов бактерий в клетках накапливаются жир и волютин. Последний состоит из неорганических полифосфатов и полиметафосфатов, а также веществ, близких к нуклеиновым кислотам. Волютин обнаруживается в виде крупных, хорошо видимых гранул, образующихся в больших количествах на средах, богатых глицерином или углеводами.

В цитоплазме бактериальных клеток расположен ядерный аппарат (иногда называемый нуклеоидом). У бактерий постоянно обнаруживаются дискретные (прерывистые) форменные структуры, содержащие дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), а также белок и обладающие функцией ядра или, точнее, хромосом высших форм организмов. Обычно ядерное образование (по одному на клетку) располагается в центральной части внутреннего содержимого клетки бактерий. В отличие от клеток высокоорганизованных организмов нуклеоид бактерий не отделен от цитоплазмы мембраной.

Многие бактерии передвигаются с помощью особых нитевидных придатков — жгутиков, обусловливающих подвижность бактерий благодаря своим спиральным волнообразным движениям вследствие ритмичных сокращений (рис. 2.11).



Рис. 2.11. Жгутики бактерий

Кокки, за исключением отдельных видов, не имеют жгутиков. Среди цилиндрических форм бактерий приблизительно около половины имеют жгутики. Из спиралевидных бактерий большинство подвижны.

Бактерии с одним жгутиком называются монотрихами, имеющие на одном или на обоих концах тела пучок жгутиков — лофотрихами. Перитрихами называются бактерии, имеющие жгутики по всей поверхности тела. Количество жгутиков у различных видов бактерий может значительно изменяться. Например, вибрионы имеют 1—3 жгутика, а у палочковидных бактерий обнаружено от 50 до 100 жгутиков.

Толщина жгутиков — около 0,01 мкм, а длина их во много раз больше длины тела бактерий. В химическом отношении жгутики представляют собой белок и денатурируются при нагревании.

Жгутики не являются жизненно важной структурой для бактериальной клетки. Так, бактерии, обладающие жгутиками, можно вырастить в таких условиях, при которых у них не развиваются жгутики. У подвижных бактерий наблюдаются «фазовые вариации», т.е. жгутики присутствуют в течение одной фазы развития и отсутствуют в другой. Жгутики бактерий можно разрушить, но клетка будет оставаться жизнеспособной.

Свое начало жгутики берут от плотного тельца в цитоплазме, но вместе с тем они прикрепляются не только к цитоплазматической мембране, но и к клеточной. Протопласты, освобожденные от клеточной оболочки, сохраняют жгутики.

Бактериальные клетки — монотрихи, перемещаясь с помощью жгутика вдоль своей оси, совершают волнообразное движение. У перитрихов наблюдается оживленное кувыркание.

Скорость движения бактериальных клеток зависит от особенностей их аппарата движения и свойств среды — ее вязкости, температуры, pH, осмотического давления и др. Некоторые бактерии могут передвигаться при благоприятных условиях на расстояние, превышающее размеры клетки в 10—15 раз. Большинство же бактерий за секунду проходит расстояние, равное размеру их клетки.

Кроме жгутиков клетки бактерий могут иметь прямые отростки — фимбрии. Фимбрии значительно короче и тоньше жгутиков, но более многочисленны и обнаружены как у подвижных, так и у неподвижных организмов.

Некоторые бактерии способны образовывать споры (эндоспоры), тельца сферической или эллиптической формы, очень устойчивые против неблагоприятных условий. Споры преломляют свет и четко видны в световом микроскопе. Обычно в клетке образуется одна спора — эндоспора. Споры можно рассматривать как приспособление

организма для перенесения неблагоприятных внешних условий. Они не являются органами размножения (рис. 2.12).

Формирование спор зависит от условий роста. Споры могут оставаться живыми в условиях, когда вегетативные клетки, т.е. не образовавшие спор, погибают. Большинство спор хорошо переносит высушивание, многие споры нельзя убить даже при кипячении в течение нескольких часов. В сухом состоянии споры погибают лишь при сильном нагревании (15—160 °С) в течение нескольких часов. Споры отдельных видов бактерий отличаются своей термоустойчивостью.

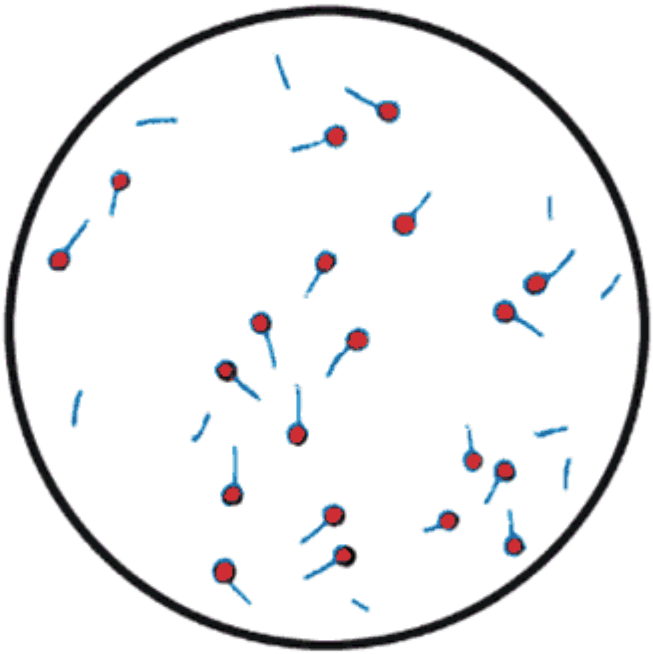

Рис. 2.12. Споры бактерий

В спорах содержится мало воды (вследствие обезвоживания), что предохраняет белки от денатурации при высоких температурах. Устойчивость спор к неблагоприятным факторам определяется также специальной структурной формой, которую принимает белок споры в процессе спорообразования.

Диаметр споры приблизительно равен диаметру клетки, в которой она образовалась, или несколько превышает его. У некоторых бакте-

рий спора формируется на конце клетки, которая при этом несколько расширяется. Клетка в таком случае приобретает вид барабанной палочки. У других бактерий спора образуется в центре клетки, которая либо не меняет формы (род *Bacillus*), либо в середине расширяется и принимает вид веретена (род *Clostridium*). Вегетативная часть клетки разрушается и исчезает, и остается только преломляющая свет спора. Спора трудно окрашивается красителями.

Попадая в благоприятные условия, спора начинает «прорастать». При этом она разбухает не только в результате поглощения воды, но и вследствие роста клетки за счет резервного материала. Затем оболочки под влиянием давления, вызванного ростом, разрываются и дают трещину. Возникает новая вегетативная клетка. Способ, которым клетка выходит из споры, различается у разных видов и может использоваться в качестве видовой характеристики.

Имеются микроорганизмы, образующие относительно устойчивые к неблагоприятным условиям клетки — цисты. Цистам свойственна утолщенная оболочка.

Благодаря жесткости своей стенки клетка сохраняет форму: шаровидную, палочковидную или извитую. Оболочка защищает клетку, сохраняя ее структурную целостность при изменении внешних условий, в частности при осмотических воздействиях. Наряду с мембраной она действует как полупроницаемый барьер, обеспечивающий избирательное проникновение питательных веществ из окружающей среды и выделение высокомолекулярных соединений — токсинов или ферментов, участвующих во внеклеточном переваривании субстратов. Клеточная стенка детерминирует антигенную специфичность видов, является местом адсорбции фагов на клетке и участвует в процессах движения и деления.

При изучении химического состава клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий выявились существенные различия в их качественном и количественном составе (рис. 2.13).

За механическую прочность стенки у этих групп микроорганизмов ответствен один и тот же гетерополимер — пептидогликан, хотя количественное содержание его и локализация различны. А такой компонент клеточной стенки, как тейхоевые кислоты, содержится в стенках только грамположительных бактерий. Электронномикроскопическое изучение срезов поверхностных слоев грамположительных и грамотрицательных бактерий также подтвердило неоднородность структуры их клеточных стенок.

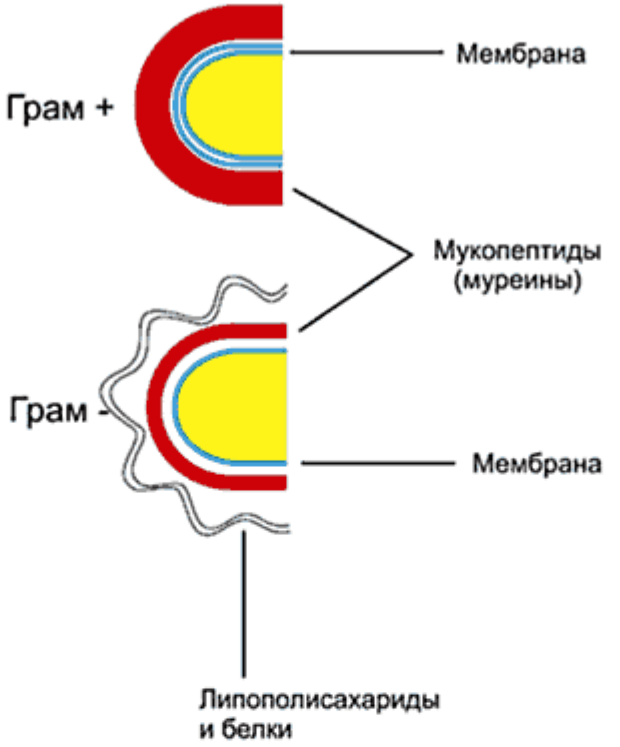

Рис. 2.13. Различия в строении грамположительных и грамотрицательных бактерий

2.2. ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ

Стенка грамположительных бактерий представляет собой однородную структуру толщиной приблизительно 20—80 нм. Главный ее компонент пептидогликан составляет 40—90% сухой массы стенки. С этим гетерополимером ковалентно связаны полисахариды и тейхоевые кислоты. Пептидогликан — это универсальный гетерополимер. Он найден в клеточных стенках почти всех прокариотических клеток.

Жесткий слой пептидогликана окружает всю бактериальную клетку и является по существу одной крупной «мешковидной» молекулой. Молекула пептидогликана представляет собой параллельные полисахаридные цепи, связанные между собой короткими пептидными мостиками. Повторяющейся единицей полисахаридных цепей является

муропептид — дисахарид, в котором N-ацетил-D-гликозамин соединен с N-ацетилмурамовой кислотой. К одной из замещенных групп мурамовой кислоты присоединена тетрапептидная боковая цепь, состоящая из остатков L-аланина, D-аланина, D-глутамовой кислоты и либо диаминопимелиновой кислоты, либо лизина. Между длинными параллельными полисахаридными цепями имеются поперечные мостики, возникающие вследствие образования пептидной связи между концевым D-аланином в 4-м положении одной цепи и аминогруппой диаминокислоты другой. Связывающий пептид может содержать от 1 до 6 аминокислотных остатков. Таким образом, молекула пептидогликана — это замкнутая со всех сторон сеть, не имеющая разрывов и окружающая бактериальную клетку.

Структура пептидогликанового слоя обусловливает основные функции клеточной стенки — формообразующую и защитную.

Пептидогликановый матрикс в клеточных стенках грамположительных бактерий ковалентно связан с полисахаридами особого типа — тейхоевыми кислотами. Эти растворимые в воде полимеры представляют собой длинные цепи, состоящие из остатков глицерина и рибита, связанных друг с другом фосфодиэфирными мостиками. Эти соединения могут составлять до 50% массы сухих стенок. Из клеточных стенок бактерий были выделены два типа тейхоевых кислот: рибиттейхоевая, состоящая из остатков рибитфосфата, и глицеринтейхоевая, состоящая из остатков глицерофосфата. Небольшое количество глицеринтейхоевой кислоты ковалентно связано с мембранными гликолипидами. Это соединение называют липотейхоевой или мембранной тейхоевой кислотой. Клеточные стенки каждого штамма содержат кислоту только одного типа.

Значительная часть тейхоевых кислот располагается между клеточной мембраной и слоем пептидогликана, выступая через поры последнего. Связь тейхоевых кислот с пептидогликаном осуществляется путем образования фосфодиэфирной связи между концевым фосфатом тейхоевой и остатком мурамовой кислот. Выступая на поверхности клетки, тейхоевые кислоты создают в ее оболочке высокую плотность регулярно ориентированных зарядов и этим способствуют проникновению ионов через внешние слои.

Кроме пептидогликана и тейхоевых кислот клеточные стенки грамположительных бактерий содержат также сопутствующие полисахариды, мономерными компонентами которых являются гликозамин, глюкоза, арабиноза, манноза и (или) рамноза. Тейхоевые кислоты и полисахариды клеточных стенок обладают антигенной активностью.

Липиды в стенках грамположительных бактерий содержатся в очень небольшом количестве или отсутствуют вовсе. В основном это длинноцепочечные жирные кислоты, соединенные сложноэфирными связями с полисахаридами стенки. Белки в клеточных стенках этой группы бактерий содержатся не всегда. Если они обнаруживаются, то связаны с внешней мембраной и образуют здесь регулярную структуру.

2.3. ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий устроена сложнее, чем грамположительных. Она состоит из трех слоев: наружного — липопротеинового, среднего — липополисахаридного и внутреннего — пептидогликанового (ригидного).

Электронномикроскопические исследования срезов поверхностных слоев грамотрицательных бактерий подтвердили многослойность их строения. Внутренний пептидогликановый слой тонкий — 2—3 нм. Его содержание в клеточной стенке невелико — всего 5—10% массы сухого вещества стенки. По структуре пептидогликана грамотрицательные бактерии отличаются от грамположительных низким содержанием поперечных сшивок и меньшим разнообразием диаминокислот. Из последних в клеточных стенках этих бактерий встречается мезодиаминопимелиновая кислота и лишь у спирохет вместо нее L-орнитин. Пептидогликановый слой стенки может быть выделен в виде очень тонкого мешочка, сохраняющего форму и размеры исходной клетки.

Поверх тонкого пептидогликанового мешка располагается более толстый слой (8—10 нм), состоящий из липополисахаридов, белков и фосфолипидов. Тонкая структура этого слоя мало отличима от цитоплазматической мембраны.

Липополисахариды — главные компоненты внешнего слоя стенки. Это сложные молекулы с относительной молекулярной массой более 10 000. Химический состав этих соединений заметно варьирует у разных групп грамотрицательных бактерий и даже внутри отдельных групп.

Липополисахарид представляет собой сложную молекулу — «скелет» (липид А) и прикрепленный к нему полисахарид, образованный ядром и терминальной цепью повторяющихся единиц. У всех грамотрицательных бактерий ядро полисахарида имеет одинаковую структуру. Вариабельной частью являются повторяющиеся единицы — трисахариды либо разветвляющиеся тетра- или пентасахариды. Эти длинные О-замещенные боковые цепи выступают над поверхностью клетки, образуя так называемый молекулярный ворс, и служат рецеп-

торами для адсорбции многих фагов. Липополисахариды являются главными антигенными детерминантами клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

2.4. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ

В связи с малыми размерами большинства патогенных микроорганизмов (не более 2—15 мкм) изучение их морфологии возможно только с помощью специальных оптических приборов, получивших название микроскопов (от лат. micros — малый и scopein — рассматривать, наблюдать), обеспечивающих значительное увеличение и обладающих высокой разрешающей способностью, то есть наименьшим расстоянием между двумя точками, дающими в поле зрения раздельное изображение.

Разрешающая способность человеческого глаза превышает 80 мкм. Размеры патогенных микроорганизмов меньше указанной величины, поэтому мы их не видим. Более того, микроорганизмы, расположенные друг к другу ближе 80 мкм, раздельно не воспринимаются. Современные микроскопы позволяют получать раздельное увеличенное изображение микроорганизмов и других объектов и структур, не доступных невооруженному человеческому глазу.

В настоящее время в практике микробиологических исследований используют несколько типов микроскопов (биологический, люминесцентный, исследовательский, электронный) и специальных методов микроскопии (темнопольный, фазовоконтрастный).

Современный биологический микроскоп — сложный оптический прибор, позволяющий изучать объекты в проходящем свете, в светлом и темном поле, а также в отраженном свете (рис. 2.14).

Все эти микроскопы обеспечивают достаточно большое увеличение и высокую разрешающую способность (до 0,4 мкм). Механическая система микроскопа включает:

а) штатив;

б) колонку;

в) тубус (съемный, наклонный — в современных моделях);

г) подвижный предметный столик;

д) макрометрический винт для грубой (ориентировочной) настройки на резкость;

е) микрометрический винт, обеспечивающий тонкую фокусировку препарата;

ж) револьвер для объективов.

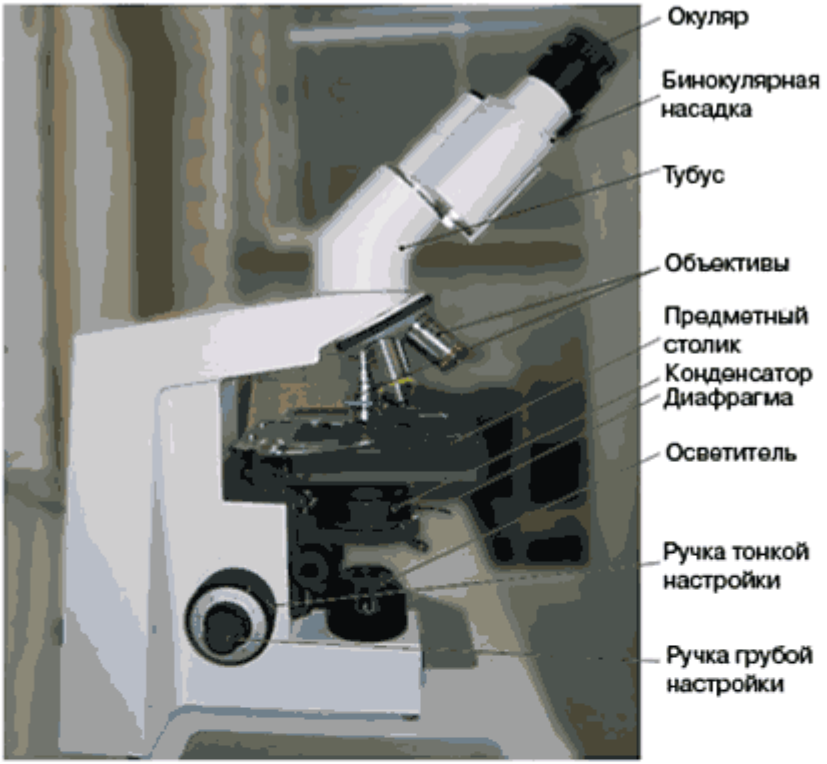

Рис. 2.14. Устройство современного микроскопа

Оптическая система микроскопа содержит две части — осветительную и наблюдательную. Осветительная часть состоит из зеркала и конденсора с ирисовой апертурной диафрагмой. Зеркало имеет две отражательные поверхности — плоскую и вогнутую. С помощью конденсора лучи, идущие от зеркала, фиксируются и направляются на препарат. Яркость освещения регулируется ирисовой диафрагмой.

Оптическую часть микроскопа составляют объектив и окуляр. В микроскопах с наклонным тубусом имеется специальная призма, направляющая лучи под углом 45° к вертикали. Объективы микроскопа отличаются сложным устройством и состоят из нескольких отдельных линз — фронтальной (нижней) линзы, увеличивающей объект, и коррекционных, исправляющих недостатки оптического изображения. Обычно применяют ахроматические объективы, в которых устранена хроматическая аберрация в отношении наиболее ярких цветов спектра (окрашивание изображения в различные цвета благодаря различной преломляемости лучей с различной длиной вол-

ны) и сферическая аберрация (нечеткое изображение периферических частей рассматриваемого предмета). Апохроматические объективы дают отчетливое, почти бесцветное изображение, поэтому они особенно эффективны при микрофотографировании (в них достаточно устранен остаточный хроматизм и достигнута равномерность резкости и величины изображения в лучах с разной длиной волны). Подобную оптику имеет БИОЛАМ Р-17 (объективы-апохроматы ×10, ×20, ×60, ×90 МИ). Объективы разделяют на сухие и иммерсионные (от лат. immersio — погружение). Обычно биологические микроскопы оснащают двумя сухими объективами (×8 и ×40) и одним иммерсионным (×90 МИ), однако последние модели помимо указанных объективов оснащены более совершенной и разнообразной оптикой (БИОЛАМ Р-17 — апохроматами, БИОЛАМ И — планапохроматами).

Окуляры состоят из двух линз: верхней — глазной и нижней — собирательной. На оправе окуляров обозначено увеличение: ×5 (22 мм), ×7 (18 мм), ×10 (13 мм), ×15 (11 мм). Окуляры подобны лупе и лишь увеличивают изображение, полученное объективом микроскопа.

Общее увеличение микроскопа определяют произведением увеличений объектива и окуляра. Например, увеличение микроскопа с иммерсионным объективом ×90 и окуляром ×10 составляет: 90 × 10 = 900 раз. Полезное увеличение микроскопа может достигать 1500 раз, в повседневной же практике обычно используют увеличение порядка 630—900 раз. В настоящее время выпускаются так называемые микровизоры, т.е. микроскопы, у которых вместо окуляра присутствует цветной телевизор, что дает, во-первых, возможность оцифровывать изображение на компьютере, а во-вторых, просматривать изображение одновременно нескольким лицам.

Иммерсионный микроскоп содержат в чистоте и предохраняют от механических повреждений. При соблюдении этих требований микроскоп может безотказно работать продолжительное время. После работы с объектива обязательно удаляют иммерсионное масло.

В микробиологии нашел применение микроскоп с конденсором темного поля. Его используют для повышения контрастности изображения, что имеет большое значение для изучения подвижности бактерий, которые в живом состоянии слабоконтрастны и не видны в обычном микроскопе. Микроскопия в темном поле основана на явлении дифракции света при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости мельчайших частиц (эффект Тиндаля — свечение пылинок в воздухе темного помещения, в которое солнечный луч проникает через небольшую щель).

Для создания темного поля в биологическом микроскопе применяют: щелевой метод, затемнение в объективе, специальные конденсоры — параболоид-конденсор или кардиоид-конденсор, которыми заменяют конденсор в биологическом микроскопе. Параболоид-конденсор имеет в центре затемнение, задерживающее центральные лучи света, и внутреннюю вогнутую зеркальную поверхность для отражения краевых лучей. В кардиоид-конденсоре лучи вначале отражаются от выпуклой зеркальной поверхности, затем от вогнутой. Краевые лучи, выходящие из темнопольного конденсора, проходят в косом направлении и не попадают в объектив, поэтому поле зрения микроскопа остается темным. В объектив попадают лучи, отраженные от объекта, в связи с чем в поле зрения можно наблюдать характерное изображение — на темном поле зрения ярко светятся микробные клетки и другие частицы, находящиеся в препарате.

В качестве источников света для микроскопа с конденсором темного поля используют сильные осветители (ОИ-32, ОИ-35). Настройку освещения и установку препарата («раздавленная капля») производят, руководствуясь изложенными выше правилами работы с биологическим микроскопом. Рекомендуется употреблять сухие объективы и предметные стекла толщиной 0,8—1,2 мм.

Фотолюминесценцией называют свечение объектов, возникающее в результате поглощенной ими лучистой энергии. Вследствие некоторых причин свет люминесценции обладает большей длиной волны, чем поглощенный (правило Стокса). Поэтому люминесценцию выгодно возбуждать либо ультрафиолетовыми лучами (30—400 нм), либо сине-фиолетовыми. В обоих случаях возникает люминесценция в цветовой гамме всего или большей части видимого спектра, что дает цветное изображение.

Объект, не дающий явления люминесценции, окрашивают специальными красителями — флюорохромами, после чего нефлюоресцирующие компоненты препарата начинают проявлять явления флюоресценции. Из синтетических флюорохромов наилучшие результаты дают акридин оранжевый, корифосфин, примулин, родамин, ФИТЦ (флюоресцеина изотиоцианат), которые обычно применяют в виде слабых водных растворов. Этот вид люминесценции носит название наведенной, вторичной, в отличие от первичной собственной флюоресценции, нередко проявляемой витаминами, многими пигментами, некоторыми жировыми веществами и антибиотиками, встречающимися в живых организмах, а также некоторыми продуктами нормального и патологического обмена. В медицинской микробиологии

применяют два метода люминесцентной микроскопии: флуорохромирования и флуоресцирующих антител.

Метод флуорохромирования почти не отличается от общеизвестных методов окрашивания анилиновыми красителями, хотя и требует меньше времени (доли минуты). В бактериологии этот метод применяется для диагностики таких инфекционных форм, как туберкулез, дифтерия, гонорея, возвратный тиф и др.

Кроме перечисленных, отечественная промышленность выпускает микроскопы других типов и приспособления к ним. Из них следует назвать ультрафиолетовый, поляризационный, интерференционный, анаптральный и стереоскопический микроскопы.

2.5. СПОСОБЫ ОКРАСКИ

Окрашенные тела микроорганизмов резко отличаются от общего фона препарата, что позволяет установить:

а) ориентировочно состав микробного пейзажа изучаемого объекта;

б) степень чистоты выделяемой культуры;

в) некоторые морфологические особенности микроорганизмов (форму, размеры, наличие спор, жгутиков, капсул).

Приготовление окрашенного препарата состоит из нескольких последовательных операций: подготовки мазка, высушивания, фиксации, окраски. Для этого используют совершенно чистые обезжиренные стекла. Наиболее простой способ обезжиривания состоит в натирании предметного стекла кусочком сухого мыла, а затем протирании чистой марлей. Капля воды, нанесенная на хорошо подготовленную поверхность, легко расплывается.

При взятии бактериальной культуры поступают следующим образом:

1) нагревают до покраснения бактериологическую петлю в пламени; петлю держат в правой руке за петледержатель;

2) берут пробирку с культурой в левую руку так, чтобы видеть поверхность питательной среды; вращательным движением вынимают пробку из пробирки, прижимая ее мизинцем и безымянным пальцем правой руки к ладони;

3) обжигают край пробирки, осторожно вводят петлю и берут материал;

4) вынимают петлю, обжигают край пробирки, закрывают ее пробкой.

Если препарат готовят из бактериальной культуры, выращенной на плотной питательной среде, то на предметное стекло предваритель-

но наносят каплю стерильного физиологического раствора или стерильной водопроводной воды.

Взятый материал осторожно круговыми движениями распределяют по стеклу ровным тонким слоем, после чего петлю немедленно стерилизуют в пламени.

Следует помнить, что в этот период происходит работа с живыми микроорганизмами, поэтому резкие движения могут привести к разбрызгиванию материала и повлечь за собой инфицирование рук и окружающих предметов. Для приготовления мазка из гноя или мокроты используют стерильные препаровальные иглы, с помощью которых кусочек субстрата помещают на середину предметного стекла, вторым стеклом покрывают сверху. Прижав одно стекло к другому, растирают материал, пока не получат тонкий мазок.

Препарат крови больного готовят по следующей методике: предметным стеклом, отступив 1—2 см от края, следует прикоснуться к капле крови, выступившей после укола. Быстро, чтобы кровь не свернулась, ребром шлифованного стекла распределить ее по всей поверхности.

Мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в токе теплого воздуха, держа предметное стекло высоко над пламенем. Нельзя допускать перегрева, так как при этом может нарушиться структура микроорганизмов.

При фиксации микроорганизмы погибают и плотно прикрепляются к поверхности стекла, не смываясь при дальнейшей обработке. Наиболее распространенным способом является фиксация в пламени. Предметное стекло (мазком вверх) троекратно проводят через пламя. При таком способе фиксации сохраняются форма бактерий, споры, зерна волютина, однако способ нельзя применять для мазков крови, мазков-отпечатков из органов, а также при выявлении спор и жгутиков. Для этих целей проводят фиксацию в этиловом спирте (20 мин), в жидкости Никифорова, состоящей из смеси равных объемов этилового спирта и эфира (20 мин), в холодном ацетоне.

Существуют простые и сложные методы окраски. При применении простых методов используется только одна краска — водный фуксин (1—2 мин) или метиленовый синий (3—5 мин). По окончании окрашивания препарат промывают струей воды до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной, и сушат его на воздухе при комнатной температуре или осторожно промокая фильтровальной бумагой.

Сложные методы окраски предусматривают последовательное использование нескольких красителей различного химического состава, что позволяет выявить определенные структуры бактериальной клет-

ки. Окрашенные тела микроорганизмов резко отличаются от общего фона препарата, что позволяет установить:

а) ориентировочно состав микробного пейзажа изучаемого объекта;

б) степень чистоты выделяемой культуры;

в) некоторые морфологические особенности микроорганизмов (форма, размеры, наличие спор, жгутиков, капсул).

Приготовление окрашенного препарата состоит из нескольких последовательных операций: подготовки мазка, высушивания, фиксации, окраски.

Окраска по Граму

Окраску необходимо проводить в следующей последовательности.

1. Окрасить мазок генцианвиолетом (2 мин, через фильтровальную бумагу).

2. Бумагу удалить, оставшуюся краску слить.

3. Окрасить мазок раствором Люголя (1 мин).

4. Раствор Люголя слить и нанести на мазок несколько капель 96%-ного спирта на 30—40 с, осторожно покачивая стекло.

5. Тщательно смыть спирт водой.

6. Окрасить водным фуксином (2 мин).

7. Промыть водой и высушить.

Все бактерии по отношению к окраске по Граму делятся на грамположительные — темно-фиолетового цвета и грамотрицательные — красного. Способность окрашиваться в тот или другой цвет зависит от их химического состава. У грамположительных бактерий в клеточной стенке отсутствуют ароматические и серосодержащие аминокислоты, отмечается низкое содержание липидов, у грамотрицательных, напротив, эти вещества содержатся в большом количестве. В результате образуется прочный химический комплекс с белком, генцианвиолетом и йодом, который не разрушается при кратковременном действии спирта. У грамотрицательных такой комплекс не образуется. Они легко обесцвечиваются под действием спирта.

Успех окраски зависит от ряда причин и прежде всего от правильности обработки спиртом. При длительном его воздействии краска может быть вымыта и из грамположительных бактерий. В таком случае в ходе дополнительной окраски фуксином они примут красный цвет (рис. 2.15). Слишком кратковременное действие спирта не позволит выявить грамотрицательные бактерии.

Кислотоустойчивые микроорганизмы обладают выраженной устойчивостью к неорганическим кислотам, спиртам и щелочам. Это связано с наличием в клеточной стенке и цитоплазме сравнительно большого количества липидов (воскоподобных веществ). Бактерии

этой группы очень плохо окрашиваются обычными красками, поэтому применяют концентрированные растворы красок с подогревом. При последующей кратковременной обработке кислотой тела микробных клеток, воспринявшие краску, не обесцвечиваются. Это позволяет отличить кислотоустойчивые бактерии от бактерий, не обладающих этим свойством. Их окрашивают по методу Циля — Нильсена, разработанному с учетом всех указанных особенностей.

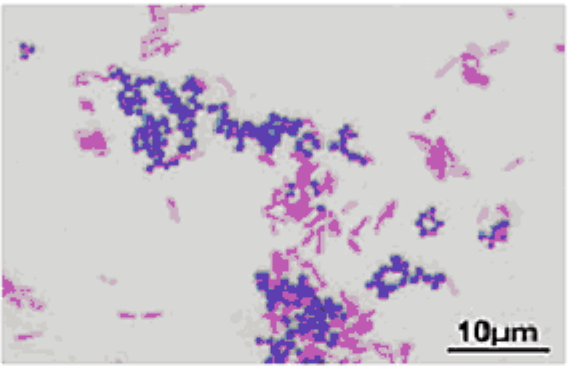

Рис. 2.15. Грамотрицательные палочки и грамположительные кокки (окраска по Граму)

Окраску необходимо проводить в следующей последовательности.

1. Нанести несколько капель карболового фуксина на фиксированный мазок, покрытый фильтровальной бумагой, и подогреть до появления паров (3—5 мин).

2. Бумагу снять, мазок охладить и обесцветить 5%-ной серной кислотой или 3%-ным солянокислым спиртом (2—4 с).

3. Тщательно промыть водой.

4. Окрасить леффлеровской синькой (3—5 мин).

5. Промыть водой и высушить.

Кислотоустойчивые бактерии в результате такой окраски становятся рубиново-красными, а остальные — синими (рис. 2.16).

В живом состоянии микроорганизмы исследуют с целью выявления их формы, подвижности или определения прижизненной внутренней структуры. Изучают нативные и окрашенные препараты, используя методы «раздавленной» или «висячей» капли.

В центре влажного препарата быстро возникает недостаточность кислорода. В сущности именно это помогло Пастеру открыть анаэробный обмен: наблюдая за препаратом, он заметил, что облигатные анаэробы сохраняли подвижность только в центре, но не по краям.

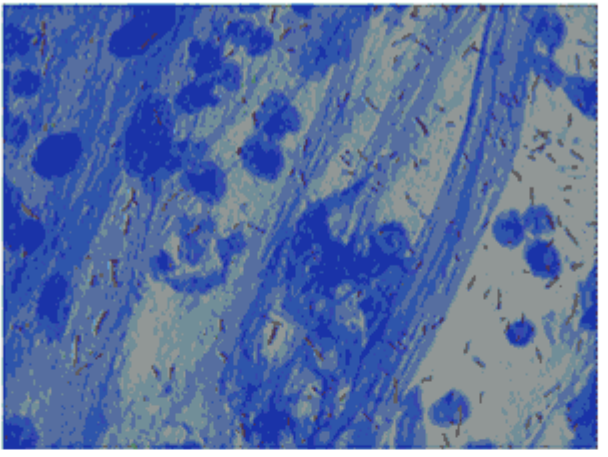

Рис. 2.16. Кислотоустойчивые бактерии

Подвижные микроорганизмы иногда могут адсорбироваться на стекле; в таких случаях подвижность легче наблюдать в «висячей» капле.

При изучении подвижности микроорганизмов необходимо отличать истинную подвижность от броуновского движения, которое является следствием ударов о бактерии движущихся в растворе молекул и выявляется в виде колебаний. Многие подвижные микроорганизмы движутся очень быстро, что затрудняет точное наблюдение. Добавляя к суспензии микроорганизмов метилцеллюлозу, можно уменьшить скорость их движения и создать условия, при которых движение жгутиков становится видимым.

Учебно-методические материалы

Практическое занятие на тему **«Методы окраски бактерий»**.

Вопросы и задания для предварительного изучения

1. В чем различия между грамположительными и грамотрицательными бактериями?
2. Каковы особенности окраски спор?
3. Перечислите особенности окраски капсул.
4. Каковы правила ухода за микроскопом?

Глава 3
ФИЗИОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

Студент должен знать: особенности питания и дыхания бактерий и способы их культивирования на плотных и жидких питательных средах.
Ключевые слова и термины: метаболизм. Аэробы. Анаэробы. Аутотрофы. Гетеротрофы. АТФ. Брожение. Ферменты. Рост бактерий. Размножение бактерий.

3.1. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ. ПИТАНИЕ, ДЫХАНИЕ, РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Под метаболизмом следует понимать совокупность двух противоположных, но взаимосвязанных процессов — катаболизма, или энергетического метаболизма, и анаболизма, или пластического метаболизма.

При катаболизме происходит выделение энергии, которая аккумулируется в молекулах АТФ, а при анаболизме эта энергия расходуется на синтез составных частей микробной клетки. Взаимосвязь анаболизма и катаболизма выражается также в том, что на определенных этапах метаболизма образуются одинаковые промежуточные продукты (амфиболиты), которые используются в обоих процессах.

Метаболизм бактерий чрезвычайно разнообразен. В качестве питательных веществ микробные клетки используют различные органические и минеральные соединения. В соответствии с законом сохранения энергии все функции живого организма, требующие затраты энергии, должны осуществляться за счет внешних источников энергии, которые бывают двоякого рода.

Бактерии-аутотрофы создают органические соединения из неорганических веществ (CO_2 и H_2O), используя дополнительные источники энергии. *Бактерии-гетеротрофы* используют в качестве источника энергии готовые органические «питательные вещества». Они не могут создавать органические соединения из неорганических и живут за счет аутотрофных организмов и их биосинтетических процессов.

При распаде органических веществ химически связанная энергия освобождается (катаболизм, диссимиляция). Этот распад без участия кислорода (анаэробные условия) приводит к образованию органических продуктов, богатых энергией, таких как органические кислоты или спирт-этанол (*брожение*), а при использовании кислорода (аэробные условия) — бедных энергией конечных продуктов CO_2 и H_2O (*дыхание*).

Суммарные уравнения дыхания складываются из двух процессов:

- постепенное расщепление субстрата с отнятием водорода, который связывается с коферментами;
- постепенное окисление водорода в результате переноса его на кислород.

Расщепление углеводов происходит в результате последовательного воздействия на субстрат различных ферментов. Этот процесс начинается с гликолиза, после чего пути дыхания и брожения расходятся. Гликолиз — это процесс окислительного расщепления, происходящий в цитоплазме бактерий и ведущий от фруктозо-1,6-бифосфата к пировиноградной кислоте — промежуточному продукту, имеющему большое значение.

Фруктозо-1,6-бифосфат сначала расщепляется на два изомерных продукта. Один из них в результате окисления превращается в фосфоглицериновую кислоту, из которой затем образуется пировиноградная кислота. Окисление катализирует дегидрогеназа (фермент, отщепляющий водород). Водород присоединяется к коферменту NAD+ (никотиамидадениндинуклеотид). Восстановленный кофермент NAD·H — один из наиболее универсальных переносчиков водорода.

Для сохранения энергии окисления в форме АТФ образуется высокоэнергетический промежуточный продукт — 1,3-дифосфоглицериновый альдегид. Затем фосфатная группа (вместе с энергией) переносится на АДФ и в результате последующих трансформаций превращается в высокоэнергетическое соединение АТФ.

Таким образом, продуктами гликолиза являются пировиноградная кислота, водород в форме NAD·H и энергия в форме АТФ. При разных видах брожения дальнейшая судьба продуктов гликолиза — пировиноградной кислоты и NAD·H — различна.

При молочнокислом брожении (стрептококки, лактобактерии) водород переносится на пировиноградную кислоту и образуется молочная кислота:

$$CH_3COCOOH + NAD{\cdot}H + H^+ \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + NAD^+$$

Пировиноградная кислота — Молочная кислота

При спиртовом брожении (сахаромицеты) от пировиноградной кислоты отщепляется CO_2, а затем промежуточный продукт ацетальдегид восстанавливается в этиловый спирт (этанол) в результате переноса водорода:

$$CH_3COCOOH \longrightarrow CO_2 + CH_3CHO$$

$$CH_3CHO + NAD{\cdot}H + H^+ \longrightarrow CH_3CH_2OH + NAD^+$$

Ацетальдегид — Этанол

В аэробных условиях пировиноградная кислота (ПВК) подвергается окислительному декарбоксилированию в цикле трикарбоновых кислот до конечных продуктов: CO_2 и H_2O. Непосредственным реакциям цикла предшествует подготовительная фаза — окисление пировиноградной кислоты до ацетилкоэнзима А (ацетил CoA):

$$ПВК + NAD^+ + CoA \longrightarrow Ацетил\text{-}CoA + NADH + H^+ + CO_2.$$

Все это катализируется пируватдегидрогеназной системой с использованием пяти коферментов: тиамидинфосфат, амид липоевой кислоты, коэнзим А, FAD, NAD. При аэробном окислении 1 моля глюкозы клетка получает 38 молей АТФ, тогда как при гликолизе только две.

В цикле трикарбоновых кислот от субстратов отщепляются протоны и электроны. Они поступают на коферменты NAD+ и FAD+, которые передают их в дыхательную цепь, образованную окислительно-восстановительными ферментами, находящимися на плазматической мембране. Передвигаясь от одного переносчика электронов к другому, электроны опускаются на все более низкие энергетические уровни, отдавая порциями свою энергию. В последнем звене цепи они восстанавливают молекулярный кислород. Освобожденная при переносе электронов по дыхательной цепи энергия запасается в фосфатных связях АТФ. Окислительно-восстановительные ферменты представлены дегидрогеназами, флавопротеидами, цитохромами, а также убихиноном и белками, содержащими железо и серу.

Аутотрофный метаболизм осуществляется патогенными бактериями путем хемосинтеза при окислении неорганических соединений:

Серные бактерии $H_2S + ½\ O_2 \longrightarrow S + H_2O$;

Нитритные бактерии $NH_3 + {}^3/_2\ O_2 \longrightarrow HNO_2 + H_2O$;

Нитратные бактерии $HNO_2 + ½\ O_2 \longrightarrow HNO_3$;

Водородные (метанобразующие) бактерии $H_2 + ½\ O_2 \longrightarrow H_2O$.

Хемосинтез (в отличие от фотосинтеза) — облигатно аэробный процесс. В зависимости от природы доноров электронов хемотрофы подразделяются на *хемолитотрофы* и *хемоорганотрофы*. Неорганические вещества являются донорами электронов для литотрофов, а органические вещества являются донорами электронов для органотрофов.

Для синтеза аминокислот, пуринов, пиримидинов, некоторых витаминов бактерии нуждаются в доступном источнике азота. Одни из них способны усваивать молекулярный азот из атмосферы (азотфиксирующие бактерии), другие ассимилируют только азотсодержащие органические соединения.

Бактерии, способные синтезировать все необходимые им органические соединения из глюкозы и солей аммония, называют *прототрофами*. В отличие от них микроорганизмы, не способные синтезировать какое-либо из жизненно необходимых соединений, называют *ауксотрофами*. Они ассимилируют эти соединения и другие факторы роста в готовом виде из окружающей среды или организма хозяина. Ауксотрофами чаще всего являются патогенные или условно-патогенные для человека бактерии.

Кроме азота и углерода всем микроорганизмам для биосинтетических реакций необходимы соединения, содержащие фосфор, серу, а также ионы магния, калия, кальция, железа и другие микроэлементы.

Потребность того или иного микроорганизма в определенных ростовых факторах используется для дифференциации и идентификации бактерий, а также при изготовлении питательных сред.

Многие бактерии нуждаются в тех или иных аминокислотах (одной или нескольких), поскольку не могут их самостоятельно синтезировать. Клостридии нуждаются в лейцине и тирозине, а стрептококки — в лейцине и аргинине и др. Эти бактерии называют ауксотрофными по тем или иным аминокислотам, которые они не способны синтезировать.

Пуриновые и пиримидиновые основания и их производные (аденин, гуанин, цитозин, урацил, тимин и др.) являются факторами роста для разных видов стрептококков, некоторые азотистые основания

нужны для роста стафилококков и других бактерий. В нуклеотидах нуждаются некоторые виды микоплазм.

Липиды, в частности компоненты фосфолипидов — жирные кислоты, нужны для роста некоторых стрептококков и микоплазм. Все виды микоплазм ауксотрофны по холестерину и другим стеринам, что отличает их от других прокариот. Эти соединения входят в состав их цитоплазматической мембраны.

Витамины группы В входят в состав коферментов и (или) их простетических групп. Многие бактерии ауксотрофны по определенным витаминам. Например, возбудители дифтерии нуждаются в никотиновой кислоте или ее амиде, который входит в состав НАД и НАДФ, стафилококки, пневмококки и бруцеллы — в тиамине (В1), входящем в состав пирофосфата. Кроме того факторами роста для многих бактерий являются фолиевая кислота, биотин, а также гемы — компоненты цитохромов. Последние необходимы гемофильным бактериям и возбудителям туберкулеза и др.

Метаболиты и различные ионы проникают в микробную клетку путем пассивной диффузии, облегченной диффузии, активного транспорта и при участии фосфотрансферазной системы. Два первых пути не требуют энергетических затрат. Облегченная диффузия протекает при участии ферментоподобных белков — пермеаз. Этими путями в клетку переносится ограниченное количество соединений. Большинство других веществ транспортируется в клетку активным путем с помощью специфических пермеаз, локализованных в цитоплазматической мембране. Данный процесс требует энергии и происходит даже в тех случаях, когда концентрация упомянутых соединений в среде ниже, чем в микробной клетке. При этом каждая пермеаза переносит в клетку только определенную аминокислоту или другое соединение. В процессе переноса может произойти химическая модификация вещества, например, фосфорилирование углеводов при участии соответствующих ферментов.

Микробы синтезируют самые разнообразные ферменты. Ферментный состав любого микроорганизма определяется его геномом и является достаточно стабильным признаком. Поэтому определение сахаролитических, протеолитических и других ферментов, образуемых определенными видами бактерий, широко применяется для их идентификации. Вместе с тем многие ферменты (нейраминидаза, гиалуронидаза, коагулаза и др.) способствуют проявлению патогенных свойств у возбудителей некоторых инфекционных заболеваний, по-

скольку субстратом их действия являются вещества, входящие в состав клеток и тканей организма человека.

Одни ферменты микроорганизмов локализуются в цитоплазме, цитоплазматической мембране и периплазматическом пространстве, другие выделяются в окружающую среду. Ферменты, которые постоянно синтезируются в микробных клетках в определенных концентрациях, называют конститутивными. К ним относятся ферменты гликолиза. Ферменты, концентрация которых резко возрастает при наличии соответствующего субстрата, называют индуцибельными (индукция субстратом). К ним относятся ферменты транспорта и катаболизма лактозы — галактозидпермеазы и ферменты, разрушающий пенициллин, — β-лактамазы. В отсутствие субстрата они находятся в бактериальной клетке в следовых концентрациях, а при наличии соответствующего индуктора их количество резко возрастает.

Функциональная активность ферментов и скорость ферментативных реакций зависят от условий, в которых находится данный микроорганизм, и прежде всего от температуры среды и ее pH. Для многих патогенных микроорганизмов оптимальными являются температура 37 °С и pH 7,2—7,4.

Микроорганизмы синтезируют моно-, олиго-, полисахариды и другие соединения, в состав которых входят углеводы. Аутотрофы синтезируют глюкозу из углекислого газа (CO_2) атмосферного воздуха. Гетеротрофы синтезируют глюкозу из углеродсодержащих соединений с длиной цепи С2—С3. В обоих случаях используются в основном реакции гликолиза, идущие в обратном направлении.

Большинство прокариот способны синтезировать все аминокислоты из пирувата, образующегося в гликолитическом цикле, из α-кетоглутарата и фумарата, образующихся в цикле трикарбоновых кислот. Источниками энергии являются молекулы АТФ. Вместе с тем многие прокариоты так же, как эукариоты, могут получать аминокислоты из молекул белка, которые предварительно расщепляются ими с помощью протеаз и пептидаз. Образовавшиеся олигопептиды и аминокислоты переносятся в микробные клетки, где включаются в метаболические пути биосинтеза или подвергаются дальнейшему расщеплению. Ауксотрофные по некоторым аминокислотам прокариоты (ряд патогенных бактерий, микоплазмы, спирохеты) потребляют их в готовом виде в организме хозяина.

Липиды бактерий представлены жирными кислотами, фосфолипидами, воском, терпенами, каротиноидами, которые содержат длинноцепочечные насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты.

Многие микроорганизмы синтезируют ненасыщенные жирные кислоты с двойными связями, которые формируются из соответствующих насыщенных кислот. У аэробов этот процесс требует присутствия кислорода. Микоплазмы получают жирные кислоты в готовом виде из клеток хозяина или из питательной среды.

Центральную роль в биосинтезе фосфолипидов играет цитидинфосфатглицерид, являющийся непосредственным предшественником фосфатидилглицерина, фосфатидилинозита и фосфатидилглицерофосфата. Остальные фосфолипиды образуются путем ферментативных превращений этих соединений.

Для роста и размножения бактерий необходимы минеральные соединения — ионы NH_4+, K+, Mg_2+ и др. Ионы аммония используются некоторыми бактериями для синтеза аминокислот, ионы калия — для связывания тРНК с рибосомами. Благодаря значительной внутриклеточной концентрации ионов калия в бактериальных клетках поддерживается высокое осмотическое давление. Ионы магния выполняют роль кофактора в ряде ферментативных процессов. Ионы трехвалентного железа входят в состав цитохромов и других гемопротеидов. Для ряда патогенных и условно-патогенных бактерий (эшерихии, шигеллы и др.) потребление трехвалентного железа в организме хозяина затруднено из-за нерастворимости его соединений при нейтральных и слабощелочных значениях pH. Некоторые микроорганизмы вырабатывают особые вещества — сидерофоры, которые связывают трехвалентное железо и делают его соединения растворимыми и транспортабельными.

Как и все живые существа, бактерии все время растут. Под ростом бактерий следует понимать увеличение количества клеток и клеточной массы. Бактерии обычно размножаются бесполым путем — делением. Из одной клетки образуются две, каждая из которых делится в свою очередь. Такое деление при благоприятных условиях может продолжаться бесконечно долго. Вначале делится нуклеоид, затем между двумя будущими клетками образуется перегородка, состоящая из двух слоев цитоплазматической мембраны. Затем между этими двумя слоями появляется материал, из которого образуются два слоя клеточной оболочки. После расслоения клеточных оболочек клетки расходятся.

Грамположительные бактерии делятся посредством образования перегородки, вырастающей от клеточной стенки к центру. У микобактерий перегородка образуется внутри клетки, затем расщепляется на два слоя и разделяет клетку на две. Грамотрицательные бакте-

рии, как правило, истончаются в центре и разделяются перегородкой на две клетки.

Скорость размножения бактерий зависит от состава среды, температуры, условий питания, влажности и ряда других факторов. При благоприятных условиях многие бактерии делятся через 20—30 мин.

Недостаток пищи и накопление продуктов распада ограничивают скорость размножения. В проточной среде с непрерывно обновляющимся составом бактерии могут делиться каждые 15 мин. Скорость размножения различных видов бактерий неодинакова даже при наличии тождественных условий. Процесс размножения бактерий в свежей питательной среде имеет ряд этапов (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Фазы размножения бактерий

Стационарная фаза — период задержки размножения. В этот период бактерии, внесенные в свежую питательную среду, не размножаются, а адаптируются к новым условиям. Эта фаза длится 1—2 ч. Лаг-фаза — бактерии приспосабливаются к новой среде и к последующему размножению в ней. Клетки к концу лаг-фазы увеличивают свой объем. Длительность лаг-фазы зависит как от внешних условий, так и от возраста бактерий и их видовой специфичности. Лог-фаза развития — время интенсивного логарифмического или экспоненциального размножения. В этот период размножение бактерий идет с максимальной скоростью, число клеток в этот период увеличивается в геометрической прогрессии.

Вслед за этими фазами наступает стадия, характеризующаяся постепенным уменьшением количества жизнеспособных бактерий. Это является следствием истощения источников энергии, накоплением продуктов метаболизма и других факторов.

Культура бактерий в ограниченном объеме питательной среды называется периодической, и описанные фазы роста характерны именно для таких культур. Если благоприятные для роста бактерий условия поддерживать путем подачи свежей питательной среды и оттока продуктов распада, то их культивирование станет непрерывным. Это имеет место при различных биотехнологических процессах.

3.2. ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИКИ БАКТЕРИЙ

Современная биология и генетика обязаны своими выдающимися достижениями микробиологии, которая предоставила им микроорганизмы в качестве экспериментальных объектов. Важность и актуальность исследований в области генетики микроорганизмов заключается прежде всего в том, что они впервые создали методы управления наследственностью.

В 1865 году чешский ученый Грегор Мендель открыл существование генов как дискретных единиц наследственности. В 1928 году Ф. Гриффитс впервые осуществил трансформацию невирулентных пневмококков в вирулентные. Он заразил белых мышей смесью бактерий, состоящей из убитых нагреванием, следовательно, потерявших вирулентность капсульных пневмококков и живых бескапсульных невирулентных пневмококков. В контрольных опытах эти группы бактерий, введенные порознь, мышей не убивали. Однако в опытной группе мыши погибли и из крови их были выделены живые пневмококки, приобретшие капсулу убитых пневмококков. Следовательно, убитые капсульные пневмококки содержали вещество, способное передать признак капсулообразования (вирулентности) живым пневмококкам. Механизм трансформации оставался неизвестным.

В 1953 году Ф. Крик и Д. Уотсон определили структуру гена, основанную на двойной спирали ДНК. Это открытие показало, каким образом ген выполняет свои три важнейшие функции:

1) непрерывность наследственности — полуконсервативным механизмом репликации ДНК;

2) управление структурами и функциями организма — с помощью генетического кода, использующего запас всего из четырех оснований (букв) — аденин (А), тимин (Т), гуанин (Г), цитозин (Ц);

3) эволюцию организмов благодаря мутациям и генетическим рекомбинациям.

Работами Ф. Крика, С. Бреннера, М. Ниренберга, С. Очоа, Х. Кораны с использованием микробных объектов к 1966 г. генетический код был расшифрован, показана его триплетность, неперекрываемость и универсальность для всех живых организмов.

Ученые оценили удобство работы с бактериями и вирусами, обусловленное их свойствами: коротким периодом генерации, быстрым накоплением популяций с огромным количеством особей, простотой культивирования и использования. На бактериальных объектах были открыты информационные, рибосомальные, транспортные РНК и установлен механизм синтеза белка. Д. Ледерберг и Э. Татум открыли у бактерий конъюгацию, В. Хейс — плазмиду, определяющую половую полярность бактерий. Ф. Жакобом и Э. Вольманом создано учение о плазмидах. Разработанная на модели кишечной палочки Ф. Жакобом и Ж. Моно концепция оперона стала универсальной концепцией генетического контроля экспрессии генов.

В 1972 году возникла и бурно развивается генная инженерия. Ключевое значение для ее возникновения и управления наследственностью имело обнаружение в 1970 г. Г. Теминым, С. Мизутани, Д. Балтимором у некоторых онкогенных вирусов фермента — обратной транскриптазы (ревертаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза). Это позволило получать на матрице информационной РНК копийный ДНК-ген и использовать его в генной инженерии. В биотехнологии, основанной на генной инженерии, широко используются бактериальные ферменты, плазмидные и вирусные векторы, а также бактерии как основные продуценты биологических продуктов.

Прокариоты (бактерии) имеют морфологически обособленные клеточные структуры, содержащие генетическую информацию, — нуклеоиды. Нуклеоид состоит из одной свернутой в клубок хромосомы, которая свободно располагается в цитоплазме, но связана с определенными рецепторами на цитоплазматической мембране. Поэтому бактериальная клетка в отличие от эукариот гаплоидна, т.е. содержит один набор генов.

В некоторых условиях клетки бактерий могут содержать совершенно идентичные по набору генов копии хромосомы, и бактерии остаются гаплоидными. В отличие от всех других организмов бактерии обладают уникальным свойством изменять массу своей ДНК, регулируя в зависимости от условий обитания содержание копий своих

генов, эквивалентно массе 2, 4, 6, 8 хромосом. Это позволяет им регулировать скорость собственного размножения — одно из главных условий, обеспечивающих выживание бактерий в окружающей среде, а следовательно, и сохранение вида в природе.

Бактериальная хромосома представляет собой двухцепочечную молекулу ДНК (кольцевую хромосому), содержащую гены, расположенные в линейном порядке. Поскольку длина хромосомы (у *E. coli* около 1000 мкм) во много раз превышает длину бактерии (1,5—3,0 мкм в среднем), хромосома компактно упакована в суперспирализованной форме в виде 12—80 петель, связанных с сердцевинной структурой, представленной особым классом РНК — 4,5 S РНК. Геном (вся совокупность нуклеотидов, содержащихся в хромосоме у данного индивидуума) и генотип (вся совокупность индивидуальных генов у данного индивидуума) у бактерий не однозначны, но близки, так как большинство генов содержатся в хромосоме в единственном числе, в отличие от эукариот, содержащих до 30—50% повторяющихся последовательностей нуклеотидов в геноме. Поэтому размеры геномов у бактерий, вирусов, плазмид выражают либо в молекулярной массе, либо количеством нуклеотидных пар геномной нуклеиновой кислоты, либо количеством генов. Эти значения сопоставимы, так как в среднем каждый ген состоит из 1000 пар нуклеотидов, а масса одного нуклеотида ДНК — 500 дальтон. Так, хромосома *E. coli* имеет молекулярную массу $2{,}8 \times 10^9$ дальтон, количество нуклеотидных пар $3{,}8 \times 10^6$ и содержит 2500—3000 генов.

Хромосома бактерии состоит из двух типов генов: структурных (цистронов), кодирующих синтез определенной полипептидной цепи, и регуляторных (или акцепторных), регулирующих активность генов (регуляторы, операторы, промоторы, аттенуаторы, терминаторы и др.). Основной структурно-функциональной единицей хромосомы является оперон. Это группа структурных генов-цистронов, физически сцепленных друг с другом и с геном-оператором, который управляет их выражением. В свою очередь оперон или их группа находится под управлением одного гена-регулятора, что представляет более сложную структурно-функциональную единицу — регулон.

Гены в хромосоме располагаются линейно, поэтому можно изучать их последовательность и составлять хромосомную (генетическую) карту. Для этого изучают время переноса соответствующих генов при конъюгации бактерий. Локализацию генов на хромосоме определяют в минутах их переноса, в частности у кишечной палочки — от 0 до 100 мин.

В настоящее время основным методом изучения организации геномов живых организмов является секвенирование — определение последовательности расположения нуклеотидов в составе ДНК генов. Предварительно с помощью методики клонирования получают большое количество необходимых фрагментов ДНК. Уже полностью изучена нуклеотидная последовательность ДНК хромосом 20 важнейших бактерий (*Y. pestis, E. coli, P. aeruginosa* и др.).

Некоторые гены и группы генов хромосомы бактерий и плазмид бактерий относятся к транспонируемым генетическим элементам, т.е. генетическим структурам, способным в интактной форме перемещаться внутри данного генома или переходить от одного генома к другому, например, от плазмидного к бактериальному и наоборот. Транспонируемые генетические элементы представлены IS-элементами и транспозонами. IS-элементы, или вставочные последовательности (от англ. insertion sequence), имеют обычно небольшие размеры, не превышающие двух тысяч пар оснований. Они несут только один ген, кодирующий белок транспозазу, с помощью которой IS-элементы встраиваются в различные участки хромосомы. Их обозначают: IS1, IS2, IS3 и т.д. Транспозоны (Тп) представляют собой более крупные сегменты ДНК, фланкированные инвертированными IS-элементами. Помимо генов, обеспечивающих их транспозицию, они содержат другие различные гены. Внутри крупного транспозона могут находиться более мелкие транспозоны.

Транспозоны способны встраиваться в различные участки хромосомы или переходить от одного генома в другой. Очень часто транспозоны содержатся в составе R-плазмид. Транспозоны обнаружены в составе геномов бактерий, плазмид, вирусов, эукариот. Им принадлежит важная роль в изменчивости и эволюции живой материи. Обозначают транспозоны порядковым номером: Тп1, Тп2, Тп3 и т.д.

У многих бактерий генетическая информация может находиться помимо хромосом в особых дополнительных генетических структурах — плазмидах. Плазмида (экстрахромосомный генетический элемент) представляет собой репликон, который стабильно наследуется в экстрахромосомном состоянии. Первую плазмиду F-фактор (фактор колициногенности) обнаружил у *E. coli* в 1925 г. А. Грация. В 1953 году У. Хейс открыл половую плазмиду, контролирующую конъюгацию у бактерий; в 1963 г. Т. Ватанабе описал R-фактор, плазмиду, контролирующую лекарственную резистентность бактерий. Некоторые ученые относят плазмиды к живым организмам — особому классу вирусов. По определению А. Коротяева, «плазмиды — наипростейшие

организмы, лишенные оболочки, собственных систем синтеза белка и мобилизации энергии и представляющие собой особый класс абсолютных внутриклеточных паразитов, наделяющих своих бактерий-хозяев полезными для них свойствами».

Все известные плазмиды представляют собой небольшие, ковалентно-замкнутые в кольцо суперспирализованные молекулы двунитевой ДНК, размеры которых варьируют от 1,5 до 200 МД (от 1500 до 400 000 пар нуклеотидов). Чем больше молекулярная масса, тем сложнее набор генов и многообразнее функции плазмид. Плазмиды содержат гены саморепликации; гены, контролирующие самоперенос или мобилизацию на перенос; другие гены, определяющие специфические функции самой плазмиды. Например, F-плазмиды определяют донорские функции клетки и способность ее к конъюгации; Ent-плазмиды — синтез энтеротоксинов; биодеградативные плазмиды — разрушение различных органических и неорганических соединений.

Для плазмид характерны следующие свойства:

- саморегулируемая репликация;
- явление поверхностного исключения (механизм, который не позволяет проникнуть в клетку, уже содержащую плазмиду, другой, родственной ей, плазмиде);
- явление несовместимости (две близкородственные плазмиды не могут стабильно сосуществовать в одной клетке, одна из них подвергается удалению);
- контроль числа копий плазмиды на хромосому клетки (различают малокопийные — 1—4 копии и многокопийные — от 12 до 38 копий плазмиды);
- контроль стабильного сохранения плазмид в клетке-хозяине;
- контроль равномерного распределения дочерних плазмид в дочерние бактериальные клетки;
- способность к самопереносу (у конъюгативных плазмид);
- способность к мобилизации на перенос (у неконъюгативных плазмид);
- способность наделять клетку-хозяина дополнительными важными биологическими свойствами, способствующими выживанию бактерий и плазмид в природе.

Плазмиды распространяются среди бактерий двумя способами: по вертикали — путем передачи от родительской клетки дочерним клеткам в процессе клеточного деления бактерий; по горизонтали — путем переноса между клетками в популяции бактерий независимо от клеточного деления. Перенос плазмид между бактериальными клет-

ками осуществляется по механизму самопереноса путем конъюгации, контролируемой tra-опероном плазмиды. В зависимости от наличия этого оперона плазмиды подразделяют на конъюгативные и неконъюгативные. Возможны также другие механизмы переноса плазмид (мобилизации на перенос неконъюгативных плазмид с помощью конъюгативных плазмид, трансформации, трансдукции).

Классификация плазмид основана на их уникальном свойстве несовместимости, т.е. неспособности родственных плазмид стабильно сосуществовать в одной клетке. Она проявляется после проникновения плазмиды в клетку, уже содержащую близкородственную ей плазмиду. Плазмиды, не совместимые друг с другом, но совместимые с другими, объединяются в одну Inc-группу. Например, у энтеробактерий обнаружены 39 Inc-групп плазмид. Плазмиды, относящиеся к одной Inc-группе, обладают многими общими признаками.

Плазмиды имеют важное медицинское значение, так как контролируют синтез различных факторов патогенности бактерий и их лекарственной резистентности. Общебиологическое значение плазмид состоит в том, что они являются уникальным средством самозащиты бактерий и благоприятствуют сохранению бактерий в природе.

Передача генетической информации потомству (вегетативная репликация ДНК) осуществляется у бактерий и плазмид по универсальному механизму — полуконсервативной репликацией ДНК. При этом дочерние клетки получают ДНК хромосомы, у которой одна нить родительская (консервативная), другая нить ДНК вновь синтезирована на ее матрице, что обеспечивает очень точную передачу генетической информации (наследственность). Вегетативная репликация ДНК у бактерий начинается со строго фиксированного сайта хромосомы (oriC), который распознается ферментами, инициирующими репликацию. Она носит полуконсервативный характер, идет одновременно в двух направлениях, заканчивается в строго фиксированной точке — terminus. Поскольку цепи ДНК антипараллельны (если одна нить начинается с 5-го конца, другая — с 3-го конца), а ДНК-полимераза Ш осуществляет синтез ДНК только в направлении 5—3, репликация происходит различно на каждой нити: на одной из расплетенных нитей («прямой», «лидерной») она идет непрерывно, а на другой («отстающей») ДНК-полимераза Ш должна возвращаться, чтобы наращивать нить тоже в направлении 5—3, прерывисто, через образование сегментов Оказаки длиной у бактерий около 1000 нуклеотидов.

Скорость репликации ДНК у E. coli при 37 °С соответствует включению 2×10^3 пар нуклеотидов в 1 сек. В репликации ДНК участвует

комплекс ферментов, образующих единую структуру — реплисому. Генетический контроль репликации ДНК осуществляет большая группа генов хромосомы.

Помимо вегетативного типа у бактерий имеются конъюгативный и репаративный типы репликации ДНК. Конъюгативная репликация происходит при конъюгативном способе обмена генетическим материалом и контролируется плазмидными генами (tra-оперон). При этом осуществляется достройка второй нити ДНК, комплементарной нити, передаваемой от донора реципиенту. Репаративная репликация служит механизмом устранения из ДНК структурных повреждений или происходит на заключительном этапе генетической рекомбинации. Она контролируется хромосомными и плазмидными генами.

Информация, содержащаяся в геноме бактерий, расшифровывается, материализуется и реализуется путем биосинтеза белка. Универсальности генетического кода соответствует универсальность его расшифровки и реализации (экспрессии). Однако биосинтез белка у бактерий имеет некоторые особенности на этапе транскрипции. Гены бактерий в отличие от генов эукариот и вирусов не содержат интронов, поэтому у бактерий отсутствует процесс сплайсинга при синтезе мРНК. Сплайсинг РНК — процесс, при котором происходит вырезание интронов (некодирующих последовательностей у генов, имеющих интрон-экзонную структуру) из первичных РНК-транскриптов и сшивание экзонов, в результате которого образуется и затем транслируется зрелая мРНК. Отсутствие сплайсинга РНК у бактерий является естественным генетическим барьером в реализации генетической информации эукариот у бактерий (прокариот). Преодоление этого барьера привело к созданию генной инженерии на бактериальных объектах.

Генетическая информация реализуется микроорганизмами весьма «экономно», в соответствии с конкретными условиями их существования. «Работают» (экспрессируются) только гены, необходимые для обеспечения жизнеспособности клетки в данных условиях. Саморегуляция системы генетической информации обеспечивается наличием в ней помимо структурных генов, кодирующих белки и другие макромолекулы, особых последовательностей нуклеотидов (акцепторных или регуляторных генов), не имеющих кодирующих функций, но управляющих работой структурных генов. Как уже упоминалось, совокупность расположенных рядом структурных и регуляторных генов составляет оперон-единицу генетической регуляции. Классической моделью оперона является лактозный оперон. Рассмотрим на примере лактозного оперона кишечной палочки его устройство

и способ регуляции активности структурных генов, кодирующих синтез ферментов, участвующих в усвоении лактозы.

Начинается оперон с «участка прикрепления белка-активатора» — продукта вышестоящего регулона (Сар-белка, без которого РНК-полимераза не может связаться с опероном и начать транскрипцию). Далее на хромосоме расположен промотор — участок распознавания РНК-полимеразой и прикрепления ее. Затем следует оператор — участок, с которым связывается особый тормозящий транскрипцию белок-регулятор. После оператора расположены последовательно структурные гены z, y, a, кодирующие соответственно синтез трех ферментов, участвующих в усвоении лактозы, — Я-галактозидазы, галактозидпермеазы, тиогалактозидтрансацетилазы. Заканчивается lac-оперон терминатором — небольшим участком ДНК, служащим стоп-сигналом, прекращающим продвижение РНК-полимеразы и транскрипцию оперона. Вне lac-оперона, на другом месте хромосомы находится особый ген-регулятор, кодирующий непрерывный синтез белка-регулятора. Когда в окружающей среде нет лактозы, белок-регулятор прикрепляется к оперону и как «шлагбаум» препятствует продвижению РНК-полимеразы от промотора к структурным генам, репрессируя транскрипцию и в итоге синтез ферментов. Лактоза, если она есть в питательной среде, связывается с белком-регулятором, аллостерически изменяет его конфигурацию, в результате чего белок-регулятор уже не может прикрепляться к оператору. В итоге «шлагбаум» открыт, РНК-полимераза транскрибирует структурные гены в соответствующие мРНК, на матрице которых синтезируются ферменты, усваивающие лактозу.

Таким образом, лактоза индуцирует синтез ферментов, нужных для ее усвоения. Такие ферменты называются адаптивными или индуктивными. Рассмотренный тип регуляции активности генов называется негативным, так как в основе его лежит репрессия оперона белком-регулятором. Есть два варианта этого типа регуляции: негативная индукция, которую мы рассмотрели, и негативная репрессия.

В последнем случае в исходном положении белок-регулятор не может связываться с оператором, и синтез ферментов идет, а при наличии эффектора, обычно конечного продукта действия анаболических ферментов, белок-регулятор под его воздействием связывается с оператором и синтез ферментов репрессируется. Кроме негативного известен еще позитивный тип генетической регуляции синтеза белка. Отличие его от негативного типа заключается в том, что белковый продукт гена-регулятора не запрещает транскрипцию оперона, а наоборот, акти-

вирует ее. Этот тип регуляции также встречается у бактерий в двух вариантах — позитивной индукции и позитивной репрессии. Например, ara-оперон, контролирующий усвоение арабинозы, работает у кишечной палочки по механизму позитивной индукции.

Проявление признаков живых организмов, контролируемых генотипом, зависит от условий существования организма. Совокупность признаков организма в конкретных условиях его существования называется фенотипом. В зависимости от условий микроорганизмы одного генотипа могут иметь различные фенотипы, так как реализуется различная часть генетической информации генотипа или реализация происходит в различном диапазоне нормы реакции генотипа. Смена фенотипов при смене условий существования организма называется модификацией. Иными словами, модификации — это фенотипические различия, вызываемые внешними факторами у одинаковых в наследственном отношении микроорганизмов.

Отличительными признаками модификации у бактерий являются (три «О»):

- определенность изменчивости (определенный фактор внешней среды, условий вызывает изменение строго определенного признака);
- общность изменений (изменения признака одновременно у всех или большинства особей генетически однородной популяции);
- обратимость изменений (изменения не наследуются, после прекращения действия внешнего фактора исчезают).

В некоторых случаях у бактерий наблюдаются так называемые длительные модификации, когда изменение признака сохраняется в нескольких поколениях после прекращения действия фактора. Это обусловлено тем, что при делении клеток передаются не только структуры генотипа, но и содержимое клетки, частично сохранившее остатки веществ, образовавшихся в предыдущих условиях.

Рассмотрим пример модификационной изменчивости бактерий. При посеве разведенной культуры бактерий *Proteus vulgaris* на питательный агар через сутки выросли колонии бактерий, каждая из которых окружена зоной роения. После пересева колоний на питательный агар с желчью все колонии выросли через сутки без роения. После пересева этих колоний на исходный питательный агар все выросшие колонии вновь имели зоны роения.

Изменения фенотипа протея на среде с желчью следует считать модификацией, так как присутствует все три отличительных признака: определенность изменчивости (связь отсутствия роения с фактором — желчью), общность изменчивости (изменения у всех колоний популя-

ции), обратимость (при отсутствии желчи в питательной среде возврат бактерий к исходному фенотипу).

Возможность модификационной изменчивости бактерий следует постоянно учитывать в практической работе микробиологов. Для точной систематики и идентификации бактерий следует строго соблюдать стандартные (унифицированные) условия изучения свойств бактерий (стандартные питательные среды, тесты, реактивы, температуру и другие условия культивирования).

Первоисточником новых генов в природе являются мутации. Общепринятого определения мутации нет. Мутация от лат. mutatio — изменение генетических структур, имеющихся в клетке в данный момент, которое стабильно наследуется. Различают две группы мутаций: хромосомные аберрации, включающие 3 типа (изменение числа наборов хромосом, изменение числа отдельных хромосом, перестройки хромосом) и генные мутации. У бактерии могут быть мутации типа перестройки хромосом и генные мутации. При этом перестройки хромосом осуществляются путем делений (выпадения фрагмента хромосомы), инверсии (поворота участка хромосомы на 180°), транспозиций (вставок в какое-либо место хромосом небольших фрагментов ДНК, например, инсерционных сегментов или транспозонов). Генные мутации бывают односайтовые (в одном участке гена) или многосайтовые. Для появления мутации в гене достаточно точечного изменения одной пары нуклеотидов. По направлению мутации могут быть прямые или обратные. Прямые мутации вызывают изменения признаков организма дикого типа; обратные мутации сопровождаются реверсией к дикому типу. Восстановление исходного фенотипа в результате обратной мутации в ином участке гена или в другом гене является супрессорной мутацией. Мутация, в результате которой изменяются два и более признаков организма, называется плейотропной. Различают также спонтанные и индуцированные мутации. Спонтанные мутации возникают самопроизвольно в том смысле, что они детерминированы, но мы не знаем конкретно их причин. Индуцированные мутации вызываются воздействием определенных мутагенных факторов. К ним относятся различные виды ионизирующих излучений, ультрафиолетовые лучи, химические мутагены.

Изменчивость по механизму мутаций характеризуют определенные отличительные признаки.

1. Наследственность.

2. Низкая частота (скорость) мутирования (у бактерий 1×10^6 — 1×10^7, т.е. мутация у одной клетки из 1—10 млн). Способность давать

мутации (мутабельность) подвержена влиянию генотипа. У бактерий мутабельность резко повышается, если они имеют особые гены — мутаторы. Например, у кишечной палочки обнаружены два гена-мутатора — mut T, mut SI.

3. Ненаправленность изменчивости (т.е. неопределенность, неадекватность изменения признаков ввиду воздействующего фактора; один и тот же фактор вызывает различные мутации).

Экспериментами С. Лурия и М. Дельбрюка (флюктуационный тест), Ньюкомба (тест перераспределения) показано существование в исходных популяциях бактерий спонтанных мутантов, устойчивых к воздействующему фактору — фагу — еще до его воздействия. Методика отпечатков (реплик), разработанная Д. Ледербергом, позволила непосредственно выделять из популяции клеток мутанты до воздействия адекватного фактора или после воздействия мутагена — самые различные не адекватные по признакам.

Бактерии имеют особые системы репарации мутационных повреждений ДНК. Наиболее изучены системы: «фотореактивация», «темновая репарация», «репликативная репарация». «Фотореактивация» восстанавливает дефекты (тиминовые димеры) в ДНК, вызванные только ультрафиолетовыми лучами. При «темновой репарации» действует комплекс ферментов, восстанавливающий повреждение на одной нити ДНК путем вырезания поврежденного участка и синтеза на его месте второй нити комплементарного отрезка ДНК, замещающего дефект. Система «репликативной репарации» заменяет повреждения обеих нитей ДНК путем рекомбинации.

Другим механизмом наследственной изменчивости является обмен генетическим материалом между клетками популяций бактерий (по горизонтали). Он не создает новых элементарных признаков, но очень ускоряет создание организмов с новыми комбинациями признаков за счет перераспределения генов из разных геномов, что способствует быстрому приспособлению бактерий к условиям среды. Бактерии способны к широкому генетическому обмену между различными видами и родами, а также с бактериофагами и плазмидами. У бактерий выявлены три основные формы обмена генетическим материалом: трансформация, трансдукция, конъюгация (рис. 3.2, 3.3). Они различаются способом передачи генетического материала.

Трансформация характеризуется передачей клетке-реципиенту некоторых генов донора с помощью свободной ДНК, выделенной из генома донора. Трансформация может быть спонтанной или индуцированной. Спонтанная трансформация в естественных условиях

проявляется в появлении рекомбинантов при смешивании генетически различающихся клеток. Она протекает за счет ДНК, выделяющейся клетками в окружающую среду при их лизисе или в результате активного выделения ДНК жизнеспособными клетками-донорами. Индуцированная (искусственная) трансформация происходит при добавлении к культуре бактерий очищенной ДНК, полученной из бактерий-доноров. Для успешной трансформации необходим ряд условий, относящихся к ДНК и бактериям-реципиентам. ДНК должна быть двухцепочечной, иметь фрагменты $3—5 \times 10^6$ дальтон, быть частично или полностью гомологичной ДНК реципиента. Клетки реципиента должны обладать компетентностью, т.е. восприимчивостью, что имеет место только в определенный период жизненного цикла, обусловлено выделением клеткой особого белка «фактора компетентности» и специфическим изменением проницаемости клеточной стенки и мембраны. Процесс трансформации состоит из нескольких этапов: связывания ДНК на поверхности компетентного реципиента с «фактором компетентности», проникновения ДНК путем «втаскивания» в клетку, включения ДНК в хромосому бактерии-реципиента путем рекомбинации, экспрессии переданных генов. Эффективность генетической трансформации во много раз повышается, если смесь ДНК и трансформируемых клеток подвергнуть обработке электрическим импульсом (метод электротрансформации). В естественных условиях эффективность трансформации менее существенна, чем других форм передачи генетического материала. Клетки бактерий имеют механизм защиты генома от чужеродной ДНК — особые системы модификации и рестрикции. Эти системы защищают свою ДНК путем модификации (чаще путем ее метилирования) и разрушают чужеродную ДНК с помощью особых ферментов — рестрикционных эндонуклеаз. Частным вариантом трансформации является трансфекция, когда в клетку-реципиент, лишенную клеточной стенки, вносят ДНК бактериофага или плазмид.

Трансдукция — перенос генетического материала от клетки-донора клетке-реципиенту с помощью бактериофагов. Различают общую (неспецифическую) и специфическую трансдукцию. Механизм общей трансдукции состоит в том, что в процессе внутриклеточного размножения вирулентного фага в его головку может быть случайно включен вместо фаговой ДНК фрагмент бактериальной ДНК, равной по длине фаговой. Так возникают дефектные фаги, у которых вместо собственной геномной ДНК содержится фрагмент ДНК бактерии-донора. Такие фаги сохраняют инфекционные свойства. Они адсорби-

руются на бактериальной клетке, вводят в нее ДНК, но при этом размножения фага не происходит. В случае генетической рекомбинации привнесенного фагом фрагмента ДНК донора с хромосомой клетки-реципиента новый признак наследственно закрепляется. Таким образом, при общей трансдукции фаг является только пассивным переносчиком генетического материала.



Рис. 3.2. Трансформация и трансдукция

Специфическую трансдукцию отличает перенос строго определенного фрагмента ДНК бактерии-донора умеренными бактериофагами. Как известно, умеренными называют такие бактериофаги, которые могут интегрировать в хромосому клетки бактерий, вызывая ее лизогенизацию. Интегрированный в хромосому бактерии-донора умеренный фаг (профаг) в определенных условиях выходит из хромосомы, «прихватывая» ближайшие участки ДНК хромосомы бактерии и оставляя часть своего генома. Возникает дефектный умеренный фаг, включивший в свой геном бактериальные гены бактерии-донора. Далее трансдуцирующий фаг вносит свою ДНК в клетку бактерии-реципиента, где она вместе с фрагментом ДНК бактерии-донора интегрируется в состав хромосомы реципиента. В последующем фаг может выйти из хромосомы реципиента, но переданные им гены бактерии-донора остаются у реципиента. Примером может служить умеренный бактериофаг лямбда (λ), который всегда переносит оперон gal или опе-

рон bio. Специфическая и общая трансдукция низкочастотны (10^{-4} — 10^{-7} на 1 частицу фага). Частным вариантом специфической трансдукции является фаговая или лизогенная конверсия. Трансдуцирующий фаг, интегрируясь в хромосому реципиента, вызывает лизогенизацию бактерии и передает гены новых признаков, например, токсинообразования, дифтерийным бактериям. Однако гены, контролирующие новый признак, постоянно включены в геном таких трансдуцирующих фагов. Появление этих генов не связано с предварительным размножением фага на токсигенных донорах. Вероятно, фаг включил в геном эти гены на более ранних этапах своей эволюции. Такие трансдуцирующие фаги недефектны и вызывают фаговую конверсию с очень высокой частотой.

Конъюгация характеризуется переносом генетического материала путем непосредственного контакта между клетками. Этот процесс полярен — генетический материал передается только от бактерий-доноров к бактериям-реципиентам. Донорская функция клетки и процесс конъюгации контролируются генами конъюгационного переноса (tra-оперон), локализованными в конъюгативных плазмидах. Среди многих конъюгативных плазмид имеется плазмида F, контролирующая только указанные функции. В автономном, внехромосомном состоянии она обеспечивает донорский тип клетки F+ (мужская), образование полых ворсинок (F-пили) и свой собственный перенос в F– (женские) клетки реципиента. При этом хромосома донора не передается, а реципиенты, получившие плазмиду F, приобретают донорский тип F+. При интеграции плазмиды F в хромосому бактерии-хозяина образуются Hfr (high frequency of recombination) — штаммы бактерий с высокой частотой передачи хромосомных генов. Однако плазмида F обычно не переходит в клетку реципиента, так как находится на конце хромосомы, противоположном тому, с которого начинается ее переход.

Переход хромосомы через конъюгационный мостик между клетками через канал F-пили сопряжен с ее репликацией. При этом через мостик проходит только одна нить ДНК хромосомы, на которой в клетке реципиента синтезируется комплементарная вторая нить, и далее под контролем генов рекомбинации (rec A) хромосомы реципиента происходит интеграция переданного фрагмента ДНК в хромосому реципиента. Плазмида F может ревертировать у Hfr-штаммов в исходное внехромосомное состояние, захватив прилегающий участок бактериальной хромосомы. Таким способом формируется плазмида F' (F-прим), несущая часть хромосомных генов бактерии-хозяина, например, плазмида F' lac. Перенос генов донора в клетки реципиентов

посредством плазмид F' называется сексдукцией. При этом плазмида F' переносит свой геном, содержащий и некоторые гены донора, с высокой частотой, а хромосома бактерии-донора не передается.

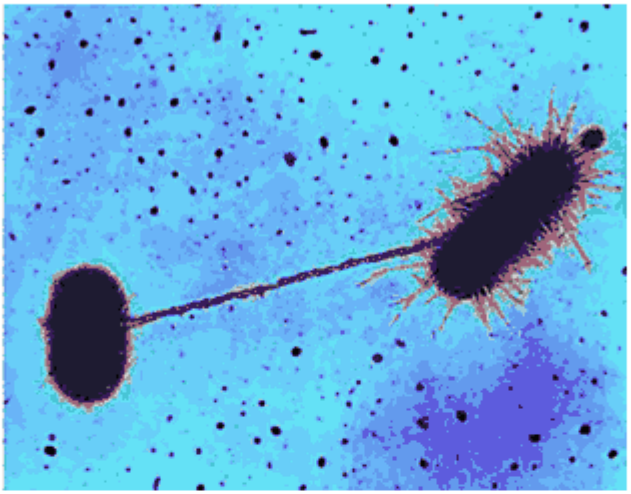

Рис. 3.3. Конъюгация

Перенос других видов конъюгативных плазмид (R, Ent, Col и др.) также происходит с высокой частотой. Следует отметить, что эффективный перенос плазмид путем конъюгации не знает «родственных» барьеров и происходит между бактериями различных видов и родов.

При любой форме обмена генетическим материалом заключительным этапом является рекомбинация между полученной ДНК и хромосомой клетки-реципиента. При переносе одной нити ДНК вначале происходит достраивание комплементарной ей нитью. Рекомбинируют между собой только двунитевые ДНК. Известны общая рекомбинация, сайт-специфическая рекомбинация и рекомбинация, контролируемая транспонируемыми элементами.

Общая рекомбинация происходит между гомологичными ДНК. Сайт-специфическая рекомбинация обусловлена наличием специфических участков у рекомбинируемых молекул ДНК, например, хромосомы *E. coli* и умеренного бактериофага лямбда. Общая и сайт-специфическая рекомбинации контролируются геном rec A. Рекомбинации, осуществляемые транспонируемыми элементами, также сайт-специфичны и определяются особыми нуклеотидными последовательностями, однако не зависят от rec A гена. Ведущая роль в процессах рекомбинации у бактерий принадлежит гену rec A. Его

продукт — белок Rec A (молекулярная масса 38 кД) обладает уникальными функциями: прочно связывается с одиночными нитями ДНК; способствует высвобождению разорванной нити из двойной спирали ДНК; удерживает вместе одиночную нить ДНК и двойную спираль ДНК; обладает свойством ДНК-зависимой АТФ-азы. Ген rec A участвует не только в процессе рекомбинации. Его продукт необходим для пострепликативной репарации, индукции профага, клеточного деления и других важных функций бактерий. Рецессивные мутации в таком гене отражаются на всех этих функциях, поэтому они получили название SOS-функций, а их совокупность представляет единую SOS-систему. Выражение любой SOS-функции зависит от активности продукта гена rec A. SOS-система срабатывает после любых повреждающих воздействий на ДНК. Поэтому ген rec A имеет основное значение в самозащите генетической системы бактерий.

Применение методов генетики для изучения генома бактерий позволило создать геносистематику бактерий. На ее основе существенно уточнена действующая классификация бактерий и созданы предпосылки разработки естественной систематики и классификации. В интересах систематики используют ряд методов. Метод гибридизации ДНК-ДНК (выявления уровня гомологии ДНК). Считается, что показатель 60—100% гомологии ДНК указывает на родство на уровне вида. Однако общепринятых критериев нет. Метод гибридизации ДНК с рРНК выявляет генетические связи между участком ДНК, контролирующим синтез рРНК, и нуклеотидами рРНК. Цистроны, ответственные за синтез рРНК, консервативны и позволяют выявить родственные связи на уровне рода, семейства. Наиболее надежным является метод секвенирования ДНК. Этот метод выявляет последовательность нуклеотидов в отдельных фрагментах ДНК или всей ДНК хромосомы. Лучшим объектом исследования (наиболее консервативным) является участок ДНК, контролирующий синтез 16S рибосомальной РНК бактерий. ДНК этого фрагмента клонируют, затем секвенируют. Метод секвенирования ДНК позволяет выявить родство бактерий на уровне царства, класса, семейства, рода, но недостаточно чувствителен для установления вида. Этот метод позволяет выявлять эволюционные связи бактерий и является основным в геносистематике. У наиболее важных бактерий изучена методом секвенирования полная последовательность нуклеотидов ДНК хромосомы (кишечная палочка, синегнойная палочка и др.).

Раскрыт генетический механизм весьма важной для медицины проблемы приобретенной лекарственной устойчивости бактерий.

Установлено, что основное значение в быстром формировании устойчивости бактерий к антибиотикам имеют R-плазмиды, несущие гены устойчивости к 1—10 антибиотикам в любых сочетаниях. Они могут передавать гены антибиотикорезистентности чувствительным бактериям за несколько минут, превращая в устойчивую всю популяцию бактерий в организме. До сих пор нет эффективных средств удаления R-плазмид или блокады их передачи. Пока реальным достижением является применение препаратов, блокирующих активность ферментов, разрушающих антибиотики, которые контролируются R-плазмидами. Например, для инактивации бета-лактамазы используют клавулановую кислоту, сульбактам, тазобактам в сочетании с антибиотиками бета-лактамной группы.

Установлен генетический контроль факторов патогенности бактерий. Показана возможность локализации этих генов в геномах бактерий, бактериофагов, плазмид. Выявлены механизмы формирования патогенных штаммов среди условно-патогенных бактерий. Эти сведения позволяют выявлять патогенные бактерии молекулярно-биологическими методами и целенаправленно получать авирулентные вакцинные штаммы микроорганизмов.

Крупным достижением генетики является разработка метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), отмеченного Нобелевской премией (Мюллис К., 1993). На основе ПЦР создана принципиально новая универсальная система индикации микроорганизмов и диагностики инфекционных заболеваний — геноиндикация. Метод ПЦР позволяет амплифицировать («размножить», клонировать) in vitro определенные участки ДНК, за 2—4 ч получить миллионы копий этой ДНК. Сущность метода ПЦР составляет многократный циклический процесс, попеременно включающий в каждом цикле три этапа — тепловую денатурацию ДНК (плавление), ее отжиг (присоединение синтетических олигонуклеотидных праймеров), синтез (достраивание второй цепи ДНК термостабильной ДНК-полимеразой). Смена этих этапов происходит в результате изменения температуры реакционной смеси в специальном приборе амплификаторе (термоциклере). Денатурация исходной и последующих копий ДНК, ведущая к разделению ДНК на две одиночные цепи, происходит при 90—95 °С в течение 40—50 сек. Отжиг (присоединение праймеров) происходит при температуре 40— 65 °С. Праймеры — синтетические олигонуклеотиды (20—30 нуклеотидов) — присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени, фланкируя искомый специфический фрагмент ДНК. Праймеры подбирают так, чтобы они ограничивали искомый фрагмент и были

комплементарны противоположным цепям ДНК; при этом один праймер находится на одной цепи, другой — на противоположной. Синтез (элонгация) — достраивание второй цепи ДНК происходит при 72 °С с участием Tag-ДНК-полимеразы. Достраивание второй нити ДНК идет с 5'-конца к 3'-концу каждой нити ДНК, т.е. в противоположных направлениях. В результате первого цикла образуются две копии участка ДНК, ограниченного праймером. Длительность цикла составляет в зависимости от вида термоциклера 2—2 мин или 30—40 сек. В результате каждого последующего цикла количество синтезируемых копий удваивается в геометрической прогрессии (рис. 3.4). Обычно ПЦР включает 20—30 циклов, что обеспечивает синтез 1 млн копий искомого фрагмента ДНК.

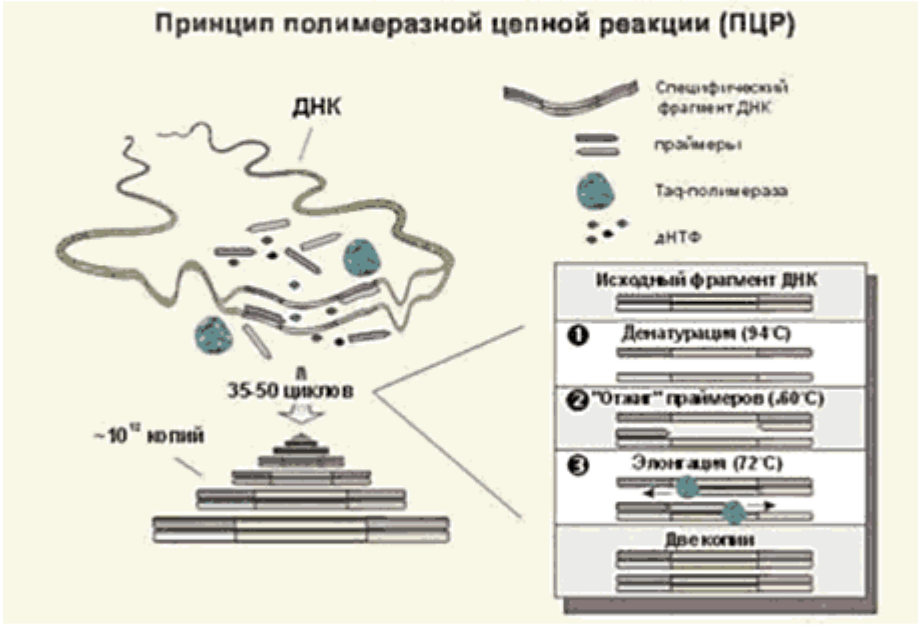

Рис. 3.4. Схема полимеразной цепной реакции

Для детекции продуктов ПЦР применяется электрофорез или другие системы детекции.

ПЦР адаптирована для выявления большинства микроорганизмов, имеющих медицинское значение. Она позволяет быстро обнаружить искомый микроорганизм непосредственно в исследуемом материале без выявления чистой культуры, имеет высокую чувствительность (1×10^1 — 1×10^3 микроорганизмов в 1 г материала). ПЦР

нашла широкое применение для обнаружения трудно культивируемых и медленно растущих микроорганизмов (вирусов, хламидий, риккетсий, микоплазм, спирохет, микобактерий).

3.3. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ИХ НАЗНАЧЕНИЕ, ПРИМЕНЕНИЕ. ПЕРВИЧНЫЙ ПОСЕВ И ПЕРЕСЕВ. УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

Питательные среды предназначены для накопления, выделения, изучения и сохранения микроорганизмов. При составлении искусственных питательных сред учитывают как потребности микроорганизмов в веществах, необходимых для жизни, так и физико-химические условия, в которых они могут осуществлять обмен между клеткой и средой.

Для обеспечения разнообразных типов метаболизма микроорганизмов питательные среды должны соответствовать следующим требованиям.

1. Содержать все элементы, из которых строится клетка: макроэлементы (углерод, азот, кислород, сера, фосфор, калий, кальций, магний, железо) и микроэлементы (марганец, молибден, цинк, медь, кобальт, никель, ванадий, хлор, натрий, кремний и др.). Все элементы должны находиться в удобоусвояемых конкретным микроорганизмом соединениях. Источником углерода могут быть разнообразные органические соединения: углеводы, многоатомные спирты, органические кислоты, аминокислоты, белки и др. Источником азота служат аммонийные соединения, аминокислоты, пептиды, белки. Источником остальных макроэлементов являются неорганические соединения — соли фосфорной и других кислот. Микроэлементы поступают в питательную среду с органическими субстратами, солями и водой. Витамины (особенно группы В) и другие факторы роста вносят в среду в составе органических субстратов или в виде чистых веществ.

2. Иметь достаточную влажность (не менее 20% воды).

3. Концентрация солей в среде должна обеспечивать изотонию, т.е. соответствовать концентрации солей в микробной клетке (для большинства микроорганизмов — 0,5%; галофильных — 3%).

4. Концентрация водородных ионов (pH) среды должна быть оптимальной для выращиваемого микроорганизма (диапазон pH 4,5—8,5).

5. Окислительно-восстановительный потенциал (Eh) среды должен соответствовать потребностям микроорганизма: для анаэробов — 0,120—0,060 В, для аэробов — более 0,080 В.

6. Питательная среда должна быть стерильной.

По составу питательные среды могут быть синтетическими и натуральными. Питательные среды являются синтетическими, если содержат только химически чистые соединения в установленных дозировках, т.е. состав их полностью известен. Достоинством таких сред являются стандартность и воспроизводимость. Однако только для немногих патогенных бактерий имеются синтетические среды. Их применяют главным образом для экспериментального изучения метаболизма микробов.

Для практических исследований широко используют натуральные среды. Натуральные (естественные) питательные среды состоят из продуктов животного и растительного происхождения и имеют неопределенный химический состав.

Различают питательные среды общего назначения (универсальные) и специальные питательные среды. Питательные среды общего назначения пригодны для выращивания многих видов микроорганизмов и применения в качестве основы для приготовления специальных питательных сред. К ним относятся, например, мясопептонный бульон, мясопептонный агар, бульон Хоттингера, агар Хоттингера и другие. Специальные питательные среды предназначены для избирательного культивирования определенных видов микроорганизмов, изучения их свойств и хранения.

Различают следующие виды специальных сред: элективные (избирательные), дифференциально-диагностические, консервирующие. Избирательность питательной среды для определенных видов микробов достигается путем создания оптимальных для них условий (pH, Eh, концентрация солей, состав питательных веществ), т.е. положительной селекцией, или путем добавления в среду веществ, угнетающих другие микробы (желчь, азид натрия, теллурит калия, антибиотики и др.), т.е. отрицательной селекцией. Дифференцирующие свойства питательной среды создаются внесением субстрата, к которому определяется отношение микроба (например, сахаров, аминокислот), соответствующих индикаторов (например, pH-индикаторов — бромтимолблау, фуксин; Eh-индикаторов).

По консистенции питательные среды могут быть жидкими, полужидкими (0,2—0,7% агара) и плотными (1,5—2% агара). Сухие питательные среды, выпускаемые промышленностью, представляют собой форму консервации сред.

Для обеспечения микрообъемной технологии биохимической идентификации микроорганизмов выпускаются коммерческие микротест-системы. Они представлены двумя группами, различающи-

мися особенностями содержания субстрата реакции: 1 — в питательной среде; 2 — в шаблоне-носителе. Тест-системы первой группы содержат в микрообъемных лунках полистироловых пластин дегидрированные питательные среды, стабилизированные поливиниловым спиртом, например, API-20E, Enterotest (рис. 3.5), отечественные ПБДЕ и ММТЕ 1 и Е 2.

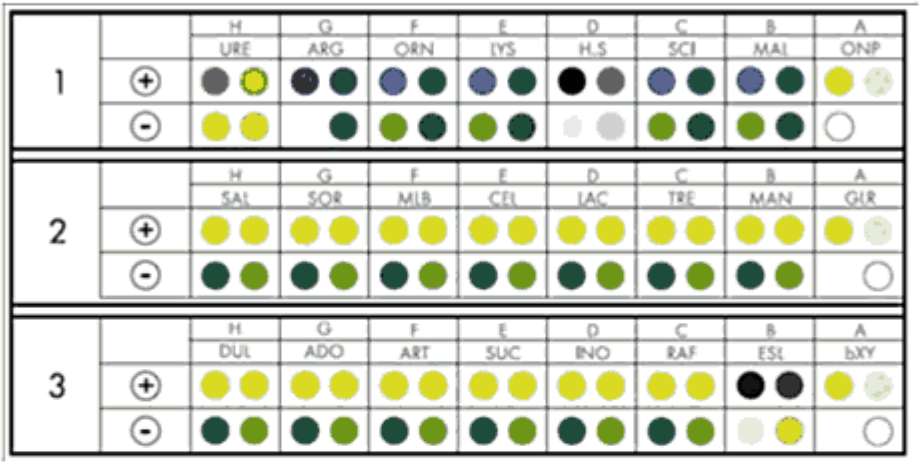

Рис. 3.5. Тест-система биохимической идентификации Enterotest

Тест-системы второй группы имеют субстрат и индикатор в бумажном или полимерном шаблоне-носителе, например, Micro-ID, Minitek. Разработаны также тест-системы на основе жидких дифференциальных сред, которые можно изготавливать непосредственно в лабораториях. По результатам биохимических тестов устанавливается вид микроорганизма с помощью таблиц идентификации, аналитического каталога кодов или приборов автоматизированных микробиологических систем биохимической идентификации микроорганизмов. Ввиду ускорения исследования и высокой экономичности микрообъемные тест-системы имеют широкое применение в работе лабораторий.

Для натуральных питательных сред используют животные, растительные и микробные продукты: мясо, рыбную муку, молоко, яйца, кровь, картофель, дрожжи и др. Из них готовят полуфабрикаты: настои и экстракты (мясная вода, дрожжевой экстракт), ферментативные и кислотные гидролизаты (пептон, перевар Хоттингера, перевар казеина и др.). Настои и экстракты являются источником факторов

роста, гидролизаты — источником аминокислот и других органических питательных веществ.

В качестве уплотнителя питательных сред используют агар-агар или желатин. Агар-агар — полисахарид, получаемый из морских водорослей. Он способен образовывать в воде гель, плавящийся при 80—86 °С и застудневающий при 40—45 °С; не расщепляется большинством видов микроорганизмов. Желатин — белок, получаемый из кожи и костей; желатиновый гель плавится при 32—34 °С, застудневает при 26—28 °С (т.е. при температуре инкубации 37 °С находится в жидком состоянии); расщепляется многими видами микроорганизмов. Поэтому желатин применяют редко.

При необходимости осветляют питательную среду обработкой белком куриного яйца, сывороткой или осаждением. Разливают среду в колбы, флаконы, пробирки. Используют чистую нестерильную посуду, если среда подлежит стерилизации при 120 °С, либо стерильную, если среда требует стерилизации текучим паром (100 °С) или при 112 °С. Закрывают посуду со средой ватно-марлевыми пробками с бумажными колпачками. В зависимости от состава среды стерилизуют различными способами. Агаровые среды, не содержащие углеводов и нативного белка, а также синтетические среды стерилизуют в автоклаве при 115—120 °С в течение 15—20 мин. Среды, содержащие углеводы, молоко, желатин, стерилизуют текучим паром при 100 °С дробно или в автоклаве при 112 °С в течение 15 мин. Среды, содержащие нативный белок, мочевину, стерилизуют фильтрованием или добавляют стерильные компоненты (кровь, сыворотку и др.) в стерильную основу среды. Готовые стерильные питательные среды подвергают контролю на стерильность путем выдерживания в термостате при 37 °С в течение 1—3 сут.

В полевых условиях проще готовить питательные среды из сухих (консервированных) питательных сред. Навеску сухой среды, указанную на этикетке, вносят в дистиллированную или водопроводную воду и кипятят до полного растворения порошка. Затем разливают среду в стерильные колбы, пробирки и стерилизуют. Некоторые среды (например, Эндо, Плоскирева, Левина) можно использовать без стерилизации.

Бактериологическому контролю подлежат все серии питательных сред промышленного производства и все партии сред, приготовленных в лаборатории. В качестве тест-культур используют типовые или местные штаммы бактерий, типичные по всем признакам, в гладкой форме. Определяют следующие биологические показатели питатель-

ной среды: чувствительность (ростовую), ингибирующие свойства, дифференцирующие свойства, скорость роста бактерий на среде, воспроизводимость.

Чувствительность питательной среды определяют по минимальному количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий, обеспечивающих появление роста колоний на среде, или по максимальному десятикратному разведению культуры из исходной концентрации 10 ед. мутности (по оптическому стандарту мутности), обеспечивающему появление роста бактерий на всех засеянных чашках Петри. Ингибирующие свойства среды оценивают как степень подавления прочей микрофлоры по величине посевной дозы в КОЕ, полностью подавляемой на среде, или по отношению количества выросших колоний бактерий к расчетному количеству посеянных бактерий. Дифференцирующие свойства сред изучают путем посева испытуемых видов бактерий в смеси с ассоциантами с последующим определением четкости дифференциации колоний искомых бактерий от ассоциантов. Специфичность дифференцирующего свойства среды выявляют по отсутствию этого свойства у прочих видов бактерий, кроме искомых. Скорость роста бактерий на среде устанавливают по минимальному времени инкубации посевов (в часах), в течение которого обеспечивается четкий, видимый невооруженным глазом рост культуры (для селективных сред) или формирование колоний с типичными дифференциальными признаками. Воспроизводимость биологических показателей сред оценивают по частоте одинаковых результатов (в %) при повторных использованиях сред с теми же штаммами бактерий. Контроль различных питательных сред по биологическим показателям проводят по конкретным методикам и нормативам, руководствуясь официальными документами.

Физико-химический контроль питательных сред в практике лабораторий осуществляют по показателям pH, rH, содержанию аминного азота. Прочие показатели изучают обычно при промышленном производстве питательных сред. Для определения pH и rH сред используют pH-метры, индикаторные бумажки, а также различные химические индикаторы pH и rH вносимые в питательные среды. Содержание аминного азота изучают методом pH-метрического формолового титрования питательных сред по ГОСТу.

Изучение биохимических свойств выделенных микроорганизмов проводят на третьем этапе. Культуру микроорганизмов, выросшую на скошенном агаре, проверяют на чистоту путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму. При микроскопии обращают внимание

на форму микроба, величину, расположение клетки. Специальными окрасками выявляют споры, капсулы, включения и жгутики.

Для идентификации культур, т.е. установления вида и типа бактерий, помимо морфологических и культуральных признаков изучают биохимические, антигенные и другие свойства.

3.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ, ИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ БАКТЕРИЙ

Действие протеолитических ферментов, т.е. способность микроорганизмов расщеплять белки, изучают на средах с желатином, молоком, сывороткой, пептоном. При посеве уколом в столбик желатиновой среды микробы, разлагающие желатин, разжижают среду. Действие микроорганизмов, разлагающих казеин (молочный белок), проявляется в пептонизации (просветлении) молока, которое приобретает вид молочной сыворотки.

В процессе ферментации пептонов микроорганизмами образуются индол (C_8H_7N), сероводород (H_2S), аммиак (NH_3) и другие соединения.

Способность микроорганизмов разлагать сахара и многоатомные спирты с образованием кислоты, а иногда и газа изучают на средах Гисса. В состав этих сред входят пептонная вода, углевод (моносахариды — глюкоза, ксилоза, арабиноза; полисахариды — крахмал, гликоген), многоатомные спирты (глицерин, маннит, сорбит, инозит) и индикатор. Под действием образующейся при разложении углевода кислоты индикатор изменяет окраску среды. Газообразование определяется по наличию пузырьков газа в толщине полужидких сред или, если среда жидкая, в поплавке (стеклянная трубочка, верхний конец которой запаян).

Сахаролитические свойства изучают и на таких средах, как Эндо, Левина, Плоскирева. В состав этих сред входит молочный сахар — лактоза, и при разложении его микроорганизмами до кислоты цвет колонии изменяется соответственно индикатору, находящемуся в среде.

Биохимическая активность микроорганизмов обусловлена их ферментативной деятельностью. Ферменты микроорганизмов являются биологическими катализаторами, определяющими метаболические процессы, протекающие в микробных клетках. Разные виды микроорганизмов нередко отличаются по набору ферментов, которые они способны синтезировать.

Плазмокоагулаза выявляется в пробирочном опыте по определению скорости свертывания испытуемым микробом цитратной кроличьей или человеческой плазмы.

Гемотоксин вызывает лизис эритроцитов. Определяется при посеве испытуемых микробов на кровяной агар. Вокруг колонии наблюдается зона просветления среды.

Лецитиназа разрушает лецитовителлин яичного желтка. Обнаруживается при посеве испытуемых микробов на желточно-солевой агар (ЖСА) по образованию вокруг колоний зоны помутнения с радужным венчиком.

Гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав соединительной ткани. В пробирку с испытуемой культурой внести гиалуроновую кислоту и после 30-минутной экспозиции при 37 °С добавить 2 капли крепкой уксусной кислоты. При наличии фермента гиалуроновая кислота утрачивает способность образовывать сгусток.

Фибринолизин растворяет фибрин плазмы крови, добавленной к питательной среде.

Облигатными анаэробами называют микроорганизмы, обладающие ферментативным метаболизмом и не растущие на поверхности аэрируемой питательной среды.

В зависимости от отношения к свободному кислороду облигатные анаэробы делят на умеренные и строгие. Большинство значимых для медицинской микробиологии анаэробов (клостридии, бактероиды, фузобактерии, пептококки и др.) относятся к категории умеренных. Они толерантны к кислороду в течение нескольких десятков минут и не растут при его концентрации в среде более 3%. Строгие анаэробы (метанобактерии и др.) чрезвычайно чувствительны к токсическому действию кислорода и не растут при его содержании в среде более 0,5%.

Биологические особенности облигатных анаэробов обусловливают необходимость применения специальных методов культивирования, отличающихся от используемых при работе с аэробными и факультативно-анаэробными микроорганизмами.

Важным условием, которое необходимо соблюдать на всех этапах выделения и идентификации анаэробов, является защита этих микроорганизмов от токсического действия молекулярного кислорода. Время между взятием материала и его посевом на питательные среды должно быть максимально коротким. Для защиты содержащихся в патологическом материале облигатных анаэробов от воздействия атмосферного кислорода используют специальные транспортные среды.

Анаэробные бактерии можно культивировать только на специальных бескислородных питательных средах с низким окислительно-

восстановительным потенциалом (–10—150 мВ). Для контроля за степенью насыщения этих сред кислородом используют специальные редокс-индикаторы (метиленовый синий, резазурин), восстановленные формы которых бесцветны. При возрастании окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) метиленовый синий окрашивает среды в синий, а резазурин — в розовый цвет, что указывает на непригодность таких питательных сред для культивирования облигатных анаэробов.

Для сохранения низкого ОВП питательные среды должны быть агаризованы. Добавление даже 0,05% агара повышает их вязкость и уменьшает аэрацию. Для получения роста облигатно-анаэробных бактерий плотные питательные среды должны быть свежеприготовленными (не позднее двух часов после приготовления) или прередуцированными (выдержаны в анаэростате не менее суток). Для успешного выращивания анаэробов требуется внесение большого количества посевного материала. Это связано с тем, что большие концентрации облигатных анаэробов способны быстрее уменьшать ОВП среды и тем самым создавать благоприятные условия для своего роста.

Анаэробный тип дыхания во много раз менее продуктивный, чем аэробный, поэтому питательные среды для анаэробов должны быть более насыщены питательными субстратами и витаминами. В качестве питательной основы они содержат различные экстракты и белковые гидролизаты (сердечно-мозговой и печеночный настои, дрожжевой и соевый экстракты, пептон, триптон, гидролитический перевар казеина и др.), факторы роста (гемин, менадион, твин-80, сукцинат натрия и др.), цельную или лизированную кровь. Для выделения различных анаэробов из смеси культур к питательным основам добавляют желчь, азид натрия, антибиотики, налидиксовую кислоту, малахитовый зеленый и другие ингредиенты. В практических лабораториях для выделения анаэробов из патологического материала чаще всего используют среду для контроля стерильности (СКС), среду Китта-Тароцци, анаэробный кровяной агар (на основе эритрит-агара или агара Д), среду Вильсона-Блера и некоторые другие с соответствующими добавками.

Необходимым условием культивирования анаэробных бактерий является создание анаэробных условий, что достигается с помощью физических, химических, биологических и смешанных методов.

Физические методы

1. Для удаления растворенного в питательных средах кислорода производят их регенерацию путем кипячения в течение 15—20 мин на водяной бане с последующим быстрым охлаждением до 45—50 °С.

После посева для предотвращения проникновения кислорода в жидкую питательную среду ее поверхность заливают стерильным вазелиновым маслом или парафином.

2. Посев содержащего анаэробы патологического материала в высокий столбик плотной или полужидкой питательной среды, которая разливается в пробирки в объеме 10—12 мл. Кислород воздуха диффундирует обычно на расстояние 1,5—2,0 см от поверхности, а в глубине создаются благоприятные условия для роста облигатных анаэробов.

3. Эвакуационно-заместительный метод заключается в удалении воздуха из герметически закрытых сосудов (анаэростатов, анаэробных боксов) с помощью вакуумного насоса с последующей заменой его инертным газом (азот, аргон, гелий) или бескислородной газовой смесью, состоящей из 80% азота, 10% двуокиси углерода и 10% водорода. В ряде случаев используют природный (магистральный) газ. Для поглощения остатков кислорода из газовой смеси используют палладиевый катализатор. Для поглощения водяных паров на дно анаэростата помещают хлористый кальций, силикагель или хлористый натрий.

Химические методы

1. Применение щелочных растворов пирогаллола для поглощения кислорода в замкнутой воздушной среде. Для поглощения кислорода применяют смесь раствора пирогаллола и насыщенного раствора карбоната натрия (Na_2CO_3).

2. Для поглощения кислорода из замкнутого пространства можно применять гидросульфит натрия.

3. Для связывания остатков кислорода в предназначенных для роста анаэробов питательных средах используют вещества-редуценты, к которым относятся тиогликолевая кислота или тиогликолат натрия, аскорбиновая кислота, различные сахара, цистин и цистеин, муравьинокислый натрий и др.

4. Применение газогенерирующих систем для создания анаэробных условий в замкнутой воздушной среде (микроанаэростатах, эксикаторах, прозрачных газонепроницаемых пластиковых пакетах).

Для образования водорода и двуокиси углерода, необходимых для роста облигатных анаэробов, используют специальные таблетки, которые активируются добавлением воды. Водород, генерируемый таблетками боргидрида натрия, связывает кислород воздуха в присутствии палладиевого катализатора с образованием воды. Углекислый газ вырабатывается при взаимодействии лимонной кислоты с бикарбонатом натрия.

После посева для предотвращения проникновения кислорода в жидкую питательную среду ее поверхность заливают стерильным вазелиновым маслом или парафином.

2. Посев содержащего анаэробы патологического материала в высокий столбик плотной или полужидкой питательной среды, которая разливается в пробирки в объеме 10—12 мл. Кислород воздуха диффундирует обычно на расстояние 1,5—2,0 см от поверхности, а в глубине создаются благоприятные условия для роста облигатных анаэробов.

3. Эвакуационно-заместительный метод заключается в удалении воздуха из герметически закрытых сосудов (анаэростатов, анаэробных боксов) с помощью вакуумного насоса с последующей заменой его инертным газом (азот, аргон, гелий) или бескислородной газовой смесью, состоящей из 80% азота, 10% двуокиси углерода и 10% водорода. В ряде случаев используют природный (магистральный) газ. Для поглощения остатков кислорода из газовой смеси используют палладиевый катализатор. Для поглощения водяных паров на дно анаэростата помещают хлористый кальций, силикагель или хлористый натрий.

Химические методы

1. Применение щелочных растворов пирогаллола для поглощения кислорода в замкнутой воздушной среде. Для поглощения кислорода применяют смесь раствора пирогаллола и насыщенного раствора карбоната натрия (Na_2CO_3).

2. Для поглощения кислорода из замкнутого пространства можно применять гидросульфит натрия.

3. Для связывания остатков кислорода в предназначенных для роста анаэробов питательных средах используют вещества-редуценты, к которым относятся тиогликолевая кислота или тиогликолат натрия, аскорбиновая кислота, различные сахара, цистин и цистеин, муравьинокислый натрий и др.

4. Применение газогенерирующих систем для создания анаэробных условий в замкнутой воздушной среде (микроанаэростатах, эксикаторах, прозрачных газонепроницаемых пластиковых пакетах).

Для образования водорода и двуокиси углерода, необходимых для роста облигатных анаэробов, используют специальные таблетки, которые активируются добавлением воды. Водород, генерируемый таблетками боргидрида натрия, связывает кислород воздуха в присутствии палладиевого катализатора с образованием воды. Углекислый газ вырабатывается при взаимодействии лимонной кислоты с бикарбонатом натрия.

Глава 4

УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИОННОМ И ЭПИДЕМИЧЕСКОМ ПРОЦЕССАХ. ИНФЕКЦИИ, СВЯЗАННЫЕ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

Студент должен знать: определение термина «инфекция», факторы патогенности микробов, продолжительность инкубационного периода, микроэкологию человека.
Ключевые слова и термины: инфекция. Источник инфекции. Факторы патогенности. Токсины. Микроэкология.

4.1. ПОНЯТИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ

Первоначально в историческом плане под инфекцией понимали заражение венерическими заболеваниями. В настоящее время термин инфекция (от лат. inficio — загрязнять, вносить что-либо извне) означает эволюционно сложившиеся взаимоотношения восприимчивого человеческого организма (макроорганизма) и патогенного (болезнетворного) микроорганизма в определенных условиях внешней и социальной среды. Крайней степенью этого взаимодействия является инфекционная болезнь — расстройство нормального функционирования человеческого организма в результате воздействия патогенных микроорганизмов. Клинические проявления инфекционного процесса изучает наука инфектология, а проявление инфекции в челове-

ческих коллективах изучает эпидемиология, или наука об эпидемиях. Термин «эпидемия» происходит от греческих слов «эпи» — в, на и «демос» — народ. Целью эпидемиологии является изучение механизма возникновения и развития эпидемического процесса, а также разработка и применение методов предупреждения и борьбы с эпидемиями.

Инфекционные заболевания имеют характерные отличия от соматических заболеваний:

- инфекционные болезни вызываются живыми возбудителями, за исключением вирусов и прионов;
- инфекционным болезням свойственна контагиозность (заразительность);
- для инфекционных болезней характерен скрытый (инкубационный) период;
- после перенесенных инфекционных болезней, как правило, развивается невосприимчивость к повторному заражению тем же возбудителем (иммунитет).

В годы «золотого века» микробиологии господствовала так называемая триада Коха, которая подчеркивала ведущую роль микроорганизма в развитии инфекционного процесса. Основные постулаты этой триады:

- микроорганизм всегда должен встречаться при данной конкретной болезни и не встречаться у здоровых или у больных другими нозологическими формами;
- микроорганизм должен быть выделен от больного в чистой культуре;
- чистая культура микроорганизма, введенная в организм, должна вызывать то же самое заболевание.

В дальнейшем эмпирические наблюдения привели к полному пересмотру всех положений этой доктрины. Было установлено, что развитие болезни зависит не только от свойств возбудителя, но и от состояния макроорганизма, которое в свою очередь определяется условиями его существования. Наиболее полно сущность взаимоотношений патогенных микроорганизмов с организмом человека (животного) раскрыл В.Д. Беляков в 1983 г. как процесс взаимодействия гетерогенных популяций паразита и хозяина, наступающий при наличии необходимых и достаточных социальных и природных факторов, проявляясь у зараженных индивидуумов развитием манифестных и бессимптомных форм инфекций.

Инфекция — это сложное биологическое явление, возникающее в результате взаимодействия микроорганизмов с макроорганизма-

ми животного или растительного происхождения. Она отображает общебиологический закон симбиоза, сформировавшегося в процессе эволюции. Все разновидности симбиотических взаимоотношений (комменсализм, мутуализм, паразитизм), наблюдаемые у высокоорганизованных живых существ, присущи также и микроорганизмам.

При комменсализме совместное существование нормальной микрофлоры тела человека и самого человеческого организма никому из членов сообщества не наносит ущерба. При мутуализме из совместного существования оба члена сообщества извлекают пользу. Так, многие представители микрофлоры толстого кишечника синтезируют биологически активные вещества, утилизируя в свою очередь питательные субстраты, поступившие в желудочно-кишечный тракт. И только при явлении паразитизма микроорганизм наносит существенный вред своему хозяину — человеческому организму.

Под источником инфекции подразумевают любую естественную среду (резервуар) обитания патогенного микроорганизма. Как правило, это заболевший или инфицированный человек, от которого могут заразиться другие люди. Однако инфекцию нельзя отождествлять исключительно с микроорганизмом — возбудителем заболевания. Большую роль играет восприимчивость человеческого организма. Исходя из значения источника инфекции, выделяют следующие классы инфекций.

1. Антропонозы (передаются от человека).
2. Зоонозы (передаются от животных).
3. Сапронозы (возбудители локализованы во внешней среде).

Третьим компонентом в сложном взаимодействии микро- и макроорганизма является механизм передачи возбудителя. Под механизмом передачи следует подразумевать способ переноса патогенных микроорганизмов от источника инфекции в восприимчивый человеческий организм. При этом механизм передачи возбудителя может быть реализован следующими путями.

1. Фекально-оральный (энтеральный).
2. Воздушно-капельный (аэрозольный).
3. Контактно-бытовой (трансмиссивный).
4. Вертикальный (от больной матери плоду).

Здесь необходимо определить термин «входные ворота инфекции». Это ткани, лишенные физиологической защиты против конкретного возбудителя той или иной инфекции. Например, слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта при энтеральных инфекциях, слизистые оболочки трахеи и бронхов при аэрозольных инфекциях, кожа и слизистые оболочки при контактно-бытовых инфекциях.

Все элементы окружающей среды, участвующие в передаче возбудителей от источника к восприимчивому организму, называются факторами передачи. Это воздух, почва, вода, пищевые продукты и другие объекты. Кровососущие насекомые называются переносчиками возбудителя.

4.2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Любое инфекционное заболевание характеризуется цикличностью течения.

Инкубационный период начинается с момента внедрения микроорганизма в макроорганизм до появления первых клинических симптомов болезни. Длительность периода составляет от нескольких часов до недель. В это время происходит адгезия микроорганизма на слизистых оболочках небных миндалин, дыхательных путей, желудочно-кишечного и мочеполового трактов. При этом микроорганизм, как правило, не выделяется во внешнюю среду, т.е. больной пока не заразен.

В продромальном периоде, который длится обычно 1—2 суток, регистрируются такие неспецифические признаки болезни, как общая слабость, головная боль, повышение температуры тела. Однако типичные для каждого конкретного инфекционного заболевания (патогномонические) симптомы не выявляются. В это время происходит колонизация чувствительных клеток макроорганизма. Возбудитель болезни уже может выделяться во внешнюю среду.

В период разгара болезни появляются патогномонические симптомы, характерные для данной конкретной нозологической формы. В это время имеет место интенсивное размножение возбудителя в организме, накопление больших количеств токсинов и ферментов, поступающих в кровь. Возбудитель активно выделяется из организма больного во внешнюю среду.

Период реконвалесценции (выздоровления) характеризуется нормализацией функций организма с прекращением размножения и гибелью (последнее происходит необязательно) возбудителя.

Иногда возбудитель сохраняется в организме, несмотря на клиническое выздоровление. Такое состояние называется микробоносительством. Микробоносительство нельзя путать с персистенцией — длительным «переживанием» микроорганизмов-возбудителей той или иной инфекции в организме человека. В отличие от микробоносительства в состоянии персистенции возбудитель не выделяется во внешнюю среду.

Реинфекция — это заболевание, возникшее после выздоровления вследствие повторного заражения тем же самым возбудителем. При суперинфекции в отличие от реинфекции заражение происходит в организме до выздоровления. Под рецидивом следует понимать возврат клинических симптомов болезни без повторного заражения за счет оставшихся в организме возбудителей.

Если инфекция протекает без выраженных симптомов, то это бессимптомная инфекция. В случае яркой выраженности клинических симптомов инфекция называется манифестной. При резком снижении защитных сил макроорганизма (иммунодефицитном состоянии) может развиться эндогенная инфекция, вызываемая представителями нормальной микрофлоры тела человека. В то же время экзогенная инфекция детерминирована проникновением микроорганизмов в организм человека извне. Различают также моноинфекцию, вызываемую одним возбудителем, и микст-инфекцию, обусловленную несколькими возбудителями.

4.3. ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА МИКРОБОВ

Характеризуя микроорганизм-возбудитель той или иной инфекции, следует остановиться на таком понятии, как патогенность — потенциальная способность определенных видов микроорганизмов вызывать инфекционный процесс. Это видовой признак. Степень (мера) патогенности конкретного штамма возбудителя называется вирулентностью. Факторы патогенности (вирулентности) микроорганизмов подразделяют на три группы:

- факторы, определяющие взаимодействие возбудителей с мембранами эпителия слизистых оболочек пораженных органов;
- факторы, придающие возбудителям устойчивость к механизмам защиты человеческого организма и обеспечивающие способность в нем размножаться;
- факторы, способные продуцировать токсины (яды) и токсические продукты, участвующие в развитии инфекционного процесса.

К факторам патогенности (вирулентности) бактерий относятся адгезины, наличие капсулы, способность размножаться на слизистых оболочках (колонизация), способность проникать в клетки (пенетрация) или в подлежащие ткани (инвазия), способность противостоять механизмам защиты хозяина (агрессия). Их можно рассматривать как различные функциональные проявления вирулентных свойств, характеризующих патогенные микроорганизмы.

Адгезины — это микробные белки, ассоциированные с поверхностью бактериальной клетки и отвечающие за прилипание (прикрепление) к эпителию слизистых оболочек. Взаимодействие микроорганизмов и клетки хозяина очень специфично. Одни микроорганизмы колонизируют эпителий желудочно-кишечного тракта, прикрепляясь к нему, другие — дыхательных путей и т.д. Механизм взаимодействия возбудителя и клетки хозяина реализуется при участии электростатических сил, гидрофобных свойств поверхностей и посредством функционирования рецепторного аппарата.

Капсула бактерий ингибирует начальные этапы защитных реакций — распознавание и поглощение, экранируя бактерии.

Под пенетрацией следует понимать способность некоторых возбудителей проникать внутрь эпителиальных клеток, лимфоцитов или лейкоцитов. При этом клетки разрушаются, что сопровождается нарушением целостности эпителиального покрова соответствующего органа. Инвазия — способность возбудителей проникать через слизистые и соединительнотканные барьеры в подлежащие ткани. Эта способность связана с продуцированием таких ферментов, как гиалуронидаза и нейраминидаза. Гиалуронидаза специфически расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества, и тем самым повышает проницаемость слизистых оболочек. Нейраминидаза облегчает преодоление слоя слизи, проникновение внутрь клеток и распространение в межклеточных пространствах.

Агрессия — это способность возбудителя подавлять неспецифическую и иммунную защиту организма хозяина. Сюда же можно отнести наличие капсулы и различные белковые структуры бактериальной клетки, липополисахариды грамотрицательных бактерий. Защитные свойства макроорганизма подавляются также ферментами, продуцируемыми возбудителями. К ним относятся протеазы (разрушают антитела), коагулазы (свертывают плазму крови), фибринолизин (растворяет сгустки фибрина), лецитиназа (расщепляет лецитин) и т.д.

Токсины или яды бактерий традиционно подразделяют на экзо- и эндотоксины. Экзотоксины — это продукты метаболизма, как правило, грамположительных бактерий. Они имеют белковую природу, поэтому высокоиммуногенны, и не так тесно связаны с бактериальной клеткой, как эндотоксины. Действие экзотоксинов на макроорганизм высокоспецифично.

Так, цитотоксины блокируют биосинтез белка на субклеточном уровне, мембранотоксины повышают проницаемость мембраны эритроцитов (гемолизины) и лейкоцитов (лейкоцидины). Функциональные блокаторы включают энтеротоксины, нейротоксины и токси-

коблокаторы. Эксфолиатины и эритрогенины влияют на процессы взаимодействия клеток между собой и с межклеточным веществом.

К эндотоксинам относят метаболиты, как правило, грамотрицательных бактерий, они тесно связаны с бактериальной клеткой и высвобождаются только после гибели клеток. По химической природе это липополисахариды (ЛПС). Эндотоксины являются слабыми иммуногенами. Действие токсинов на макроорганизм малоспецифично и, как правило, однотипно — интоксикация, слабость, падение артериального давления.

Токсичность (так же, как и вирулентность) может быть оценена количественно.

К единицам измерения вирулентности (токсичности) относят DLM (dosis letalis minima) — минимальное количество микроорганизмов или токсинов, вызывающее гибель большинства (80%) лабораторных животных, DCL (dosis certa letalis) — гибель абсолютно всех животных и LD50 — гибель 50% подопытных животных.

Отдельно рассматривается инфицирующая доза (ID) — минимальное количество микроорганизмов или токсина, способное при попадании внутрь организма вызвать заболевание. Так, например, для туляремии величина ID составляет 1—2 КОЕ, для шигеллезов — 10^2 КОЕ, для брюшного тифа — 10^5 КОЕ, а для холеры — 10^{10} КОЕ.

Факторы патогенности микроорганизмов контролируются хромосомными и плазмидными генами. Контроль токсинообразования осуществляют также конвертирующие бактериофаги. Изменчивость вирулентности может носить гено- или фенотипирующий характер. Генотипическое снижение вирулентности имеет место при мутациях, рекомбинациях, утере внехромосомных наследственных факторов (плазмид, IS последовательностей, транспозонов). Фенотипическое ее снижение возможно при попадании возбудителя в неблагоприятные условия, такие как неоптимальный режим культивирования, обработка микроорганизма гомологичной сывороткой. Снижение вирулентности может быть также обусловлено не потерей вирулентных свойств, а селекцией маловирулентных устойчивых штаммов в гетерогенной популяции возбудителя.

4.4. МИКРОЭКОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА

Микроэкология изучает взаимоотношения микро- и макроорганизмов в определенной среде обитания. Под термином «микрофлора» (микробиота) следует понимать эволюционно сложившийся откры-

тый биоценоз микроорганизмов, заселяющих поверхности и полости тела человека. Человек имеет достаточно обильную микробную флору на внешних покровах тела и в полостях, сообщающихся с внешней средой. Главная масса микробов концентрируется в желудочно-кишечном тракте, особенно в толстом кишечнике.

Полость рта со слюной, имеющей щелочную реакцию, с пищевыми остатками и с ее «термостатной» температурой является естественным резервуаром для развития микроорганизмов. В ротовой полости обнаружено до 200 видов микроорганизмов, их концентрация в слюне составляет около 5 млрд КОЕ/мл, в зубном налете — их в тысячу раз больше.

В подъязычной области, в складках слизистой в полости рта с постоянством встречаются следующие виды:

- *Streptococcus mutans, S. mitis, S. salivarium, S. sanguis;*
- представители родов *Peptococcus, Veilonella*.

На небных миндалинах в норме можно обнаружить стрептококков, коринебактерий, нейссерий, псевдомонад, гемофилов, нокардий и дрожжевых грибов. В слюне преобладают извитые микроорганизмы — трепонемы и спириллы. Десневой желоб — место для обитания анаэробов (бактероиды, фузобактерии, лептотрихии, кампилобактеры, спирохеты и т.д.). Вырабатывая органические кислоты при разложении углеводных остатков пищи, бактерии полости рта способствуют разрушению эмали зубов и развитию кариеса. Поэтому систематический уход за полостью рта с механическим удалением пищевых остатков и микробной массы является важным мероприятием личной гигиены.

Желудочно-кишечный тракт — сбалансированная биологическая система, внутри которой существуют многочисленные связи между микроорганизмами, образующие стабильные сообщества. Микрофлора желудочно-кишечного тракта имеет особенности в разных его отделах. В глотке и пищеводе микроорганизмов нет. Кислая среда желудка также неблагоприятна для размножения микроорганизмов. Нормальный желудок является местом массовой гибели попадающих в него микроорганизмов, поэтому микрофлора желудка обычно очень бедна: там могут существовать только некоторые виды кислотоустойчивых бактерий и вирусов (дрожжи и лактобактерии, энтеровирусы). Однако при заболеваниях, сопровождающихся пониженной кислотностью, в желудке развивается богатая микрофлора, включающая сарцин, бацилл (*B. subtilis*), дрожжи и некоторые другие микроорганизмы. Неоднозначно оценивается и роль столь «модного» ныне микроорганизма — *Heicobacter pylori*.

Начиная с двенадцатиперстной кишки, где содержимое ощелачивается секретом поджелудочной железы и желчью, среда более благоприятна для жизнедеятельности бактерий. Анатомически кишечник разделен баугиниевой заслонкой на 2 экологических ниши — тонкий и толстый кишечник. Тонкий кишечник в норме содержит лишь скудную и непостоянную микрофлору. Зато в толстой кишке развивается обильнейшая микрофлора. Взрослый человек ежедневно выделяет с экскрементами в среднем около 1012 бактерий, составляющих до половины сухой массы фекалий.

Кишечный тракт новорожденных в первые часы жизни стерилен, но уже через 10—12 ч он населяется микроорганизмами, при этом кишечная микрофлора в первые 2—3 дня жизни носит еще случайный характер. В дальнейшем господствующее положение приобретает грамположительная анаэробная молочнокислая флора, которая вырабатывает (при расщеплении лактозы) молочную кислоту, подавляя тем самым развитие любой иной, особенно гнилостной, флоры в кишечнике ребенка. Бифидобактерии являются, по-видимому, весьма полезным фактором, защищающим малоустойчивый организм грудного младенца от кишечных расстройств. Наряду с бифидобактериями в относительно небольшом числе развивается и другая молочнокислая микрофлора. Эта так называемая бифидум-флора фекалий младенца чрезвычайно характерна для кишечного содержимого грудных детей и обычно удерживается до 1 года, когда начинается прикармливание ребенка и прекращается вскармливание материнской грудью.

В течение дальнейшей жизни микробный пейзаж кишечника постепенно сменяется микрофлорой взрослых. В кишечнике взрослого человека насчитывается около 500 видов микроорганизмов. Преобладающей микрофлорой являются облигатные анаэробы, которые превышают количество факультативных анаэробов и аэробов в 100—1000 раз. В таком составе, давая большие или меньшие сдвиги микробного пейзажа в зависимости от климато-географического региона, сезонности, режима питания, кишечная флора удерживается до самой смерти (табл. 4.1).

Микрофлора кишечника обеспечивает газовый состав и кинетическую регуляцию его деятельности, водно-солевой обмен, продуцирует биологически активные соединения, обладает детоксицирующей активностью, обеспечивает продукцию витаминов. Нормальная микрофлора кишечника защищает его от колонизации патогенными и условно-патогенными бактериями, обеспечивая колонизационную резистентность.

Кишечная стенка в нормальном состоянии практически непроницаема для микроорганизмов. Нарушение ее целостности приводит к вторжению бактерий из кишечника в стерильные внутренние ткани и полости тела (транслокация), в результате чего развиваются тяжелые заболевания, часто с летальным исходом.

Таблица 4.1

Нормальные показатели микрофлоры желудочно-кишечного тракта

Виды микроорганизмов	Количество (lg КОЕ/г)
Бифидобактерии	8—10
Бактероиды	6—11
Лактобактерии	6—9
Энтерококки	3—9
E.coli с нормальной ферментативной активностью	6—9
E.coli с пониженной ферментативной активностью	4—7
Лактозонегативные *E.coli*	4—7
Протеи	3—4
Клостридии	4—7
Стафилококки	3—5
Дрожжеподобные грибы	2—4

При нарушении количественного состава микрофлоры толстого кишечника в организме человека развиваются функциональные нарушения, именуемые термином «дисбактериоз, или дисбиоз, кишечника». Различают 4 последовательные стадии дисбиоза.

1. Уменьшение количества лактобактерий.
2. Уменьшение количества бифидобактерий.
3. Преобладание гемолитических форм бактерий и дрожжевых грибов.
4. Преобладание гемолитических форм бактерий и дрожжевых грибов с повышенным содержанием бактерий рода *Proteus*.

Для коррекции дисбиоза кишечника широко используют бактерии-антагонисты. Еще великий Мечников предложил для борьбы со старением принимать внутрь простоквашу на основе *Lactobacillus bulgaricus*.

Ныне это очень перспективное и «модное» направление в лечении дисбиоза. Лекарственные препараты на основе живых бактерий-антагонистов, предназначенные для коррекции нормальной микрофло-

ры, называют эубиотиками. Более широкий термин пробиотики был предложен Д. Лилли и Р. Стилвеллом в 1965 г. Это живые микроорганизмы и вещества микробного и иного происхождения, оказывающие при естественном способе введения благоприятное влияние на физиологические функции макроорганизма через оптимизацию его микроэкологического статуса. Различают также и пребиотики — химические соединения, в основном природного происхождения, включение которых в пищевой рацион способствует (стимулирует) накопление определенных групп микроорганизмов.

К пребиотикам относят эубикор, лактулозу, ксилобиозу, соевый олигосахарид и другие вещества, предназначенные для стимуляции роста лакто- и бифидофлоры.

Пробиотики используют на основе либо бифидобактерий (бифидумбактерин, бификол), либо лактобактерий (лактобактерин, ацилакт, аципол), либо споровых бактерий (биоспорин, бактисубтил), реже на основе условно-патогенных кишечных палочек (биофлор).

Широкое распространение получили в последнее время так называемые симбиотики — препараты, сочетающие несколько пробиотиков, например, линекс — препарат на основе *L. acidophilus, B. infantis, S. faecium*. Если препараты содержат пробиотики в сочетании с пребиотиками, то такие препараты называют синбиотиками (бифиформ, ламинолакт).

Различают собственную и транзиторную микрофлору кожи. Под влиянием бактерицидных факторов пота, секрета сальных желез кожа имеет кислую среду. В этих условиях на коже выживают только эпидермальные стафилококки, микрококки, сарцины и непатогенные коринебактерии. Возможно транзиторное нахождение на поверхности кожи золотистых стафилококков и различных видов стрептококков.

Основные зоны колонизации — верхние отделы волосяных фолликулов, кожные железы, эпидермис и роговой слой кожи.

Микрофлора волосяного покрова идентична микрофлоре кожи. На 1 см^2 приходится 10^3—10^4 микроорганизмов, а на участках с повышенной влажностью (кожные складки) — 10^6.

Верхние отделы респираторного тракта физиологически наиболее приспособлены для осаждения микроорганизмов из выдыхаемого воздуха. Здесь осаждается 75% всех микроорганизмов. Преобладают различные стрептококки, нейссерии, стафилококки, энтеробактерии.

В носоглотке можно обнаружить менингококков, стрептококков и пневмококков, встречаются и бордетеллы. Это так называемое резидентное носительство.

Трахея и бронхи стерильны, так как воздух очищается от бактерий в верхних отделах респираторного тракта. Проскочившие микроорганизмы удаляются движениями ворсинок эпителия или уничтожаются макрофагами. При нарушении активности эпителия бронхов (наркоз) микроорганизмы проникают вглубь бронхиального дерева. Мелкие бронхи, альвеолы и паренхима легких стерильны.

Слезная жидкость обладает бактерицидным действием, поэтому большая часть микроорганизмов, попавших на слизистую оболочку глаз, гибнет. При снижении бактерицидной активности слезной жидкости возникают инфекционно-воспалительные процессы. Чаще всего эти процессы вызываются золотистыми стафилококками, коринебактериями и пневмококками.

Верхние отделы мочевыводящих путей (почки, мочеточники) в норме стерильны. В нижних отделах могут встречаться негемолитические стрептококки, непатогенные коринебактерии, стафилококки, микобактерии (*M. smegmatis*) и кандиды. В 1 мл мочи должно обнаруживаться не более 10^4 КОЕ.

Микроэкосистема женских половых органов является динамичной системой, зависящей от гормонального статуса. Особенностью этой системы является метаболическое взаимоотношение эпителия, влагалищной жидкости и микроорганизмов.

Под влиянием женских половых гормонов-эстрогенов цилиндрический эпителий вагины насыщается гликогеном, который утилизируется палочками Додерляйна (*Lactobacillus acidophilus*). В результате образования молочной кислоты pH среды смещается в кислую сторону, что препятствует колонизации влагалища другими микроорганизмами. Довольно редко во влагалище могут встречаться бифидобактерии, кокки и непатогенные коринебактерии.

В цервикальном канале помимо вышеназванных микрорганизмов встречаются пептострептококки, а при беременности могут появиться кандиды. Матка в норме всегда стерильна.

У девочек первых месяцев жизни характер микрофлоры такой же, как и у взрослых женщин, что объясняется действием материнских эстрогенов. Когда действие этих гормонов прекращается, лактобациллы исчезают и реакция среды становится слабощелочной. Появляется кокковая микрофлора, которая обладает слабым антагонистическим действием, поэтому девочки так подвержены риску заражения венерическими инфекциями через контаминированные предметы личной гигиены.

4.5. ИНФЕКЦИИ, СВЯЗАННЫЕ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

Вместо термина «госпитальная инфекция», или «внутрибольничная инфекция», в настоящее время используется термин «инфекция, связанная с оказанием медицинской помощи» (ИСМП).

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, поражают 5—10% пациентов, находящихся в стационарах, и занимают десятое место в ряду причин смертности населения. В России по данным официальной статистики ежегодно регистрируется примерно 30 тыс. случаев инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Некоторые группы пациентов особенно уязвимы: новорожденные дети, пожилые люди, пациенты с тяжелым течением основной патологии и множественными сопутствующими заболеваниями, пациенты, подвергающиеся агрессивным и инвазивным медицинским манипуляциям, трансплантации органов и т.п. В этих группах показатели заболеваемости ИСМП значительно выше.

Пациенты с ИСМП находятся в стационаре в 2—3 раза дольше, чем аналогичные пациенты без признаков инфекции. В среднем на 10 дней задерживается их выписка, в 3—4 раза возрастает стоимость лечения, и в 5—7 раз — риск летального исхода. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, существенно снижают качество жизни пациента, приводят к потере репутации учреждения здравоохранения.

Интенсивное развитие высокотехнологичных, инвазивных методов диагностики и лечения в сочетании с широким распространением микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью определяет необходимость непрерывного совершенствования систем надзора и контроля. Для этого и создана «Единая государственная система эпидемиологического надзора и профилактики ИСМП», которая представляет собой совокупность информационно-технологических, лабораторно-диагностических, научно-исследовательских и обучающих средств, обеспечивающих комплекс организационных, профилактических, противоэпидемических и лечебно-диагностических мероприятий с целью сокращения уровня заболеваемости и смертности пациентов.

Лабораторная диагностика и мониторинг возбудителей ИСМП — важнейшие компоненты системы эпидемиологического надзора за ИСМП.

Микробиологический мониторинг возбудителей ИСМП предусматривает:

- обязательное перманентное микробиологическое обеспечение системы эпидемиологического надзора за ИСМП;
- этиологическую расшифровку ИСМП у пациентов и медицинского персонала, внутривидовую идентификацию (типирование) возбудителей ИСМП;
- исследование объектов больничной среды;
- определение чувствительности выделенных штаммов микроорганизмов к антимикробным средствам;
- создание и ведение баз данных о возбудителях ИСМП;
- эффективный контроль качества микробиологических исследований в организациях здравоохранения;
- статистический анализ результатов исследований.

Объем и уровень микробиологических исследований должны соответствовать условиям и профилю организации здравоохранения, обеспечивать эффективность эпидемиологического надзора.

Учебно-методические материалы

Практическое занятие на тему **«Инфекционный процесс. Микроэкология человека»**.

Вопросы и задания для предварительного изучения

1. Что такое «факторы патогенности»?
2. Перечислите фазы инфекционного процесса.
3. Какова микрофлора кожи?
4. Расскажите о микрофлоре дыхательной системы.
5. Расскажите о микрофлоре желудочно-кишечного тракта.
6. Каковы оптимальные сроки пребывания больного в стационаре?

Глава 5

УЧЕНИЕ ОБ ИММУНИТЕТЕ. ИММУННАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Студент должен знать: определение иммунитета, основы иммунологических реакций, особенности иммунного ответа на бактерии, вирусы и грибы.

Ключевые слова и термины: тимус. Бурса Фабрициуса. Лимфоциты. Антигены. Антитела. Цитокины. Комплемент. Фагоцитоз.

5.1. РОЛЬ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ЗАЩИТЕ ЧЕЛОВЕКА ОТ ИНФЕКЦИЙ

Иммунная система предназначена для защиты организма от инфекций. В основе этой защиты лежат механизмы врожденного иммунитета (фагоцитоз, система комплемента, а также NK-клетки и др.). Другой формой иммунитета является развитие специфических иммунных реакций вследствие взаимодействия лимфоцитов и конкретных возбудителей (антигенов).

В течение всей жизни иммунная система обеспечивает поддержание антигенного гомеостаза каждого человека и при этом защищает внутреннюю среду организма от разнообразных чужеродных антигенов, попадающих в организм извне (бактерии, грибы, вирусы, различные высокомолекулярные соединения и т.д.), или от собственных антигенов, приобретающих в силу различных обстоятельств признаки чужеродности. Способность поддерживать неизмененными собственные антигены жидкостей, клеток и тканей позволяет каждому человеку сохранять в течение жизни свою антигенную индивидуальность.

В настоящее время установлено, что роль иммунологических факторов в защите человека от различных микробов вариабельна. При различных видах и при различных формах патологических процессов (острое, затяжное, рецидивирующее течение) отмечаются количественные изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов, уровнях иммуноглобулинов, состоянии механизмов фагоцитоза.

Принципиальная схема работы иммунитета может быть представлена следующим образом. Чужеродный микроб действует на антигенпредставляющую клетку (дендритная клетка, макрофаг), которая затем передает этот обработанный сигнал Т-клетке. Одновременно антиген действует на В-лимфоциты. Т-хелперы (помощники) передают «нечто» В-клетке, которая также уже вступила в контакт с антигеном. Только после этого В-клетка начинает делиться, превращаясь в антителопродуцирующую клетку или клетку памяти. В основе взаимодействия антигенпредставляющей клетки с Т-лимфоцитом лежит явление «двойного распознавания». Оказалось, что антигенпредставляющая клетка может передать сигнал об антигене не любому Т-лимфоциту, а только «своему», тождественному по генам главного комплекса гистосовместимости. Специальный рецептор CD4 на Т-лимфоците узнает, кто передает антиген, при этом клетки обмениваются рядом различных цитокинов, среди которых интерлейкины: факторы некроза опухоли, колониестимулирующий фактор и другие гуморальные факторы. Не менее сложно взаимодействуют Т- и В-лимфоциты. Эти процессы контролируются серией генов, которые относятся к главному комплексу гистосовместимости, и гуморальными факторами. Среди них есть специальные гены иммунного ответа. Большое значение в регуляции реакций иммунитета имеют цитокины, регулирующие развитие адаптивного иммунного ответа.

В настоящее время установлено, что иммунная система реагирует тропно на факторы, имеющие различную природу. Многочисленные и разнообразные реакции, развивающиеся в ходе специфического иммунного ответа, имеют адаптационный характер. Сила этой реакции зависит от природы антигена, состояния иммунной системы и наследственности. В связи с этим особую остроту приобретает вопрос о пределах динамики показателей защитных систем, позволяющих трактовать их отклонения от «нормы» или «исходного функционального состояния» как нормальный ответ на внедрение возбудителя, и о степени превышения этих пределов, свидетельствующей о развитии вторичной иммунологической недостаточности. И поэтому представляется очень важным использовать накопленные данные о динамике

различных факторов иммунной системы в разные периоды развития специфического иммунного ответа с целью прогноза течения заболевания, мониторинга лечения, предотвращения осложнений со стороны других органов и систем.

Таким образом, иммунитет — это комплекс наследственных и индивидуально приобретаемых механизмов, обеспечивающих постоянство антигенных свойств и жидкостей индивидуума (антигенный гомеостаз); он препятствует внедрению и распространению чужеродных веществ в организме, нейтрализует и разрушает их, удаляя из организма, а также обеспечивает их запоминание.

5.2. СТРОЕНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Иммунная система представляет собой совокупность всех лимфоидных органов и скоплений лимфоидных клеток тела, объединенных морфологически и функционально: лимфатические узлы, миндалины, селезенка, лимфоидные образования кожи и кишечника (аппендикс, пейеровы бляшки), лимфоциты костного мозга и крови. Все вместе они составляют единый «диффузный орган», объединенный общей функцией. Масса этого органа составляет 1% массы тела. Все клетки, осуществляющие иммунные реакции, называются иммуноцитами. Они составляют 25—30% общего количества клеток крови у взрослых.

Различают центральные и периферические органы иммунной системы. Центральным органом иммунопоэза является костный мозг. Здесь на первоначальных стадиях дифференцировки из полипотентных стволовых клеток образуются лимфоидные стволовые клетки, из которых впоследствии возникают две клеточные популяции: Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Тимус регулирует главным образом работу системы клеточного иммунитета (Т-системы). И в тимусе, и вне его Т-лимфоциты подвергаются регулирующему влиянию вилочковой железы.

Периферические органы иммунной системы представлены лимфоидными образованиями селезенки, лимфатических узлов кожи и другими образованиями (рис. 5.1).

Центральные органы иммунитета. Главным органом является костный мозг. Это поставщик самоподдерживающейся популяции полипотентных стволовых клеток для всех ростков кроветворения, из которых развиваются лимфоциты, моноциты, гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги тканей. Подавляющее большинство кост-

номозговых лимфоцитов — это В-лимфоциты, они могут выполнять функции предшественников плазматических клеток, т.е. антителопродуцентов.

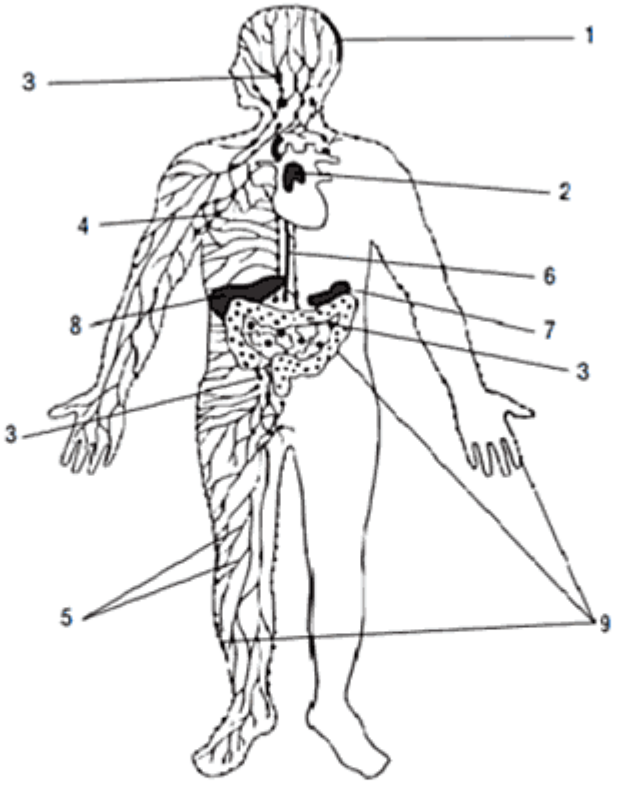

Рис. 5.1. Локализация иммунной (лимфоидной) системы в организме человека (по Р.М. Хаитову и др., 2000):
1 — кроветворный костный мозг; 2 — тимус; 3 — неинкапсулированная лимфоидная ткань слизистых оболочек; 4 — лимфатические узлы; 5 — сосуды лимфодренажа покровных тканей (афферентные лимфатические сосуды); 6 — грудной лимфатический проток (впадает в системную циркуляцию — кровь — через верхнюю полую вену); 7 — селезенка; 8 — печень; 9 — внутриэпителиальные лимфоциты

Лимфоидная стволовая клетка генерирует два типа клеток-предшественников Т- и В-лимфоцитов, из которых и развиваются обе популяции лимфоцитов. Предшественники Т-лимфоцитов проходят через тимус, затем мигрируют в периферические лимфоидные органы, где под влиянием вилочковой железы достигают окончательной степени зрелости, превращаясь в сенсибилизированные лимфоциты.

Другая часть лимфоцитов созревает в аналоге фабрициевой сумки, превращаясь в В-лимфоциты, ответственные за синтез иммуноглобулинов.

Тимус (вилочковая железа) — центральный орган Т-системы иммунитета. Тимус отвечает за различные проявления клеточного иммунитета, осуществляемого не антителами, а лимфоцитами (противодействие патогенным грибам, вирусам, отторжение опухолей, чужеродных тканей, например, пересаженных органов). Предполагают, что часть тимоцитов, находясь в вилочковой железе, взаимодействует с некоторыми тимусными эпителиальными клетками, избирательно экспрессирующими антигены II класса главного комплекса гистосовместимости, в результате чего «выживающие» Т-лимфоциты приобретают способность узнавать «свои» маркеры. Установлено, что в тимусе происходят элиминация клеток, способных реагировать против собственных антигенов (Т-клеточная толерантность), а также отбор Т-клеток, способных к одновременному распознаванию продуктов собственных MHC-генов вместе с чужеродными антигенами. Установлено, что сами тимоциты отличаются относительно низкой иммунологической активностью. Гормоны вилочковой железы индуцируют процессы созревания Т-лимфоцитов из Т-клеток-предшественников, способствуют превращению незрелых лимфоидных клеток и часто 0-лимфоцитов в Т-клетки; активируют или депрессируют клетки, генетически запрограммированные для дифференцировки в Т-лимфоциты.

Периферические органы иммунитета. Лимфатические узлы. Основная структурная единица лимфатического узла — лимфатический фолликул. Лимфатические узлы, как и тимус, содержат корковое и мозговое вещество. В корковом веществе находятся фолликулы, содержащие лимфоциты, макрофаги, плазмоциты, делящиеся клетки. В мозговом веществе фолликулов значительно меньше.

Лимфатические узлы выполняют целый ряд функций: это место образования лимфоцитов, здесь осуществляется синтез антител, происходит задержка различных чужеродных частиц и опухолевых клеток, а главное — здесь синтезируется значительное количество антител.

Селезенка. Построена аналогично тимусу и лимфатическим узлам. Основной структурный элемент — селезеночная долька. Лимфоидная ткань селезенки — белая пульпа, в ней есть тимуснезависимые и тимусзависимые зоны. В результате антигенной стимуляции в тимусзависимых зонах образуются лимфобласты, а в тимуснезависимых происходит пролиферация лимфоцитов и образование плазматических клеток.

Лимфоидная ткань селезенки играет важную роль в резистентности организма к инфекциям и поддержании гомеостаза, так как в ней могут синтезироваться антитела.

Миндалины глоточного кольца. Находясь в начале дыхательного и пищеварительного трактов, они первыми соприкасаются со всевозможными антигенами, поступающими с пищей, водой и воздухом.

Ткань миндалин содержит Т- и В-лимфоциты. Благодаря значительной поверхности миндалин, макрофаги интенсивно взаимодействуют с антигенами, и через кровь и лимфу «информация» поступает в центральные органы иммунной системы. На поверхности миндалин кроме Т- и В-лимфоцитов находятся иммуноглобулины различных классов, макрофаги, лизоцим, интерфероны, простагландины. Все это способствует осуществлению миндалинами местной защитной функции.

Лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками. Данная лимфоидная ткань сокращенно обозначается как MALT (mucosal association lymphoid tissue). MALT является субэпителиальным скоплением лимфоидной ткани, не ограниченной соединительнотканной капсулой и расположенной в слизистой оболочке различных органов и систем (дыхательная, пищеварительная, мочевыделительная). В зависимости от этого выделяют BALT (bronchial associated lymphoid tissue), GALT(gastrointestinal associated lymphoid tissue) и другие подразделения системы MALT. Наиболее изучены ткани GALT-системы. Подавляющее большинство (95%) неагрегированных лимфоидных клеток диффузно расположены между эпителиальными клетками в слизистой оболочке пищеварительного тракта, причем в эпителиальном слое преобладают Т-цитотоксические лимфоциты, а в собственной пластинке — Т-хелперы. Плазматические клетки имеют тенденцию к скоплению в собственной пластинке слизистой оболочки. Примерно 85% их продуцирует иммуноглобулины А, 6—7% — иммуноглобулины М, 3—4% — иммуноглобулины G и менее 1% — иммуноглобулины D и иммуноглобулины Е. В этом выражается основная роль лимфоидных образований слизистых оболочек — продукция димерного, секреторного иммуноглобулина А (SIgA).

Кровь относится также к периферическим органам иммунной системы. В ней циркулируют различные популяции лимфоцитов, моноциты, нейтрофилы.

Перечисленные органы, расположенные в различных частях тела, представляют собой единый диффузный орган и связаны между собой в цельную систему иммунитета сетью кровеносных и лимфатических

сосудов с помощью медиаторов иммунитета, а также нервной и эндокринной систем.

5.3. Т-СИСТЕМА ИММУНИТЕТА

Тимус как центральный орган иммунной системы представляет собой эволюционное приобретение позвоночных животных. У всех беспозвоночных он отсутствует даже в зачаточной форме. Возникновение данного органа у примитивных позвоночных животных было бесспорно ключевым событием в эволюции иммунитета. Появление специальной органной структуры, основное назначение которой — генерализация в онтогенезе Т-клеточного пути развития, значительно повысило эффективность работы всей системы специфической иммунной защиты. В вилочковой железе происходит формирование основных функционально самостоятельных субпопуляций Т-клеток, именно здесь медиаторы иммунитета находят свое наиболее эффективное выражение в регуляции созревания Т-клеточного пула и, наконец, именно от вилочковой железы зависит заселение периферии дифференцированными эффекторными и регуляторными клетками, принимающими непосредственное участие в иммунном реагировании. Тимус выявлен у миног, хрящевых и костных рыб, амфибий и рептилий. У них же развивается ответ на Т-клеточные митогены.

Определяющим признаком Т-клеток у млекопитающих является наличие мембранного Т-клеточного антигенраспознающего рецептора (ТКР) двух типов: ТКРαβ и ТКРγδ.

Претимические Т-клетки направляются в закладку тимуса и проникают в нее через кортикомедуллярное соединение. В субкапсулярном слое они пролиферируют, превращаясь в лимфобласты. Многие из этих клеток тесно контактируют с эпителиальными клетками-«нянями» тимуса. В этом слое клетки тимуса впервые экспрессируют CD8, а затем CD4 на низком уровне. В них происходит также перестройка (реаранжировка) TCR-генов и начинается экспрессия небольшого количества продуктов этих генов на клеточной поверхности. Созревающие клетки перемещаются в более глубокие слои корковой зоны и контактируют здесь с эпителиальными клетками. Последние удлиняются и ветвятся, создавая большую поверхность для контакта с тимоцитами. В результате контакта TCR тимоцитов взаимодействует с молекулами MHC эпителиальных клеток, и происходит позитивная селекция. Клетки, которые не подверглись селекции, погибают через апоптоз и фагоцитируются макрофагами. Во вре-

мя миграции тимоцитов из субкапсулярного слоя в более глубокую корковую зону в них повышается экспрессия CD3, TCR, CD4 и CD8. В кортикомедуллярном соединении происходит делеция аутореактивных тимоцитов, т.е. клеток, TCR которых распознают аутоантигены, презентируемые медуллярными эпителиальными клетками тимуса и макрофагами (негативная селекция). После этой стадии формируются клетки, экспрессирующие либо CD4, либо CD8. Они покидают тимус, мигрируя на периферию через специальные сосуды кортикомедуллярного соединения.

5.4. В-СИСТЕМА ИММУНИТЕТА

В отличие от Т-системы, первые признаки которой обнаруживаются у первично- и вторичноротых беспозвоночных и даже у некоторых видов простейших многоклеточных — губок и кишечнополостных (данные по аллотрансплантационному отторжению), В-система исторически развивалась, скорее всего, только в пределах подтипа позвоночных животных. Анализ способности к продукции антител в филогенетическом ряду ясно указывает на постепенное усиление этой иммунологической функции от менее организованных позвоночных животных к более совершенным их формам. Так, антителопродуцирующая функция возрастает от минимальной у костных рыб, рептилий до выраженной у птиц и млекопитающих.

В современной иммунологии IgG млекопитающих рассматривается как полифункциональная адаптерная молекула, которая с одной стороны взаимодействует с антигеном с помощью специфических антигенсвязывающих центров, а с другой — запускает эффекторные функции, такие как активация системы комплемента и связывание с рядом Fcγ-рецепторов, приводящие к опсонизации чужеродных клеточных элементов. Антигенсвязывающий центр рассматривается как основной идиотип (уникальный участок) антитела, который может взаимодействовать и с антигеном, и со специфическими антиидиотипическими антителами.

5.5. ЦИТОКИНЫ

Цитокины — это продуцируемые клетками белково-пептидные факторы, осуществляющие короткодистантную регуляцию межклеточных и межсистемных взаимодействий. Цитокины определяют выживаемость клеток, стимуляцию или ингибирование их роста,

дифференцировку, функциональную активацию и апоптоз клеток. Способность регулировать перечисленные функции обусловлена тем, что после взаимодействия цитокинов с комплементарными рецепторами на поверхности клеток сигнал через элементы внутриклеточной трансдукции передается в ядро, где активируются соответствующие гены. Белки, продукты активированных цитокинами генов, продуцируются клетками и регулируют перечисленные выше процессы.

Цитокины — гормоноподобные молекулы, действие которых на клетку-мишень опосредуется высокоспецифичными высокоаффинными мембранными рецепторами. Все рецепторы цитокинов представляют собой трансмембранные гликопротеины, у которых внеклеточная часть отвечает за связывание цитокина. Как правило, эти рецепторы состоят более чем из одной субъединицы, причем высокоаффинное связывание является следствием взаимодействия с разными субъединицами, каждая из которых сама способна связывать соответствующий цитокин, но с более низкой аффинностью. Нередко на клетках-мишенях цитокинов обнаруживаются несколько типов центров связывания, различающихся аффинностью к цитокину. Все рецепторы цитокинов представляют собой трансмембранные гликопротеины, у которых внеклеточная часть отвечает за связывание цитокина. В составе клеточных мембран одни цепи реагируют только с определенным цитокином, в то время как другие способны формировать общие рецепторы для разных цитокинов. Наличие общих структур в рецепторах может обусловливать функциональное сходство ряда цитокинов. Кроме того существуют общие групповые рецепторы, способствующие устранению избытка цитокинов в очаге поражения. Синтез рецепторов протекает более интенсивно и длительно, чем синтез соответствующих цитокинов, что обусловливает их более полную и быструю элиминацию из сосудистого русла и реализацию биологического эффекта в очаге поражения. Растворимый рецептор, связывающийся с цитокином, — это отщепленный ферментом внеклеточный домен мембранного рецептора. Растворимые рецепторы сохраняют высокую аффинность в отношении своих лигандов и благодаря этому способны нейтрализовать цитокины, препятствуя их доступу к интактным мембранным рецепторам; их можно обнаружить в сыворотке крови и моче. Растворимые рецепторы могут выполнять функции конкурирующих антагонистов, а также участвовать в транспорте, доставке цитокинов в очаг поражения и выведении их из организма.

В отличие от классических гормонов большинство цитокинов является молекулами локального (паракринного) действия. Они проду-

цируются и утилизируются клетками, находящимися в тесной близости. Возможно и аутокринное действие цитокинов, т.е. действие на ту же клетку, которая секретировала данный цитокин. После выделения клетками-продуцентами цитокины имеют короткий период полувыведения из кровотока. До 50% циркулирующих цитокинов интернализуется в течение 30 мин. Выведение катаболизированных цитокинов из организма осуществляется печенью и почками. Несмотря на короткий период жизни цитокинов, в сыворотках крови даже здоровых доноров иногда определяются низкие уровни цитокинов. Секреция цитокинов — краткосрочный процесс. Кодирующая цитокины мРНК нестабильна, что в сочетании с краткосрочностью транскрипции генов цитокинов приводит к краткосрочности их биосинтеза.

К системе цитокинов в настоящее время относят около 200 индивидуальных полипептидных веществ. К цитокинам относятся интерфероны, колониестимулирующие факторы, интерлейкины, хемокины, трансформирующие ростовые факторы, группа фактора некроза опухолей и некоторые другие. К общим главным свойствам цитокинов, объединяющим их в самостоятельную систему регуляции, относятся плейотропизм и взаимозаменяемость биологического действия, индуцибельный (в основном) характер синтеза, отсутствие антигенной специфичности действия, саморегуляция продукции и формирование цитокиновой сети. Биологические эффекты цитокинов опосредуются через специфические клеточные рецепторные комплексы. Цитокины в первую очередь регулируют развитие местных защитных реакций в тканях с участием различных типов клеток крови, эндотелия, соединительной ткани и эпителиев. В рамках иммунной системы цитокины осуществляют взаимосвязь между неспецифическими защитными реакциями и специфическим иммунитетом, действуя в обоих направлениях. На уровне организма цитокины осуществляют связь между иммунной, нервной, эндокринной, кроветворной и другими системами и служат для их вовлечения в организацию и регуляцию защитных реакций.

Цитокины могут быть выделены в новую самостоятельную систему регуляции основных функций организма, существующую наряду с нервной и эндокринной системами регуляции и связанную в первую очередь с поддержанием гомеостаза при внедрении патогенов и развитием инфекционного процесса.

Среди всех известных к настоящему времени секретируемых клетками регуляторных факторов две группы цитокинов являются наиболее хорошо изученными и в связи с этим наиболее часто используемы-

ми в диагностических целях. Это факторы роста и цитокины иммунной системы (ИС). Цитокины ИС характеризуются следующими общими свойствами:

- являются полипептидами или белками, часто гликозилированными, с молекулярной массой от 5 до 50 кДа. Для сравнения: молекулярная масса IgG составляет 160 кДа;
- не имеют антигенной специфичности биологического действия. Они влияют на функциональную активность клеток, принимающих участие в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета. Тем не менее, воздействуя на Т- и В-лимфоциты, цитокины способны стимулировать антигензависимые процессы в иммунной системе;
- синтез цитокинов является индуцибельным процессом. Большинство цитокинов не синтезируется клетками вне воспалительной реакции и иммунного ответа. Экспрессия генов цитокинов начинается в ответ на проникновение в организм патогенов, антигенное раздражение или повреждение тканей. Одними из наиболее сильных индукторов синтеза цитокинов служат компоненты клеточных стенок бактерий: липополисахариды, пептидогликаны и мурамилдипептиды;
- один и тот же цитокин может продуцироваться различными по гистогенетическому происхождению типами клеток организма в разных органах;
- биологические эффекты цитокинов опосредуются через специфические клеточные рецепторные комплексы, связывающие цитокины с очень высокой аффинностью. Каждый цитокин связывается со своим специфическим рецепторным комплексом.

Помимо этого цитокины:

- могут влиять на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность клеток-мишеней;
- определяют выживаемость клеток, стимуляцию или ингибирование их роста, дифференцировку, функциональную активацию и апоптоз клеток;
- синтезируются в процессе реализации механизмов естественного или специфического иммунитета;
- проявляют свою активность при очень низких концентрациях (порядка 10—11 моль/л);
- служат медиаторами иммунной и воспалительной реакций и обладают аутокринной, паракринной и эндокринной активностью;
- действуют как факторы роста и факторы дифференцировки клеток (при этом вызывают преимущественно медленные клеточные реакции, требующие синтеза новых белков);

• образуют регуляторную сеть, в которой отдельные элементы оказывают синергическое или антагонистическое действие;

• обладают плейотропной (полифункциональной) активностью.

Классификация цитокинов может проводиться по их биохимическим и биологическим свойствам, а также по типам рецепторов, посредством которых цитокины осуществляют свои биологические функции. В зависимости от того, какие клетки ИС преимущественно синтезируют тот или иной цитокин, различают интерлейкины, монокины и лимфокины. В настоящее время 37 интерлейкинов имеют цифровые обозначения (IL-1—IL-37), остальные цитокины — буквенные: CSF (колониестимулирующие факторы), OSM (онкостатин М), LIF (фактор, ингибирующий лейкозные клетки), NGF (фактор роста нервов), CNTF (цилиарный нейротрофический фактор), TNF (фактор некроза опухолей), INF (интерфероны) и т.д. Цитокины ИС можно условно подразделить на четыре группы.

1. Гемопоэтические факторы (CSF-G, -M, -GM, IL-3 и IL-7, эритропоэтин) — стимуляторы роста и созревания незрелых кроветворных клеток.

2. Регуляторы естественного иммунитета — провоспалительные цитокины (IFNб, в, IL-1 и IL-6, TNFб, хемокины — IL-8, MCP-1, RANTES и др.). Они участвуют в неспецифической защите организма от бактериальных и вирусных инфекций. Их основными мишенями являются клетки-фагоциты — макрофаги и гранулоциты.

3. Цитокины, регулирующие специфические иммунные реакции (IL-2 и IL-4, трансформирующий фактор роста — TGFв, и др.). Эти белки участвуют в активации, росте и дифференцировке зрелых лимфоцитов.

4. Цитокины, регулирующие воспалительные реакции, развивающиеся в процессе специфического иммунного ответа (INFг, IL-5, IL-10 и др.). Их основная функция — активация неспецифических эффекторных клеток. Спектры биологической активности цитокинов ИС в значительной степени перекрываются: один и тот же процесс может стимулироваться в клетке более чем одним цитокином. Во многих случаях в действиях цитокинов наблюдается синергизм. Антигенная стимуляция приводит к секреции цитокинов «первого поколения» — IL-1 и IL-6, TNFб, которые индуцируют биосинтез центрального регуляторного цитокина IL-2, а также IL-3, 4, 5, INFг и др. В свою очередь цитокины «второго поколения» влияют на биосинтез ранних цитокинов. Такой принцип действия позволяет не только регулировать иммунный ответ, но и амплифицировать его, вовлекая в реакцию все

возрастающее число клеток. IL-2 появляется в цитоплазме Т-клеток через 2 ч после стимуляции; IL-4 — через 4 ч, IL-10 — через 6 ч, IL-9 — через 24 ч. Пик выработки различных лимфокинов варьируется: 12 ч для IL-2, 48 ч для IL-4 и IL-5, 72 ч для IL-9 и INFг.

5.6. СИСТЕМА ИНТЕРФЕРОНОВ

Эти белки обладают противовирусной и иммуномодулирующей активностью. Молекулы интерферонов человека делятся на три основных типа, продуцентами которых преимущественно являются макрофаги и В-клетки: IFNв и IFNб, продуцируемые фибробластами, и IFNг, который синтезируют главным образом активированные Т-хелперы, относящиеся к субпопуляции Th1. Т-клетки продуцируют IFNг в результате стимуляции Т-клеточными митогенами, антителами против CD3, специфическими вирусными антигенами.

Различают три класса человеческого интерферона (IFN):

1) α-интерферон, продуцируется лейкоцитами, известно 20 субтипов;

2) β-интерферон, продуцируется фибробластами, известно 9 субтипов;

3) γ-интерферон, продуцируется лимфоцитами, ЕК, известен один субтип.

В общем виде свойства интерфернов представлены в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Свойства интерферонов

Показатель	Интерфероны		
	α	β	γ
Клетки-продуценты	Лейкоциты	Фибробласты	Т-лимфоциты
Количество изотипов	⩾ 20	⩾ 9	1
Индукторы	Вирусы, бактериальные продукты, полимеры	Синтетические митогены	Т-лимфоциты, лектины, антигены
Антигенная специфичность	+	+	+
Устойчивость при pH 9,0	+	+	—
При 56 °С — 1 ч	Устойчив	Устойчив	Устойчив
Молекулярная масса, кДа	17,5—22	20	38—68
Биологическая активность	Противовирусная		Иммуномодулирующая
Локализация генов	Хромосома 9	Хромосома 2,5	Хромосома 11

Среди гуморальных антигеннеспецифических факторов иммунной защиты важнейшее место занимают белки системы комплемента, которые сами обладают антимикробными свойствами и способны активировать другие гуморальные и клеточные факторы механизмов иммунной защиты организма. Эти белки являются нормальными компонентами сыворотки крови человека и животных и в обычных условиях недееспособны, но приобретают иммунобиологическую активность в результате последовательной активации компонентов системы. Система комплемента обеспечивает:

1) опсонизацию микробов для поглощения их фагоцитами;

2) непосредственное уничтожение микроорганизмов путем лизиса;

3) активацию и хемотаксическое привлечение лейкоцитов в очаг воспаления;

4) процессинг (специфическое расщепление) иммунных комплексов;

5) снижение порога активации В-лимфоцитов.

Непосредственные эффекторные функции системы комплемента связаны с активацией. Существуют три пути активации системы комплемента.

Классический путь инициируется антителами, связанными с поверхностью клеток-мишеней. Для его запуска необходим контакт с инфекционными агентами и образованием специфических антител. IgM являются наиболее эффективными активаторами, но свободный IgM плазмы крови не активирует систему комплемента. Выраженными активаторами являются и IgG1, IgG3. IgG2 обладает слабой активирующей активностью. IgG4 не способен связываться с C1. Соединение с C1 иммуноглобулинов зависит от присутствия ионов Ca2+. Если ионы Ca2+ отсутствуют, то активации не происходит. После связывания C1 с комплексом антиген — антитело субкомпонент C1s приобретает ферментативную активность и способен расщеплять следующий компонент — C4 на C4a и C4b. C4a остается в растворенном состоянии, C4b ковалентно связывается с поверхностью комплекса антиген — антитело (или с рецепторами инфекционного агента, или с другой активирующей субстанцией), затем присоединяет C2 с последующим образованием комплекса C4b2a, который называется C3-конвертазой классического пути, и последующим образованием мембраноатакующего комплекса C5—C9.

Альтернативный путь. В активации альтернативного пути участвуют шесть белковых факторов — B, D, P, H, I, а также общий для всех путей компонент C3. Ключевая стадия альтернативного пути СК —

формирование C3/C5-конвертазы альтернативного пути — C3bnBb. Дефицит любого белка альтернативного пути СК проявляется повышенной чувствительностью к инфекционным заболеваниям. Из дефицитов компонентов альтернативного пути описаны дефицит фактора D у пациентов с повторными инфекциями, вызванными нейссериями, а также дефицит пропердина. Около 45% пациентов с дефицитами пропердина перенесли менингококковую инфекцию, при этом летальность составила более 25%.

5.7. КЛЕТОЧНЫЕ АНТИГЕННЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Стволовые клетки. В настоящее время в мире наблюдается огромный интерес к стволовым клеточным элементам. И это представляется вполне оправданным, ибо при целом ряде патологий трансплантация стволовых кроветворных клеток (СКК) является единственно возможной помощью.

Реальными источниками СКК у человека для практического применения являются костный мозг и периферическая кровь, возможно применение СКК из пупочной вены и плаценты, из печени эмбрионов человека, из желточного мешка, из парааортальной области и из циркуляции у эмбрионов. Они обладают целым рядом преимуществ по своим характеристикам перед СКК взрослого организма. Наиболее перспективным источником СКК следует считать эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые являются онтогенетическими предшественниками СКК.

Признанным маркером для СКК является молекула CD34, она не регистрируется на ЭСК. Обладая адгезивными свойствами, CD34 характеризует способность СКК дифференцироваться в направлении кроветворных клеток. Данные литературы свидетельствуют, что ЭСК могут дифференцироваться в клетки практически всех тканей организма, а СКК дифференцируются в кроветворные клетки.

Ряд различий, имеющихся между ЭСК и СКК, скорее, может свидетельствовать об изменениях, необходимых для процесса адаптации клеток к меняющимся условиям микроокружения. Так, например, показано, что протеин-4 костного морфогенеза является необходимым фактором усиления дифференцировки ЭСК обезьян в СКК. Не исключено, что и во взрослом организме существуют субпопуляции стволовых клеток, для которых этот фактор также будет выполнять роль регулятора дифференцировки, хотя он и не оказывает влияния на зрелые СКК.

Естественно, механизм (или механизмы) дифференцировки ЭСК в СКК остается невыясненным. Теоретически она возможна.

Система дендритных клеток. Впервые дендритные клетки (ДК) были открыты немецким ученым Лангергансом в 1868 г. в коже. Однако в 1973 г. R. Steinman и Z. Conn обнаружили подобные клетки в селезенке мыши и определили их как новый тип лимфоидных клеток, характеризующихся наличием многочисленных цитоплазматических отростков, низкой плотностью, высокой подвижностью и способностью индуцировать мощный иммунный ответ. В настоящее время установлено, что ДК происходят из костномозговых предшественников миелоидного и лимфоидного ряда и до встречи с АГ находятся в незрелом состоянии. Захватывая и процессируя АГ, они проходят стадию созревания и мигрируют в лимфатические узлы и селезенку, где выполняют АГ-представляющую функцию. ДК образуют функционально единую систему морфологически сходных клеток, распределенных по всему организму. Наиболее многочисленны их популяции в слизистых оболочках и коже (входные ворота поступления АГ), а также в органах иммунной системы (область наиболее активного представления АГ). Основной морфологический признак ДК — наличие многочисленных длинных (> 10 мкм) и подвижных цитоплазматических отростков, что послужило основанием для названия клеток (от греч. dendron — дерево). Отростки образуются в процессе активации и дифференцировки ДК и в зависимости от типа ткани, окружающей клетки, могут быть самой разнообразной формы — нитевидными, в виде пластин (вуали) или луковичных псевдоподий.

В настоящее время выделяют четыре иммунофенотипически и функционально отличающихся друг от друга типа ДК. Показано, что ДК образуются преимущественно в красном костном мозге из предшественников миелоидного ряда или в тимусе из лимфоидных предшественников. Предшественники ДК обнаружены также в периферической и пуповинной крови человека.

Стволовая кроветворная клетка (СКК), несущая кластер дифференцировки CD34+, дифференцируется в два независимых полипотентных предшественника миелоидного ряда — CD34+CLA+ и CD34+CLA–, которые дают начало предшественникам CD14–CDla+ и CD14+CDla– соответственно.

Предшественник CD14–CD1a+ дает начало клеткам Лангерганса (КЛ, эпидермальные ДК). КЛ локализуются в коже выше базального слоя пролиферирующих кератиноцитов и ассоциированы с нервными окончаниями. В 1 мм^2 кожи человека содержится примерно 103 та-

ких клеток. Кроме того КЛ обнаружены в эпителии полости рта, пищевода, кишечника, репродуктивного тракта и дыхательных путей. Основное назначение КЛ — захват АГ и их представление Т-клеткам в Т-зависимых зонах регионарных лимфатических узлов.

Интерстициальные ДК. Предшественник CD14+CD1a– дифференцируется в моноциты (макрофаги) и гранулоциты, лишь 1% этих предшественников дает начало интерстициальным ДК (ИДК). Дифференцировке в ДК, а не в гранулоциты, способствуют такие цитокины, как ГМ-КСФ, ИЛ-4, ИЛ-6. При этом ИЛ-13 и ИЛ-7 могут в 2 раза усиливать эффект ИЛ-4, а фактор некроза опухоли б (ФНОб) и CD40L блокируют образование гранулоцитов и стимулируют окончательные этапы созревания ДК. ИДК обнаружены в интерстиции практически всех органов, где они локализуются преимущественно вблизи кровеносных сосудов и нервных окончаний. Показано наличие ИДК в интерстиции печени, сердца, легких, а также коркового вещества почек, в склере, радужной оболочке и роговице глаза. ИДК содержатся в интерстиции скелетных мышц и некоторых других тканей опорно-двигательного аппарата. ИДК присутствуют и в органах эндокринной системы — щитовидной железе, надпочечниках и островках Лангерганса поджелудочной железы, где происходит двустороннее взаимодействие эндокринных и иммунных клеток. Гормоны, синтезируемые эндокринными клетками, регулируют функции ДК. ИДК, как и все ДК миелоидного происхождения, выполняют антигенпредставляющую функцию.

Дендритные клетки лимфоидного происхождения. Тимические (интердигитальные) дендритные клетки. ДК лимфоидного происхождения образуются в тимусе из унипотентного предшественника Т-лимфоцитов CD38dim. CD11c– под действием таких цитокинов, как ИЛ-1в и ФНОб. ИЛ-7, ИЛ-3, CD40L также увеличивают продукцию этого типа ДК. Такие ДК называются тимическими (ТДК), они локализуются в мозговом слое тимуса и экспрессируют высокий уровень молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC) I и II классов.

Фолликулярные дендритные клетки. ФДК в отличие от остальных ДК происходят предположительно не из костномозговых предшественников, а из аутохтонных клеток ФДК, на них отсутствует общий лейкоцитарный маркер CD45, и они экспрессируют на своей поверхности все известные рецепторы комплемента. ФДК не способны ни к фагоцитозу, ни к иному способу переноса АГ внутрь клетки. Они связывают и длительное время удерживают комплексы АГ—АТ

с помощью Fc-рецепторов и рецепторов компонента С3 комплемента на поверхностной мембране.

Дендритные клетки крови. CD34+CLA+– и CD34+CLA– — предшественники ДК миелоидного ряда, недавно обнаружены и в периферической крови человека. Под воздействием таких факторов, как липополисахарид (компонент стенки микроорганизмов), ИЛ-6 и ГМ-КСФ, эти предшественники распределяются по различным тканям, где они также дают начало эпидермальным и интерстициальным ДК. Незначительная часть ДК миелоидного ряда может образовываться из предшественников непосредственно в крови. ДК периферической крови составляют менее 0,1% всех клеток белой крови. Функциональная значимость ДК, циркулирующих в крови, заключается в распознавании и захвате АГ.

Дендритные клетки в ЦНС. Имеются данные, свидетельствующие о том, что нарушения в функционировании ДК могут способствовать развитию как иммуновоспалительных реакций в ЦНС, включая рассеянный склероз, так и неопластических процессов.

Таким образом, иммунофенотипически и функционально различающиеся типы ДК, образующиеся из разных гемопоэтических предшественников и локализующиеся в разных тканях организма, образуют единую систему клеточных популяций, распознающих и представляющих антигены В-лимфоцитам для индукции иммунного ответа на чужеродные АГ или создания толерантности к ауто-АГ.

Функции зрелых дендритных клеток. Зрелые ДК миелоидного происхождения не только представляют АГ наивным Т-клеткам, индуцируя сильный Т-клеточный ответ, но и отвечают за поддержание баланса между Т-хелперами 1-го и 2-го типов. Кроме того ИДК способны стимулировать покоящиеся В-клетки к продукции АТ, а при определенных обстоятельствах могут способствовать переключению изотипа иммуноглобулинов в В-клетках. Основной функцией ФДК является поддержание жизнеспособности, роста и дифференцировки активированных В-клеток. Тимические и интердигитальные ДК отвечают за индукцию центральной и периферической толерантности к ауто-АГ.

Моноциты (макрофаги). В 1969 году была сформулирована концепция «системы мононуклеарных фагоцитов», которая объединила клетки (монобласты, промоноциты, моноциты и тканевые макрофаги), имеющие сходную морфологию, цитохимические и функциональные характеристики, общее происхождение. Мононуклеарные фагоциты обеспечивают неспецифическую антибактериальную защиту организма не только за счет своей фагоцитарной функции. Секретируемые

макрофагами ранние провоспалительные, а затем противовоспалительные цитокины контролируют первую линию обороны организма от инфекций, обеспечивая рекрутирование и активацию не только макрофагов, но и других защитных клеток (гранулоцитов, естественных киллеров).

Естественные киллеры (НК-клетки, natural killers, NK-cells). Главной функциональной особенностью этих клеток является независимость их цитотоксического эффекта от сенсибилизации к антигену, представленному на мембране клеток-мишеней. Хотя первоначально и предполагалась их гистогенетическая связь с Т-лимфоцитами, однако в дальнейшем такая точка зрения не получила распространения и в настоящее время большинство иммунологов придерживаются взгляда на НК как на самостоятельный класс иммунокомпетентных клеток.

Относительно специфичными для НК-клеток маркерами, принятыми для их идентификации, являются CD16 и CD56. Большое содержание на мембране CD16 считается признаком киллерных, а CD56 — регуляторных НК.

Естественные, или натуральные, киллеры (ЕК) представляют собой субпопуляцию лимфоцитов, происходящих из костномозговых предшественников. ЕК развиваются независимо от Т- и В-лимфоцитов и не несут характерных для Т- и В-лимфоцитов поверхностных маркеров. Их поверхностный фенотип: TKR–, CD4–, CD8–, CD3–, Ig–. Поверхностный фенотип ЕК, как правило, включает следующие маркеры: CD2, CD7, CD11, CD16, CD56, CD57.

Естественные киллеры — популяция лимфоцитов, осуществляющих широкий спектр биологических потенций по регуляции цитодифференцировки и элиминации генетически дефектных клеток и клеток, пораженных патогенами, без предварительной иммунизации. Биологическая роль ЕК реализуется через их цитотоксические эффекты с помощью секреторных продуктов этих клеток. Рецепторный аппарат ЕК, обеспечивающий эти функции, чрезвычайно разнообразен по своим функциональным характеристикам и по-разному представлен на ЕК различной субпопуляционной принадлежности. В частности, субпопуляционная структура ЕК обусловлена экспрессией определенных рецепторов межклеточных взаимодействий, получивших в свое время название линейных маркеров ЕК — CD56, CD16, CD3.

В соответствии с наличием линейных маркеров у ЕК выделяют субпопуляции с преобладанием высокого уровня секреторной активности — CD3+/CD56+/CDl6+, а также с выраженной способностью к цитолизу клеточных мишеней — CD37+/CD56+/CD16+.

Среди группы рецепторов выделяют две категории, различающиеся по структуре. В первую категорию входят киллингингибирующие рецепторы (KIR) из суперсемейства иммуноглобулинов, а во вторую — рецепторы семейства лектинов С-типа (KLR). И те, и другие способны к взаимодействию с разными детерминантами молекул МНС-1 на мембранах других клеток сингенного происхождения, обеспечивая с помощью своих цитоплазматических участков ингибирующие или активирующие сигналы трансдукции.

В случае преобладания активирующих сигналов ЕК способны осуществлять цитотоксическое повреждение клеток, несущих либо чужеродные (мутантные) МНС-1, либо МНС-дефектные мишени, возникающие в ходе нормальной цитодифференцировки или при патологических процессах (инфекции, опухолевая трансформация). Поскольку NK-клетки несут рецептор для IgG (FcrRIII; CD16), они способны уничтожать клетки-мишени, нагруженные IgG-антителами. Этот защитный механизм получил название антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦТ).

ЕК способны лизировать клетки, инфицированные внутриклеточными возбудителями, и ингибировать размножение микроорганизмов. В связи с этим ЕК в настоящее время рассматриваются как существенный компонент неспецифической защиты организма и как участники клеточно-опосредованного иммунного ответа. Наиболее существенный вклад вносят ЕК в предупреждение ранней прогрессирующей вирусной инфекции. ЕК несут рецепторы для следующих цитокинов: IL-2, IFNα/β, TGFβ, IL-1, IL-4, IL-10, IL-12. Главный ЕК-стимулирующий цитокин IL-12 продуцируется и секретируется макрофагами. IL-12 повышает цитолитическую активность ЕК, индуцирует их пролиферацию, усиливает синтез IFNγ. Ранняя продукция IL-12 в ответ на инфекцию является ключевым процессом активации ЕК и неспецифической защиты. Одновременно стимул к продукции IFNγ, который ЕК получают от IL-12, определяет характер последующего специфического иммунного ответа как клеточно-опосредованного. Описаны также иммунодефициты человека с селективным дефектом естественных киллеров, что проявляется чрезвычайно высокой чувствительностью к некоторым вирусным антигенам. У больных с таким дефектом даже при нормальном уровне специфического гуморального и клеточного иммунного ответа на антигены вируса герпеса нередко развивается диссеминированная форма герпетической инфекции.

Клетки, участвующие в иммунном ответе (врожденном и приобретенном), представляют собой неоднородную популяцию, различаю-

щуюся по генетическим и функциональным особенностям. Для их систематизации предложена классификация CD (cluster differentiation), в основу которой положены различия между кластерами клеток в поверхностных дифференцировочных маркерах (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Основные дифференцировочные маркеры клеток, участвующих в иммунном ответе

CD-маркер	Тип клетки, несущей маркер	Функция
CD1	Т-лимфоцит	Участвует в представлении антигена
CD2	Т-лимфоцит	Осуществляет адгезию (прилипание) цитотоксических Т-лимфоцитов к клеткам-мишеням, Т-лимфоцитов к эндотелию, тимоцитов к тимическим эпителиальным клеткам
CD3	Т-лимфоцит	Проведение сигнала активации Т-клетки, маркер абсолютного большинства всех зрелых Т-лимфоцитов
CD4	Т-лимфоцит	Ко-рецептор для ТКР при МНС I
CD8	Т-лимфоцит	Созревание и позитивная селекция МНС I
CD25	Т-, В-, НК-клетки, тимоциты, макрофаги	Индуцирует активацию и пролиферацию Т-, В-лимфоцитов, естественных киллеров (НК), тимоцитов и макрофагов, а
CD28	Т-лимфоцит	Ко-стимуляторная сигнальная молекула, независимая от ТКР
CD30	Т-лимфоцит	Проведение сигнала для запуска апоптоза Т-лимфоцитов
CD5	Т- и В-лимфоциты	Выражен при аутоиммунных заболеваниях, ко-стимуляторный сигнал активации Т-лимфоцитов и тимоцитов
CD9	В-лимфоцит	Представлен на пре-В-клетках, ответственен за агрегацию и активацию тромбоцитов
CD19, 20, 21	В-лимфоцит	Регуляция активации и пролиферации В-лимфоцитов
CD22	В-лимфоцит	Ответственен за адгезию к эритроцитам, Т-клеткам, В-лимфоцитам, моноцитам и нейтрофилам
CD40	В-лимфоцит	Участвует в В-клеточной активации, пролиферации и дифференцировке
CD16	Естественный киллер	Активация антигензависимой комплементопосредованной цитотоксичности и цитокиновой продукции

Окончание

CD-маркер	Тип клетки, несущей маркер	Функция
CD56	Естественный киллер	Активация цитотоксичности и цитокиновой продукции
CD94	Естественный киллер	Ингибиция/активация цитотоксичности естественных киллеров
CD11a/ CD18	Моноциты, гранулоциты	Адгезия (прилипание) лейкоцитов к эндотелию, адгезия лейкоцита к лейкоциту
CD11b/ CD18	Моноциты, гранулоциты	Адгезия моноцитов и гранулоцитов к эндотелию, при воспалении фагоцитарный рецептор
CD45	Гранулоциты	Рецептор для тирозинфосфатазы
CD64	Макрофаги	Активация макрофагов
CD34	Стволовая клетка, коммитированный колониеобразующий предшественник	Прикрепление L-селектин+-лимфоцитов к эндотелию сосудов, прикрепление стволовых гемопоэтических клеток к строме костного мозга

Лимфоциты — это единственные клетки организма, способные специфически распознавать и различать разные антигены и отвечать активацией на контакт с определенным антигеном. При весьма сходной морфологии малые лимфоциты делятся на две популяции, имеющие различные функции и продуцирующие разные белки. Лимфоциты экспрессируют разные поверхностные молекулы, относящиеся к разным семействам, гены которых произошли, скорее всего, от нескольких исходных генов. Выделяют следующие основные маркеры:

- суперсемейство иммуноглобулинов (включает молекулы, структурно подобные антителам — CD2, CD3, CD4, CD8, MHC 1-го и 2-го классов);
- семейство интегринов — гетеродимерные молекулы, образованные б- и в-цепями. Существует несколько подсемейств интегринов, все они имеют общую в-цепь и каждый уникальную б-цепь. Так, подсемейство в2-интегрины имеют в-цепь, представленную CD18, с которым ассоциированы CD11a, CD11b, CD11c. Их комбинации образуют функциональные антигены лейкоцитов LFA-1, Mac-1 (CR3), 150,95. У подсемейства в1-интегринов в-цепь представлена молекулой CD29, которая ассоциирована с другими пептидами и подсемейство включает маркеры поздней стадии активации — VLA;

• селектины (CD62, E, L, P) экспрессируются лейкоцитами (L), активированными клетками эндотелия и тромбоцитами (E, P). Они обладают лектиноподобной специфичностью к разным сахарам в составе высокогликозилированных мембранных гликопротеинов (CD43);

• протеогликаны (типичный CD44) имеют ряд гликозаминогликановых участков (для хондроитинсульфата), они связываются с компонентами внеклеточного матрикса (с гиалуроновой кислотой);

• суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли, фактора роста нервов (NGF);

• суперсемейство лектинов С-типа и др.

Основная функция семейства маркерных молекул — обеспечение связи лимфоцитов с их микроокружением, а также обеспечение миграции, адгезии и активации лимфоцитов.

5.8. СТРУКТУРА АНТИТЕЛ И ИХ ФУНКЦИИ

Иммуноглобулины представляют собой группу эволюционно и структурно родственных белков, обладающих свойствами антител. Основной структурной единицей молекул иммуноглобулинов является гетеротетрамер, построенный из идентичных полумолекул, образованных тяжелыми и легкими полипептидными цепями и расположенных по обе стороны от оси симметрии (рис. 5.2). Тяжелые цепи содержат от 450 до 550 аминокислотных остатков, а легкие около 220. Каждая легкая цепь соединена с тяжелой при помощи одной дисульфидной связи. Количество таких связей между полумолекулами варьирует в зависимости от строения тяжелой цепи.

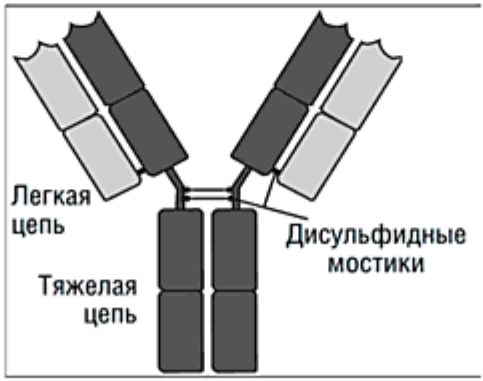

Рис. 5.2. Структура молекулы иммуноглобулинов (по A.K. Abbas, 2009)

Циркулирующие иммуноглобулины — это растворимые гликопротеины, присутствующие в сыворотке крови, тканевой жидкости или на клеточной мембране, которые распознают и связывают антигены. Они экспрессируются в виде мембранных рецепторов на поверхности В-лимфоцитов, растворимых молекул, присутствующих в сыворотке или тканевой жидкости. Взаимодействие В-клеточного рецептора со специфичным антигеном способствует дифференцировке В-лимфоцитов в плазматические клетки, секретирующие антитела.

Разнообразие генов антител у различных видов возникло в результате множественных генных дупликаций и последующей дивергенции. В процессе эволюции в результате рекомбинаций и мутаций это разнообразие еще более выросло. Иммуноглобулин любого изотипа распознает и связывает антиген, способствует удалению иммунных комплексов.

Различают пять типов тяжелых цепей (Н-цепей): α (альфа), γ (гамма), μ (мю), ε (эпсилон), δ (дельта) и два типа легких цепей (L-цепей): ϰ (каппа) и λ (лямбда). В соответствии с пятью типами тяжелых цепей различают пять классов (изотипов) иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Каждый класс Ig несет свои особые изотипические антигенные детерминанты — эпитопы, расположенные в константных областях тяжелых и легких цепей. Благодаря этим антигенным изотипическим детерминантам можно определять с помощью соответствующих антител принадлежность иммуноглобулина к определенному классу.

Кроме того, в составе константных областей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов могут быть выявлены аллотипические антигенные детерминанты, которые определяют антигенные различия внутри одного и того же изотипа антител.

В нормальной сыворотке крови 80% всех иммуноглобулинов составляют IgG, на долю IgM приходится 6%, на долю IgA — 13,5%, а на долю IgE и IgD — сотые или тысячные доли процента.

Иммуноглобулин G единственный из иммуноглобулинов способен преодолевать плацентарный барьер и обеспечивать гуморальный иммунитет новорожденных первых месяцев жизни. Дополнительные порции содержащегося в молозиве IgG поступают в кровоток новорожденного через слизистую оболочку кишечника. IgG составляют основную массу антител при вторичном иммунном ответе, а также сравнительно легко выходят в тканевые жидкости, где обеспечивают антибактериальную и антитоксическую защиту.

Схематически молекула антитела класса IgG может быть изображена состоящей из трех структурных единиц приблизительно равного разме-

ра. Две из них идентичны по строению и содержат антигенсвязывающие центры (Fab-области), а третья (Fc-область) ответственна за взаимодействие с молекулами, вовлеченными в процессы элиминации антигена: клеточными рецепторами, компонентами комплемента и т.д.

Исходно подразделение IgG на четыре подкласса было основано на антигенных различиях. Впоследствии оно было подкреплено данными о структурных, физико-химических и функциональных особенностях каждого подкласса.

Позднее было установлено, что все субклассы IgG являются продуктами отдельных высокогомологичных генов и что, несмотря на принадлежность к одному классу молекул антител и значительное сходство отдельных характеристик, каждый из четырех подклассов IgG обладает индивидуальным профилем биологических свойств (табл. 5.3) и занимает в общей картине явлений иммунитета свое особое место.

Таблица 5.3

Биологические свойства подклассов IgG человека

Биологические свойства	Подклассы IgG			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Содержание в сыворотке, мг/мл	7,1	3,0	0,80	0,40
Содержание в сыворотке, %	58—71	19—31	5—10	3—6
Экспрессия на В-лимфоцитах, %	40	48	8	1
Доля плазмоцитов-продуцентов, %	64	26	8	1
Связывание C1q	++	+	+++	–
Связывание с FcR-I	+++	+	+++	+
Связывание с FcR-II	++	+	++	+
Связывание с FcR-III	++	+	++	+
Связывание с РФ	+	+	–	+
Связывание с белком А стафилококка	++	++	–	++
Связывание с белком G стрептококка	++	++	++	++
Перенос через плаценту	++	+	++	++
Время полужизни в крови, дни	12—21	12—21	7—8	11—21
Блокирующая активность при аллергии	–	–	–	+
Функциональная валентность	2	2	2	1
Активация системы комплемента	++	+	+++	+
Реактант при формировании антител против полисахаридов оболочки вирусов и капсулы бактерий	+++	+	+	+

Окончание

Биологические свойства	Подклассы IgG			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Иммунный ответ на полисахаридные антигены	–	+++	–	–
Реакция на хроническую антигенную стимуляцию	+	+	+	+++

Примечание: «+++», «++» и «+» обозначают соответственно высокую, умеренную и низкую степень выраженности функций; «–» — отсутствие функций.

Иммуноглобулин М — пентамер, состоящий из пяти четырехцепочечных структур, его называют макроглобулином из-за высокой молекулярной массы. Поливалентность молекулы обеспечивает высокую суммарную авидность связывания антигенов со множественными эпитопами. IgM синтезируется раньше других классов в онтогенезе. Может продуцироваться в организме плода в ответ на внутриутробную инфекцию. Этот класс иммуноглобулинов первым появляется на самых ранних стадиях гуморального иммунного ответа на инфекцию и у взрослых, т.е. представляет собой антитела первичного ответа.

Функционально IgM представляют собой антитела с относительно низкими константами аффинности. Наличие десяти связывающих центров может существенно увеличить их интегральную связывающую способность, однако из-за пространственных ограничений этот потенциал реализуется лишь при взаимодействии с малыми молекулами, масса которых не превышает 1,5 кДа. В реакциях с антигенами большего размера IgM ведут себя как молекулы, имеющие от двух до пяти центров связывания. Это позволяет им выступать в качестве факторов, агглютинирующих и инактивирующих вирусы и бактерии. Возможно, большой размер молекулы IgM благоприятствует связыванию и агрегации крупных частиц с малой плотностью антигенных детерминант на поверхности.

Невысокий уровень аффинитета сопряжен с полиреактивностью антител класса IgM. Аутореактивность IgM-антител служит основой развития ряда заболеваний, в которых явления аутоиммунитета играют роль ведущего патогенетического фактора. В последние годы с помощью гибридомной техники получены неоспоримые доказательства присутствия в нормальном организме клеток, продуцирующих антитела, способные связывать широкий круг структурно неродственных антигенов, таких как тиреоглобулин, в2-микроглобулин, инсулин,

а также белки и углеводы вирусов и бактерий. Основную часть таких антител составляют IgM.

В качестве фактора противоинфекционной защиты IgM-антитела функционируют в сыворотке крови, лимфе и межклеточной среде. Они первыми появляются в крови в ходе иммунного ответа. Содержание IgM в сыворотке крови в норме колеблется от 0,5 до 1,5 мг/мл. Наличие в составе молекулы J-цепи делает возможным также трансэпителиальный перенос IgM с присоединением секреторного компонента, поэтому IgM функционирует и как секреторный Ig слизистых оболочек и выделений экзокринных желез.

Иммуноглобулин А представлен двумя подклассами (IgA1 и IgA2) и существует в двух различных формах — секреторной и сывороточной. Секреторный IgA состоит из димеров и полимеров с молекулярной массой 400 кДа и выше, среди которых оба подкласса представлены в равных количествах. В сывороточном IgA доминируют мономерные молекулы IgA1 с массой 170 кДа. Подклассы IgA1 и IgA2 выраженно различаются по структуре шарнирной области. У IgA1 она довольно протяженная, а у IgA2 — укорочена.

IgA является основным иммуноглобулином секретов слизистых оболочек и экзокринных желез. Его синтезируют лимфоидные ткани, связанные со слизистыми покровами кишечника, дыхательных и мочеполовых путей, а также с железистым эпителием молочных, слюнных, слезных и других желез. В паренхиме этих тканей, под базальной мембраной и вокруг протоков, выводящих продукты секреции, расположены множественные лимфоидные фолликулы и одиночные клетки-продуценты IgA-антител. В тесной связи со слизистыми покровами и железами находятся скопления регионарных лимфатических узлов и особые лимфоэпителиальные образования, пейеровы бляшки и миндалины. Совокупность этих структур представляет собой отдел иммунной системы, обеспечивающий местный иммунитет. Слизистые оболочки являются основными воротами проникновения в организм инфекционных агентов и антигенных субстанций и потому развитие иммунного ответа при попадании антигенов на слизистые оболочки и последующая секреция антител являются ключевыми механизмами поддержания иммунологического гомеостаза.

Система местного иммунитета, будучи тесно связанной с остальными отделами иммунной системы, обладает в то же время известной автономностью, которая проявляется в особенностях синтеза и функционирования IgA-антител.

Формирование плазматических клеток-продуцентов IgA начинается в лимфоидной ткани кишечника. В-лимфоциты, прошедшие первую стадию антигензависимой дифференцировки, т.е. способные к распознаванию определенного антигена и синтезу IgM-антител, с кровотоком попадают в пейеровы бляшки и там подвергаются воздействию нескольких дифференцировочных стимулов. Первый из них возникает при связывании антигена с мембранными IgM- и IgD-рецепторами и индуцирует размножение клонов-продуцентов антител, специфичных к участвующему в реакции антигену. Второй сигнал исходит от локализованных в пейеровых бляшках антигенспецифичных Т-хелперов, называемых также клетками-переключателями. Их воздействие на созревание В-лимфоцитов состоит в избирательной активации генов кодирующих δ-цепь. В результате В-лимфоциты превращаются в клетки, коммитированные к продукции IgA. Затем с током лимфы они покидают пейеровы бляшки, проходят через мезентериальные лимфоузлы, попадают в кровоток и мигрируют в костный мозг или печень. Находясь в этих тканях, они проходят заключительные этапы созревания и формируют пул клеток, продуцирующих сывороточный IgA и способных вторично мигрировать в лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистыми оболочками и экзокринными железами.

Основные особенности выработки IgA плазматическими клетками состоят в том, что в ходе биосинтеза в структуру молекулы включается полипептидная J-цепь и что конечные продукты синтеза являются моно- или димерными молекулами, содержащими два или четыре центра связывания антигена.

Продукция секреторного IgA имеет ряд дополнительных особенностей. Плазматические клетки системы локального иммунитета вырабатывают IgA в форме димеров или полимеров более высокого порядка. Транспорт IgA через слизистые покровы или железистый эпителий осуществляется путем взаимодействия с секреторным компонентом (СК), продуктом эпителиальных клеток, который они синтезируют и экспрессируют в виде связанного с мембраной рецептора. Функция СК состоит в присоединении полимерных Ig и транспорте их через слой эпителия в просвет железы или на поверхность слизистой. Мембраносвязанный СК обладает высоким сродством к J-цепи, находящейся в составе полимерных молекул IgA и IgM. Опосредованное J-цепью связывание димерной молекулы IgA с СК на мембране эпителиальной клетки ведет к образованию эндоцитозных пузырьков, которые проходят через цитоплазму к апикальной поверхности клетки.

Часть локально синтезированных димерных молекул IgA, не достигшая слоя эпителиальных клеток, с током лимфы через грудной проток попадает в систему кровообращения.

На мембранах клеток паренхимы печени и эпителия желчных путей также присутствует секреторный компонент, который обеспечивает захват IgA из кровотока, превращение его в секреторную форму, перенос в желчь и далее — в просвет кишечника. Таким образом, эпителий кишечника «омывается» двумя встречными потоками секреторного IgA.

Иммунохимически секреторный IgA, выделенный из молозива, желчи или иных секретов, обладает рядом особенностей, связанных с полимерной структурой молекулы и наличием четырех и более центров связывания антигена. В опытах in vitro он агглютинирует бактерии, нейтрализует вирусы и преципитирует растворимые антигены, не уступая по эффективности антителам класса IgM. В отличие от IgM, молекулы IgA лишены участка связывания C1q и потому могут активировать комплемент только по альтернативному пути. Секреторный IgA функционирует в средах, богатых пищеварительными ферментами, которые выделяют клетки организма. Защиту IgA от разрушения протеазами обеспечивает секреторный компонент. С другой стороны, бактериальная микрофлора слизистых оболочек также является источником ферментов, среди которых обнаружены протеазы, способные преодолевать защитное действие секреторного компонента и, разрушая IgA, снижать эффективность механизмов иммунной защиты от инфекций.

В организме секреторный IgA выполняет несколько функций, связанных с поддержанием иммунологического гомеостаза. Связываясь с бактериями, они изменяют гидрофобность и заряд их поверхности и этим препятствуют адгезии микроорганизмов на слизистых и реализации их патогенного потенциала. Связывание IgA-антител с вирусами, находящимися на поверхности слизистых оболочек или проникших в эпителиальные клетки, препятствует развитию и распространению вирусных инфекций.

Образуя иммунные комплексы с инфекционными агентами, IgA-антитела активируют систему комплемента, и в то же время усиливают действие неспецифических бактерицидных факторов (лактоферрин, лизоцим). IgA-антитела участвуют в реакциях фагоцитоза и клеточно-опосредованной цитотоксичности в качестве присоединенного через Fc-рецептор компонента мембраны нейтрофилов, макрофагов или моноцитов. Связывая токсины и ферменты, они обеспечивают нейтрализацию их активности и удаление из организма.

Чрезвычайно важная функция секреторного IgA состоит в подавлении переноса антигенов через поверхность слизистой и попадания их в кровоток. Это предотвращает избыточную антигенную стимуляцию иммунной системы и сенсибилизацию в отношении микробных и пищевых антигенов. Понижение уровня IgA-антител при вскармливании младенцев заменителями материнского молока часто служит причиной аллергизации, поэтому поступление секреторного IgA с молоком матери в период новорожденности не только необходимо для защиты от инфекций, но и является фактором снижения риска развития аллергических реакций на бактериальные и пищевые антигены.

В отличие от секреторного IgA сывороточный IgA слабо преципитирует растворимые антигены и агглютинирует бактерии. Его роль в иммунной защите организма в значительной мере определяется взаимодействием с клетками иммунной системы, несущими на своей мембране Fc-рецептор и осуществляющими клеточно-опосредованные защитные реакции (цитотоксические эффекты, фагоцитоз и др.). Сывороточный IgA взаимодействует также с гуморальными факторами неспецифической защиты (комплемент, лактоферрин, лизоцим) и усиливает их антибактериальное действие. В целом функции сывороточного IgA пока определены недостаточно четко, однако некоторые из них уже известны в достаточной мере. Иммунные комплексы, формируемые сывороточным IgA, обладают высокой растворимостью, поэтому они медленно выводятся из кровотока и, как установлено, проявляют свойства толерогенных факторов, которые индуцируют неотвечаемость на антигены, проникающие в кровоток из пищеварительного тракта. Известно также, что сывороточные IgA-антитела могут блокировать реакции, опосредуемые антителами других классов, таких как IgM и IgE, и таким путем влиять на ход воспалительных процессов и реакций, связанных с гиперсенсибилизацией. Таким образом, согласно современным представлениям сывороточный IgA преимущественно играет роль регулятора иммунологических процессов.

Общее количество IgA, синтезируемого системой локального иммунитета, составляет до 3—5 г в сутки. В сыворотке человека IgA присутствует в количествах (2—3 г/л), превышающих уровень IgM (1—2 г/л) и уступающих только содержанию IgG (8—16 г/л). Сывороточный IgA на 90% состоит из мономерных молекул и представлен преимущественно IgA1. Около 10% составляют димеры IgA, несущие J-цепь. Молекулы, содержащие секреторный компонент, удается обнаружить в сыворотке в качестве примеси, составляющей доли процента. В то же время, согласно имеющимся оценкам, объем синтеза

IgA в организме примерно вдвое превышает объем валового синтеза антител остальных изотипов, что, вероятно, связано с необходимостью обеспечить иммунную защиту слизистых, площадь которых в 200 раз превосходит поверхность кожных покровов.

Следует подчеркнуть тесную связь механизмов, регулирующих выработку IgA и IgE-антител. Гиперпродукция IgE у пациентов и у экспериментальных животных сопровождается уменьшением числа и клеточности пейеровых бляшек и увеличением количества клеток-продуцентов IgE почти исключительно в мезентериальных лимфоузлах при очень малом количестве или полном отсутствии их в других лимфоидных структурах.

Выработка секреторных IgA-антител может активизироваться при контакте антигена со слизистыми дыхательных путей или пищеварительного тракта. Этот факт послужил отправной точкой в разработке приемов вакцинации, индуцирующих формирование преимущественно секреторного иммунитета. Важно, что такая вакцинация вызывает синтез IgA-антител не только в месте аппликации антигена, но и в других органах — молочных, слюнных и слезных железах, в дыхательном и мочеполовом тракте. Примером успешной реализации этого подхода может служить широко известная практика вакцинации против полиомиелита. Однако серьезным барьером на пути реализации этого подхода является развитие иммунологической неотвечаемости, которая сопутствует энтеральному введению антигена. Недостаточность продукции IgA является наиболее частым первичным иммунодефицитом и проявляется в стойком снижении концентрации сывороточного IgA до уровня ниже 0,5 г/л. Среди здоровых лиц (доноров крови) такое отклонение встречается с частотой от 1:300 до 1:3000. Среди пациентов, страдающих аллергическими расстройствами, частота дефицита IgA составляет у детей 1:20, а у взрослых 1:160. Высокую частоту IgA-дефицита обнаруживают у больных с аутоиммунными заболеваниями, ревматоидным артритом.

Приобретенный IgA-дефицит чаще всего возникает вследствие лечения пенициллином, сульфаниламидами. В значительной части случаев (до 50%) у пациентов с IgA-дефицитом обнаруживают аутоантитела к IgA. Большинство пациентов с IgA-дефицитом предрасположены к вирусным инфекциям, аутоиммунным и аллергическим заболеваниям, резистентность к бактериальным инфекциям у них обычно не нарушена.

Повышенная продукция поликлонального IgA может быть следствием усиленной стимуляции иммунной системы. Такую картину на-

блюдают при острых инфекциях мочевых путей, при холере, колитах, цирротических поражениях печени. При ревматоидных артритах синтез IgA происходит в синовиальных оболочках суставов, пораженных воспалительным процессом.

Известен ряд заболеваний, при которых IgA-антитела играют роль ведущего патогенетического фактора. Одним из них является IgA-нефропатия (болезнь Бергера), гломерулонефрит. Заболевание ведет к прогрессирующей почечной недостаточности вследствие вначале воспалительных, а затем склеротических изменений структуры почечных клубочков. Поражение обусловлено массивным отложением в мезангии иммунных комплексов, содержащих IgA. Природа антигена, входящего в состав комплексов, окончательно не определена, однако ряд данных указывает на важную роль пищевых белков — глиадина, казеина, лактальбумина, овальбумина, лизоцима и белков сои. С другой стороны, существуют данные о возможной связи IgA-нефропатии с вирусами цитомегалии и гепатита В. Иммунохимический анализ мезангиальных отложений выявил в них присутствие IgA1, но не IgA2. В 25—50% случаев в сыворотке пациентов обнаруживали повышенный уровень IgA1 с низким аффинитетом. Повышенная продукция низкоаффинных антител является признаком иммунной недостаточности и может быть причиной малой эффективности механизмов выведения иммунных комплексов из циркуляции.

Нарушения продукции IgA-антител к пищевым белкам лежат также в основе некоторых заболеваний пищеварительной системы. При целиакии (чревной болезни) отложения иммунных комплексов, содержащих глиадин и специфичные к нему IgA-антитела, обнаруживают на поверхности ворсинок тонкой кишки. Деструкция ворсинок нарушает процесс всасывания, развивается диарея. Для целиакии характерно повышение продукции антител к глиадину, относящихся к субклассу IgA1.

Иммуноглобулин Е. В отличие от иммуноглобулинов других классов IgE-антитела не могут активировать комплемент, опсонизировать или агглютинировать бактерии, нейтрализовать вирусы или преципитировать антигены. Основное свойство IgE состоит в способности сенсибилизировать в отношении определенного антигена (аллергена) мембраны тучных клеток и базофилов. Связывание молекул антигена с мембранным IgE служит сигналом для освобождения из этих клеток ряда биологически активных веществ, вызывающих спазм гладкой мускулатуры, повышение проницаемости сосудов, воспалительные реакции и другие сдвиги, лежащие в основе явлений гиперчувстви-

тельности немедленного типа. Доказано участие этого механизма в патогенезе анафилаксии и аллергии, а также в формировании и реализации иммунной защиты против паразитарных инвазий. Считают, что основная доля IgE в организме связана с рецепторами мембран тучных клеток, базофилов, лимфоцитов и других клеточных элементов, что и является одной из главных причин низкого содержания антител этого класса в сыворотке.

Паразитарные инвазии представляют собой группу заболеваний человека и животных, при которых повышенная продукция IgE-антител наиболее очевидно связана с механизмами иммунной защиты. Продемонстрирована возможность переноса устойчивости животных к заражению паразитами с помощью IgE-антител. С другой стороны, установлено, что:

1) формирование противопаразитарного иммунитета зависит от функций Т-клеточного звена иммунной системы;

2) наряду с продукцией антител в процессе ответа на паразитарную инвазию возникают цитолитические Т-лимфоциты-эффекторы, а также популяции регуляторных Т-клеток — хелперов и супрессоров;

3) проникшие в организм паразиты выделяют вещества, усиливающие как эффекторные, так и супрессорные звенья механизмов иммунной защиты, и потому способны двунаправленно влиять на баланс реакций организма-хозяина, индуцируя либо ликвидацию инвазии, либо устойчивый симбиоз.

Именно поэтому до сих пор биологическая роль и закономерности функционирования IgE в здоровом организме определены недостаточно ясно и требуют дальнейших исследований.

В настоящее время есть достаточные основания полагать, что биологические свойства и функции IgE-антител не ограничиваются их участием в противопаразитарном иммунитете и в реализации аллергических реакций. Возможно, взаимодействие IgE с дендритными клетками в тканях, контактирующих с внешней средой, представляет собой часть гомеостатического механизма, который в нормальном организме обеспечивает элиминацию чужеродных антигенов без существенных тканевых повреждений и потому остается до сих пор малоизученным. Вероятно, интенсивные изыскания в этой области в скором времени позволят точнее определить роль IgE как в поддержании гомеостаза нормального организма, так и в развитии аллергических заболеваний.

У человека обнаружены два вида рецепторов для IgE — высокоаффинный FcεRI, который экспрессируют тучные клетки, эозинофилы,

базофилы, и низкоаффинный — FcεRII, экспрессируют лейкоциты и лимфоциты.

IgD вместе с IgE составляет группу минорных классов иммуноглобулинов человека. Его содержание в сыворотке крови близко к 60 мкг/мл, а частота IgD-миелом колеблется от 1 до 3% общего числа случаев возникновения этого заболевания. Данные исследования трех миеломных IgD человека показали, что молекулярная масса этого белка составляет около 184 кДа. Масса классспецифичной тяжелой δ-цепи равна 69 кДа. Она построена из 512 аминокислотных остатков, из которых 383 входят в константную область и образуют три домена.

Термин «антиген» используется в двух случаях. Во-первых, так называют молекулы, которые индуцируют иммунный ответ (эти молекулы называют еще иммуногенами). Во-вторых, антигенами называют молекулы, реагирующие с антителами или примированными Т-лимфоцитами. При этом не имеет значения, способны ли эти молекулы сами по себе индуцировать образование таких антител или Т-лимфоцитов. Если мыши ввести ее собственные эритроциты, то никаких антител, естественно, образовываться не будет. Если же ей ввести эритроциты крысы, то образуются антитела не только к крысиным, но и к мышиным эритроцитам, которые начинают связываться с собственными клетками животного. В этом случае эритроциты мыши выступают как антиген, поскольку связывают антитела, хотя сами по себе вызвать их образование не могут. Другой пример — гаптены, низкомолекулярные химические вещества известного строения, такие как динитрофенил или мета-аминобензолсульфонат. Сами по себе гаптены не иммуногенны. В то же время они реагируют с антителами, образование которых было индуцировано гаптеном.

Та часть гипервариабельной области антитела, которая контактирует с антигеном, называется паратопом, а часть антигена, взаимодействующая с паратопом, обозначается как эпитоп. Если антиген — линейный пептид или полисахарид, то во взаимодействии с антителом принимают участие около 5—6 аминокислотных остатков или молекул гексозы соответственно. Если же антиген — глобулярный белок, то с антителом может контактировать до 16 аминокислотных остатков.

Таким образом, под термином «антигены» следует понимать чужеродные вещества или структуры, которые способны вызывать иммунный ответ и характеризуются следующими свойствами:

• антигенностью, т.е. способностью к специфическому взаимодействию с эффекторами иммунного ответа;

• иммуногенностью, т.е. свойством антигенов вызывать иммунный ответ;

• специфичностью антигена, т.е. его способностью избирательно реагировать со специфическими антителами или сенсибилизированными лимфоцитами, появляющимися после иммунизации.

Эпитопы и антигенные детерминанты. Антитела, образующиеся в ответ на введение глобулярного белка, слабо взаимодействуют с денатурированными препаратами этого же белка. Данный факт хорошо согласуется с тем представлением, что большинство антител распознает топографические структуры на поверхности белка (т.е. эпитопы), определяемые конформацией нативной молекулы, поэтому неудивительно, что антитела к нативным белкам обычно гораздо слабее взаимодействуют с пептидами, имеющими ту же первичную структуру. При картировании индивидуальных эпитопов с помощью гомогенных моноклональных антител обнаружено, что эти эпитопы часто включают аминокислотные остатки, которые находятся далеко друг от друга в первичной последовательности, но собраны в один эпитоп в результате упаковки полипептидной цепи в нативном белке. В этих случаях принято говорить о прерывистых или комбинированных эпитопах, в отличие от непрерывных или секвенциальных.

Если схематически изобразить поверхность белкового антигена и отметить на ней центры эпитопов, выявляемых с помощью индивидуальных антител, входящих в данную антисыворотку, то на этой карте почти наверняка можно будет выявить кластеры доминантных эпитопов, т.е. участки антигена, в которых особенно часто происходит взаимодействие с антителами. Именно эти кластеры ближе всего к тому, что принято называть антигенными детерминантами. Важно иметь в виду, что на поверхности антигена может находиться несколько антигенных детерминант различной структуры. Моноклональные антитела, реагирующие с одной детерминантой данного антигена, не будут реагировать с другими, если, конечно, молекула антигена не имеет осей симметрии.

Факторы, определяющие антигенность. Крупные белки, имея большее число потенциальных детерминант, представляют собой лучшие антигены по сравнению с небольшими. Чем больше отличается антиген от собственных молекул организма, индуцирующих толерантность, тем он более эффективен при индукции иммунного ответа. Те участки пептидной цепи, которые далеко выступают за пределы компактной структуры молекулы, обычно представляют собой области большого скопления эпитопов. Наименьший вклад в антигенность вносят

те участки поверхности молекулы, которые расположены вблизи ее впячиваний, где находятся прочно закрепленные молекулы воды. Для формирования обширной области контакта между антигеном и антителом способность антигена к изменению формы играет большую роль, поскольку позволяет ему принять такую конформацию, которая обеспечивает наибольшую степень взаимодействия с антителом.

5.9. АЛЛЕРГИЯ

Аллергия — это повышенная извращенная чувствительность организма к чужеродным белкам, которая проявляется аллергическими реакциями и развитием аллергических заболеваний. На рисунке 5.3 представлены различия между нормальной реакцией организма на чужеродный белок (антиген) и аллергической реакцией.



Рис. 5.3. Различия между нормальной и аллергической реакцией организма на чужеродный белок

При аллергической реакции в результате взаимодействия антигена и антител происходит образование в повышенном количестве биологически активных веществ (БАВ) — гистамина, серотонина и других, которые обладают способностью воздействовать на сосуды, вызывать воспалительную реакцию или даже особые воспалительные заболевания. Аллергическая реакция является по сути извращенной реакцией на антигены. Кроме того до возникновения аллергической реакции должен пройти определенный период сенсибилизации, период повторного попадания антигена в организм.

Аллергенами могут быть практически все высоко- и низкомолекулярные соединения органической и неорганической природы (антигены и гаптены): бытовые, грибковые, животного происхождения, лекарственные, пищевые, микробные, растительные, простые химические вещества и т.д.

Интенсивность аллергической реакции зависит от природы аллергена, дозы, пути поступления аллергена в организм, генотипа индивидуума и состояния иммунной системы.

Результаты изучения заболеваемости и распространенности аллергических болезней в разных странах свидетельствуют, что в настоящее время эти болезни поражают до 20—40% населения.

R. Coombs и P. Gell (1969) выделили четыре типа аллергических реакций, которые на практике далеко не всегда могут проявляться отдельно.

I тип — реагиновый, или гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ);

II тип — антителозависимая цитотоксичность, клинические проявления обусловлены в основном цитотоксичностью антител класса IgG и IgM;

III тип — иммунокомплексный, клинические проявления обусловлены иммунокомплексной цитотоксичностью, иммунные комплексы также в основном образованы IgG и IgM;

IV тип — реакции, обусловленные сенсибилизированными эффекторными лимфоцитами, или клеточные реакции (реакции гиперчувствительности замедленного типа — ГЗТ).

I тип обусловлен IgE. Этот процесс не имеет каких-либо клинических проявлений и заканчивается присоединением указанных реагинов к тучным клеткам и базофилам (иммунологическая фаза ГНТ). За иммунологической фазой следует патохимическая фаза, в результате которой происходит соединение специфических аллергенов с реагинами, приводящее к дегрануляции тучных клеток (находятся в коже, верхних и нижних отделах путей дыхательного тракта, в свободном состоянии в просвете бронхов, в слизистой оболочке ЖКТ, в соединительной ткани по ходу кровеносных сосудов и нервных волокон). Сенсибилизированные иммуноглобулинами тучные клетки выделяют биологически активные медиаторы (гистамин, гепарин, серотонин, ацетилхолин, хемотаксические факторы эозинофилов и нейтрофилов, фактор активации тромбоцитов), которые вызывают острую воспалительную реакцию с симптомами астмы или ринита, поллиноза, крапивницы, отека Квинке.

IgE-активация тучных клеток сопровождается и выделением многофункциональных цитокинов. Важное свойство IgE — высокая аффинность к Fc-участкам рецепторов тучных клеток и базофилов. Массовая фиксация IgE-антител к конкретному антигену на поверхностных рецепторах тучных клеток и базофилов называется сенсибилизацией к данному антигену-аллергену. В результате возрастает чувствительность этих клеток к действию минимальных количеств вновь поступающего аллергена, усиливается и выброс активированными клетками медиаторов и цитокинов.

Атопические реакции вызывают мелкие белковые молекулы (молекулярная масса 5—15 кДа) с хорошей растворимостью, обладают ферментативной активностью протеаз. Запущенный IgE-ответ затем поддерживается и усиливается при участии базофилов, тучных клеток и эозинофилов, которые дублируют функции Th2 при переключение B-лимфоцитов на синтез IgE. Эти процессы межклеточных взаимодействий, ведущие к самоподдержанию аллергии, разыгрываются непосредственно в местах проникновения аллергенов: в MALT бронхов, ЖКТ и др.

После IgE-опосредованной реакции тучных клеток через несколько секунд развивается немедленная аллергическая реакция, а через 8—12 ч — поздняя воспалительная реакция. *Немедленная реакция* обусловлена действием гистамина, пептидогликанов, протеиназ и других ферментов, простагландинов, токсических медиаторов, вызывающих местное расширение сосудов, быстрое повышение их проницаемости, спазм гладкой мускулатуры, гиперпродукцию слизи, раздражение нервных окончаний. *Поздняя воспалительная реакция* вызвана секрецией активированными тучными клетками лейкотриенов, хемокинов и цитокинов. Эти медиаторы отвечают за привлечение в очаг воспаления Th2, эозинофилов, нейтрофилов и других лейкоцитов. Поздняя воспалительная реакция становится причиной длительных аллергических заболеваний (бронхиальная астма), легко превращается в хроническое воспаление в случае персистирования антигена.

Выраженность клинической картины при развитии аллергической реакции атопического типа зависит от количества фиксированных на клетках специфических IgE антител, пути проникновения и дозы аллергена. В случае парентерального введения аллергена или быстрой абсорбции из ЖКТ наступает одномоментная активация всех соединительнотканных тучных клеток, ассоциированных с кровеносными сосудами. Клинически это проявляется «системной анафилаксией»

или «анафилактическим шоком». Наиболее частой причиной системных анафилактических реакций являются:

1) пищевые продукты: морепродукты, рыба, молоко, яйца, орехи, бобовые, цитрусовые клубника, сыр, шоколад и др.;

2) лекарственные препараты: антибиотики (в первую очередь — пенициллины), сульфаниламиды, витамины (особенно группы В), белковые препараты (кровь, плазма), миорелаксанты, наркотические анальгетики, рентгеноконтрастные вещества, плазмозаменители;

3) укусы насекомых (ос, пчел и др.);

4) паразиты (простейшие, гельминты);

5) инфекционные агенты (вирусы, особенно гепатита В и С, бактерии, грибы);

6) физические факторы: холод, тепло, физические нагрузки, инсоляция;

7) химические вещества: хром, никель, бытовая химия;

8) аэроаллергены: бытовые (домашняя пыль), эпидермальные, пыльцевые;

9) психогенные (нервно-психический стресс);

10) генетические дефекты: дефицит ингибитора С1-компонента комплемента.

Следует также отметить, что крапивница и отек Квинке часто возникают на фоне других заболеваний (болезни пищеварительной системы, опухоли, коллагенозы и др.).

У многих людей аллергия к вдыхаемым аллергенам проявляется атопическим ринитом (результат активации мукозных тучных клеток, ассоциированных с эпителием слизистой носа под влиянием аллергена, проникающего через слизистую оболочку). Клиническую картину атопического ринита вызывает преимущественно гистамин. Атопическую бронхиальную астму вызывает активация теми же вдыхаемыми аллергенами субмукозных тучных клеток нижних отделов дыхательных путей. Последующие обострения бронхиальной астмы могут провоцироваться различными другими факторами. Двухфазность аллергических реакций наблюдается и при аллергических поражениях кожи. Местная активация тучных клеток кожи немедленно ведет к местному повышению проницаемости сосудов и выходу жидкости из сосудов, проявляющемуся местным отеком и покраснением кожи. Через 8 ч у некоторых индивидуумов развивается и поддерживается более распространенный отек, характеризующий позднюю фазу ответа. Массивный выброс гистамина активированными аллергеном тучными клетками кожи клинически проявляется крапивницей. После

острой атопической реакции воспалительный процесс в коже нередко принимает хроническое течение, которое клинически проявляется экземой и рассматривается как атопический дерматит.

Наиболее выраженными клиническими примерами реакций преимущественно ГНТ I типа являются поллинозы, аллергический ринит, бронхиальная астма, крапивница и отек Квинке, атопический дерматит.

Поллиноз (*сенная лихорадка*) — заболевание, обусловленное сенсибилизацией к пыльце различных растений, характеризующееся воспалением слизистых оболочек, преимущественно дыхательных путей и глаз. Поллинозами страдает от 3 до 20% населения земного шара. Это заболевание нередко предшествует бронхиальной астме. Поллиноз вызывается пыльцой различных растений, которая представляет собой мужские половые клетки. Установлено, что пыльца деревьев имеет до 3 антигенов, трав — до 5, сорняков — до 10, которые представлены преимущественно белками. Известны три группы растений, пыльца которых вызывает развитие поллиноза: деревья, злаковые травы, сорняки. В центральной полосе России причиной поллиноза наиболее часто бывают сорные злаки (тимофеевка, овсяница, ежа, лисохвост, мятлик, пырей и др.), деревья (орешник, ольха, береза, дуб, вяз и др.), сорняки (полынь, лебеда). На юге России основными аллергенами являются пыльца амброзии, полыни, подсолнечника, кукурузы. Концентрация пыльцы, вызывающая появление симптомов поллиноза, должна быть не менее 10—50 зерен в 1 $м^3$ воздуха. Антигены присутствуют не только в пыльцевых зернах, но и в других частях растений (семена, листья), что является причиной перекрестной пищевой аллергии.

Наиболее частыми факторами, способствующими развитию поллиноза, являются: отягощенная наследственность (у 60—80% больных), высокий уровень в крови общего и специфического IgE, курение, употребление кофе, алкоголя во время беременности, искусственное вскармливание, высокая концентрация пыльцевых аллергенов в окружающей среде, частые респираторно-вирусные инфекции, загрязнение окружающего воздуха поллютантами (окись азота, диоксид серы, озон, твердые частицы).

Бронхиальная астма — хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором принимают участие тучные клетки, эозинофилы и Т-лимфоциты. Распространенность бронхиальной астмы составляет от 1 до 12% в мире. Максимальное ее распространение в странах с теплым и сырым климатом, минимальное — в зоне пустынь и Заполярье, в России около 6%.

Риску развития бронхиальной астмы способствуют наследственность (до 40—45% среди родственников), вирусные респираторные заболевания во время беременности, токсикоз, вредные привычки, неправильное питание матери. Имеют значение в развитии бронхиальной астмы и факторы внешней среды: аллергены, инфекции, нервно-психические стрессы, химические препараты, физические воздействия.

Патогенез бронхиальной астмы сложен и связан с развитием воспаления бронхов, в котором принимают участие иммунные реакции I, III и IV типов, но чаще других ведущую роль играют механизмы гиперчувствительности первого (анафилактического) типа. I тип иммунологического реагирования осуществляется с участием клеток первого и второго порядка. Тучные клетки с IgE-антителами и базофилы первично вовлекаются в аллергическую реакцию при взаимодействии аллергена с IgE-антителами (клетки-мишени первого порядка). Вторично вовлекаются в аллергическую реакцию эозинофилы, нейтрофилы, альвеолярные макрофаги, лимфоциты и тромбоциты, за счет действия на них продуктов активации клеток мишеней первого порядка. Привлеченные в зону аллергической реакции клетки-мишени второго порядка могут быть стимулированы к секреции биологически активных веществ причинно-значимым аллергеном по IgE-опосредованному механизму. Эти медиаторы, воздействуя на ткани легких, вызывают повышение проницаемости сосудов, отек ткани, сокращение гладкой мускулатуры, гиперсекрецию слизи слизистыми железами и бокаловидными клетками, раздражение периферических нервных рецепторов, что и формирует клиническую симптоматику бронхиальной астмы.

Для III типа гиперчувствительности бронхиальной астмы характерно образование иммунных комплексов (артюсоподобная реакция), что сопровождается активацией системы комплемента, агрегацией тромбоцитов, с последующим повреждением тканей, на которых фиксировались иммунные комплексы.

При IV типе гиперчувствительности бронхиальной астмы (клеточно-опосредованная реакция) происходит взаимодействие несущих на своей поверхности специфические рецепторы лимфоцитов (сенсибилизированные Т-лимфоциты) с представленным на макрофаге антигеном, что вызывает высвобождение лимфокинов, опосредующих развитие ГЗТ. Все типы иммунологических реакций имеют три стадии: иммунологическую, патохимическую и патофизиологическую.

Развивающиеся немедленные реакции по IgE-зависимому типу (т.е. возникающие через несколько минут после контакта с аллерге-

ном) могут быть ответом на атопические (неинфекционные) аллергены, но известно, что они могут развиваться и по III типу с участием IgG_4-антител и протекать в более поздние сроки. Реакции, возникающие на инфекционные антигены (бактерий, вирусов, грибов) могут быть немедленными и замедленными (развиваются через 2—3 сут.). Ответ по IgE-типу часто наблюдается на нейссерии, клебсиеллы, гемофильную палочку, стафилококки, хламидии, микоплазмы, различные виды грибов и вирусов.

Крапивница — гетерогенное заболевание, характеризующееся появлением кожной сыпи, первичным элементом которой является волдырь или папула.

Отек Квинке (*гигантская крапивница, ангионевротический отек*) — наследственное или приобретенное заболевание, характеризующееся отеком кожи, подкожной клетчатки, а также слизистых оболочек различных органов и систем (дыхательной, пищеварительной, мочевыделительной и др.).

Практически любой антиген или аллерген пищевой, лекарственной, инфекционной, бытовой природы может явиться этиологической причиной крапивницы или отека Квинке.

По механизму развития различают аллергическую, неаллергическую и идиопатическую формы заболевания.

Аллергическая крапивница и отек Квинке обусловлены I, реже II и III типами реакций гиперчувствительности. В зависимости от типа аллергена, вызывающего развитие заболевания, различают: атопическую, инфекционно-аллергическую, аутоиммунную крапивницу (опухоли желудка, кишечника, коллагенозы, аутоиммунный тиреоидит). Неаллергические крапивница и отек Квинке обусловлены: неспецифическим высвобождением гистамина из тучных клеток, избыточным выделением ацетилхолина, активацией системы комплемента по альтернативному пути, дефицитом ингибитора C1 компонента комплемента и др.

При острой крапивнице отмечается отек эпидермиса и сосочкового слоя дермы, расширение капилляров и артериол. При хроническом течении заболевания наблюдаются периваскулярные инфильтраты, состоящие из Т-лимфоцитов, моноцитов, тучных клеток, эозинофилов и нейтрофилов.

Реакции гиперчувствительности II типа опосредованы IgG- или IgM-антителами к антигенам клеточной поверхности, которые, связываясь с определенными клетками или тканями, вызывают развитие реакций гиперчувствительности II типа. Локализация возникающих

повреждений ограничена клетками или тканями, экспонирующими соответствующие антигены на своей поверхности.

Все эффекторные клетки (К-клетки, тромбоциты, нейтрофилы, эозинофилы и клетки мононуклеарно-фагоцитарного ряда) обладают рецепторами к Fc-фрагменту, посредством которых они взаимодействуют с антителами, фиксированными в тканях на клетках-мишенях. Активация С3 может непосредственно приводить к комплементопосредованному лизису клеток-мишеней или способствовать связыванию фагоцитов с их мишенями — при участии субкомпонентов комплемента С3b, С3bi, С3d, которые одновременно активируют фагоциты.

Наиболее яркие примеры ГНТ II типа — это антиэритроцитарные реакции. Они могут вызвать тяжелые последствия в следующих случаях:

- переливание несовместимой крови, когда реципиент сенсибилизирован к поверхностным антигенам эритроцитов донора. Трансфузионные реакции на эритроциты вызываются антителами к антигенам групп крови;
- гемолитическая болезнь новорожденных, возникающая в результате сенсибилизации беременной женщины эритроцитами плода, когда материнские антитела к групповым антигенам крови плода проходят через плаценту и разрушают его эритроциты;
- аутоиммунные гемолитические анемии, когда больной сенсибилизирован собственными эритроцитами.

Кроме того возможны реакции ГНТ II типа, когда антитела повреждают клетки и ткани вследствие активации комплемента, а также связывания и активации эффекторных клеток, несущих Fcγ-рецепторы. Повреждения тканей могут вызывать антитела к базальным мембранам. Клиническими примерами такой патологии могут быть больные с тиреоидитом Хашимото, с синдромом Гудпасчера, когда повреждаются антителами клетки почечных клубочков.

Реакции гиперчувствительности III типа, или болезнь иммунных комплексов, развиваются в результате повреждения, опосредуемые комплементом и эффекторными клетками. Болезни иммунных комплексов разделяют на три большие группы.

1. Болезни, связанные с персистенцией инфекции, сочетающиеся со слабым гуморальным ответом, приводящие к постоянному образованию иммунных комплексов и к их отложению в тканях. К болезням с такой этиологией относятся проказа, малярия, геморрагическая лихорадка денге, вирусный гепатит, стафилококковый эндокардит.

2. Болезни, связанные с аутоиммунными заболеваниями. Характеризуются хроническим образованием иммунных комплексов вслед-

ствие непрерывной продукции антител к аутоантигенам. В подобных случаях моноцитарно-фагоцитарная система неэффективна и комплексы откладываются в тканях (почки, суставы, артерии, кожа). Клинические примеры: ревматоидный артрит, системная красная волчанка, полиомиозит.

3. Болезни, связанные с вдыханием антигенного материала. Иммунные комплексы могут образовываться на поверхности полостей. Антигенами, приводящими к развитию реакций ГНТ III типа, могут быть термофильные актиномицеты, живущие в заплесневелом сене; сывороточный белок, присутствующий в экскрементах голубей; сывороточный белок, присутствующий в моче крыс вивария; споры гриба *Penicilliumcasei*, вызывающие болезнь сыроделов; белки лисьего меха, вызывающие болезнь меховщиков. Все эти заболевания развиваются лишь при повторном контакте с антигеном. Антитела к таким антигенам относятся преимущественно к классу IgG, а не IgE.

Иммунные комплексы способны инициировать разнообразные воспалительные процессы:

- они взаимодействуют с системой комплемента, способствуя образованию анафилотоксинов C3a и C5a, которые стимулируют выделение вазоактивных аминов и хемотаксических факторов из тучных клеток и базофилов;
- в присутствии иммунных комплексов активируются макрофаги, выделяющие цитокины (TNFα и IL-1), которые играют важную роль в процессах воспаления;
- комплексы непосредственно взаимодействуют с базофилами и тромбоцитами через Fc-рецепторы, что приводит к высвобождению вазоактивных аминов;
- выделяющиеся вазоактивные амины приводят к сокращению эндотелиальных клеток и тем самым увеличивают сосудистую проницаемость. Повышенная проницаемость сосуда создает возможность отложения иммунных комплексов в его стенке. Иммунные комплексы индуцируют агрегацию тромбоцитов и активацию комплемента. Агрегированные тромбоциты формируют микротромбы на базальной мембране эндотелия. К месту образования микротромбов подходят нейтрофилы, но они не способны поглотить комплексы, а в результате фагоцитоза выделяют лизосомные ферменты, вызывающие дальнейшее повреждение сосудистой стенки.

Особым примером ГНТ III типа является *«сывороточная болезнь»* — системная иммунокомплексная реакция. Такую реакцию часто вызывает повторное введение лечебно-профилактических лоша-

диных сывороток против бактериальных токсинов, против яда змей и др. Наиболее частой причиной являются противостолбнячная, противодифтерийная, противоботулиническая, противогангренозная, антилимфоцитарная сыворотка, антирабический γ-глобулин, противостафилококковый иммуноглобулин. Показано, что сывороточная болезнь возникает прямо пропорционально дозе введенного белка. Заболевание развивается через 7—10 дней после введения сыворотки, когда образуются специфические антитела против чужеродных антигенов сыворотки. Образующиеся в зоне преобладания антигена нерастворимые иммунные комплексы (ИК) связываются с FcγRIII на поверхности тучных клеток с последующей их дегрануляцией и выбросом гистамина. ИК, образующиеся повсюду, связываются с Fc-рецепторами лейкоцитов или с рецепторами для комплемента и вызывают повреждение тканей. Общим симптомом сывороточной болезни является лихорадка, а локальные проявления определяются преимущественной локализацией отложений ИК: васкулиты (при отложении ИК в сосудистой стенке), артриты (при отложении ИК в суставах), нефрит (при отложении ИК в гломерулах почек). После повторного введения лошадиной сыворотки сывороточная болезнь развивается через 1—2 дня в связи с более быстрым накоплением специфических антител.

Хроническое персистирование вирусного антигена приводит к развитию реакций иммунокомплексного типа и в случае хронического вирусного гепатита, так как иммунный ответ не приводит к быстрому очищению организма от инфекционных антигенов. Отложение депозитов ИК в мелких сосудах разных тканей ведет к повреждению кожи, почек, нервов.

Морфологической картиной сывороточной болезни является гиперергический васкулит с поражением артерий, капилляров и венул. В поврежденных сосудах наблюдается отложение иммунных комплексов и комплемента. Среди клеток преобладают нейтрофилы и макрофаги, разрушение которых сопровождается высвобождением ядер. В сердце возможно развитие эндокардита, миокардита и перикардита, коронариита, в почках — гломерулонефрита. В суставах наблюдается отложение фибрина и клеточных инфильтратов в синовиальной оболочке. Возможна гиперплазия лимфатических узлов и селезенки.

В настоящее время гораздо чаще развиваются симптомы, напоминающие сывороточную болезнь, которые возникают при введении небелковых средств (лекарственные препараты — пенициллин, цефалоспорины, тетрациклины, фторхинолоны, сульфаниламиды, пре-

параты золота, йода и др.; яды насекомых; вакцины). В этом случае используется термин сывороточноподобное заболевание или сывороточная реакция.

Гиперчувствительность IV типа (*замедленная ГЗТ*) — это реакции, проявляющиеся не ранее чем через 12 ч и обусловленные клеточными, а не гуморальными иммунными механизмами. Это реакции, связанные с наличием сенсибилизированных лимфоцитов. Обязательным условием развития ГЗТ IV типа является предшествовавшая сенсибилизация специфическим антигеном-аллергеном, чаще всего инфекционной природы. Преобладание в микроокружении очага воспаления Th0 в момент распознавания антигена, провоспалительных цитокинов IL-12 и IFNγ создает условия для их дифференцировки в направлении Th1. Основными участниками иммунного воспаления являются Th1, моноциты, макрофаги эндотелиальные клетки. Среди них продуктами Th1 являются IFNγ, TNFβ, IL-2, IL-8, GM-CSF; активированными макрофагами продуцируются IL-1, TNFα, IL-6, IL-8. В реакциях ГЗТ различают острую фазу и стадию хронического воспаления. Острая фаза по своим проявлениям сходна с ранним воспалительным ответом, но отличается тем, что макрофаги исходно активируются не микробными продуктами, а IFNγ и другими цитокинами (MIF, GM-CSF). Продукты активированных Т-лимфоцитов IL-3, GM-CSF стимулируют и продукцию моноцитов, и их рекрутирование из кровяного русла (TNFα, TNFβ, MCP). В результате на месте очага иммунного воспаления формируется мононуклеарный инфильтрат.

При повторном поступлении антигена стимулированные Т-лимфоциты секретируют множество цитокинов, функционирующих в качестве медиаторов ГЗТ. Цитокины, продуцируемые Th1, вызывают приток и активацию макрофагов. Цитокины, продуцируемые Th2, вызывают приток эозинофилов.

В стадии хронического воспаления провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6, TNFα) стимулируют пролиферацию фибробластов и синтез коллагена. При хроническом течении воспаления с персистенцией сдвигов сывороточных белков, связанных с воспалительным ответом, повышенный уровень сывороточного амилоида А может вести к его отложению в интерстициальных тканях в форме фибрилл. Развивается амилоидоз, нарушающий жизненно важные функции.

В случае персистенции микробных антигенов (при лепре, туберкулезе) развивается хроническая местная повреждающая реакция ГЗТ. В очаге воспаления накапливаются провоспалительные цитокины, большое количество увеличенных в размерах макрофагов, которые

сливаются, образуют большие многоядерные клетки. Совокупность активированных макрофагов, NK, CTL, с пролиферирующими лимфоцитами и фибробластами, с зонами фиброза и некроза формируют гранулемы. Гранулемы возникают в местах персистенции не удаленных возбудителей и иммунных комплексов. Следствием гранулемы может быть деструкция ткани до некроза с последующим фиброзом. Подобные проявления ГЗТ развиваются при паразитарных инвазиях и микозах.

При вирусных инфекциях (вирусы семейства *Herpesviridae*) ведущую роль играют CTL, которые повреждают инфицированные вирусами клетки. При вирусном гепатите С (HCV) в печени больных преобладают Th1, продуцирующие IFNγ, а при вирусном гепатите В (HBV) большинство Т-лимфоцитов в печени относятся к Th0, которые дифференцируются Th2, контролирующие гуморальный ответ.

А. Ройт (2000) выделил три варианта развития реакций гиперчувствительности IV типа: контактная (развивается в течение 48—72 ч), туберкулиновая (48—72 ч), гранулематозная (21—28 сут.).

Контактная гиперчувствительность характеризуется экзематозной реакцией в месте воздействия антигена (никель, хромат, токсичные вещества). Ключевую роль при контактной гиперчувствительности играют клетки Лангерганса и кератиноциты. Основными антигенпрезентирующими клетками в этом случае служат дендритные клетки Лангерганса, локализованные в надбазальном слое эпидермиса. Реакции контактной гиперчувствительности протекают в две стадии: *сенсибилизации* и *проявления*. В процессе сенсибилизации образуются Т-клетки иммунологической памяти. У человека период сенсибилизации длится 10—14 сут. *Сенсибилизация* зависит прежде всего от дозы гаптена на единицу площади кожи, а не от общей дозы или общей площади, на которую воздействует гаптен. *Фаза проявления реакции* протекает с участием лимфоцитов CD4+ и моноцитов. Наиболее раннее (через 4—8 ч) гистологическое изменение состоит в появлении мононуклеарных клеток вокруг производных кожи и кровеносных сосудов. Макрофаги проникают в дерму и эпидермис через 48 ч. Количество инфильтрирующих эти слои кожи клеток достигает максимума через 48—72 ч, причем большинство лимфоцитов относится к популяции CD4+ и лишь немногие к CD8+. Менее 1% инфильтрирующих кожу клеток принадлежит к одному клону (а именно к клону антигенспецифических клеток, иммунологической памяти — Th1-клеток CD4+). Центральную роль в сложных взаимодействиях между клетками Лангерганса, Т-клетками CD4+, кератиноцитами, макрофагами и эндоте-

лиальными клетками при контактной реакции гиперчувствительности играют цитокины и простагландины (IL-1, IL-6, IFNγ, GM-CSF). Это приводит к активации и пролиферации Т-клеток CD4+, повышению экспрессии молекул ICAM-1 и MHC класса II на поверхности кератиноцитов и эндотелиальных клеток, а также привлечению в кожу Т-клеток и макрофагов.

Гиперчувствительность туберкулинового типа. Эта форма гиперчувствительности впервые описана Кохом. Кожная туберкулиновая проба позволяет выявить реакцию на растворимый антиген у ранее инфицированных лиц. После введения антигена сенсибилизированным лицам антигенспецифические Т-клетки активируются и начинают секретировать цитокины, опосредующие реакцию гиперчувствительности. Выделяемые Т-клетками TNFα и TNFβ действуют на эндотелий кожных сосудов, индуцируя последовательную экспрессию молекул адгезии — Е-селектина, ICAM-1 и VCAM-1. Эти молекулы связываются рецепторами на поверхности лейкоцитов и привлекают их к месту реакции. На протяжении 4 ч здесь скапливаются нейтрофилы, но через 12 ч их заменяют моноциты и Т-клетки. Инфильтрат, распространяясь, разрушает пучки коллагена дермы, увеличивается до максимальных размеров через 48 ч. Количество Т-клеток CD4+ в инфильтрате примерно вдвое превышает число клеток CD8+. Примерно 80—90% всех клеток инфильтрата приходится на долю моноцитов. Лимфоциты и макрофаги, присутствующие в инфильтрате, экспрессируют молекулы MHC класса II, что повышает способность активированных макрофагов презентовать антиген.

Гранулематозная гиперчувствительность. Именно этими реакциями обусловлены многие проявления заболеваний, связанных с Т-клеточными иммунными реакциями. Обычно гранулематозные реакции развиваются при внутриклеточной персистенции в макрофагах микроорганизмов или других частиц, которые клетка не способна разрушить. Гистологически гранулематозная реакция резко отличается от реакции туберкулинового типа. Однако обе они часто развиваются при сенсибилизации одними и теми же микробными антигенами (*M. tuberculosis, M. leprae*). В центре иммунологической гранулемы, как правило, расположены эпителиоидные клетки и макрофаги, иногда вместе с гигантскими клетками (образуются при слиянии эпителиоидных клеток), которые окружены зоной лимфоцитов.

При гранулематозных реакциях активированные макрофаги являются основным источником TNFα и IL-12, вследствие их активации бактериальными продуктами. Активация Т-клеток этими цитокина-

ми приводит к выделению IFNγ, IL-3, GM-CSF, которые активируют макрофаги, помогая уничтожению внутриклеточных инфектов. Неспособность ликвидировать антигенный стимул обусловливает постоянное выделение цитокинов и дифференцировку макрофагов в эпителиоидные клетки, которые секретируют большое количество TNFα. Некоторые эпителиоидные клетки сливаются, образуя многоядерные гигантские клетки.

Методические подходы к диагностике аллергических заболеваний. Основной принцип выявления истинных аллергических реакций — обнаружение специфических антител или факта их присутствия.

Способность реагинов фиксироваться в коже и слизистых позволило с диагностической целью использовать кожные тесты.

Накожные (аппликационные, patch-tests) пробы. Раствором антигена смачивают кусочек марли или ваты и накладывают его на неповрежденные участки кожи.

Кожные пробы. Исследование, как правило, проводят на коже предплечья, которую предварительно обрабатывают спиртом. Далее на чистую кожу наносят капли аллергенов. В случае скарификационных тестов через капли аллергенов одноразовым скарификатором наносятся небольшие царапины. В случае так называемых прик-тестов используют одноразовые иглы, ими наносят легкие уколы (на один миллиметр в глубину). Более 15 проб с аллергенами за один раз не ставят.

Внутрикожные пробы. Антиген вводится внутрикожно с помощью тонкой иглы.

Результаты проб в зависимости от применяемого антигена оценивают через 20 мин, 5—6 ч и 1—2 сут. Интенсивность реакции определяют по диаметру образовавшегося бугорка (папулы) на коже. При положительной реакции диаметр папулы обычно превышает 5 мм.

Способность IgE фиксироваться на клетках-мишенях с последующими, видимыми под микроскопом морфологическими выявлениями подразумевает использование клеточных прямых и непрямых тестов — тест дегрануляции тучных клеток, базофилов.

Аллергические антитела способны к преципитации и соответственно возможно использовать тесты преципитации в сыворотке или агаре.

Высвобождение под действием комплекса антиген — антитело медиаторов аллергии повлекло за собой внедрение многочисленных тестов определения концентрации гистамина, серотонина, ацетилхолина, простагландинов, интерлейкинов и других вазоактивных веществ.

Провокационные тесты. Кожное тестирование и исследование крови на IgE указывают на те аллергены, которые потенциально

могут вызвать аллергические реакции у данного человека. Если после кожных проб и исследования крови диагноз остается неясным, назначают провокационные тесты. Такие исследования проводятся только в аллергологических стационарах. При проведении провокационных тестов в нос, под язык или непосредственно в бронхи вводится небольшое количество аллергена, а через некоторое время оценивается реакция. Такое исследование может вызывать у больного сильную аллергическую реакцию, поэтому должно проводиться в присутствии врача, который может оказать немедленную медицинскую помощь.

Элиминационные тесты. Суть этого вида исследования заключается в том, что из диеты больного последовательно исключаются те или иные продукты, подозреваемые в качестве причины аллергии, а также определенные лекарства. Если после этого исчезают признаки аллергии, считают, что данный пищевой продукт (лекарство) является причиной аллергических расстройств.

Основной недостаток лабораторных методов в том, что они сигнализируют о том, что организм был в контакте с данным антигеном, но это не значит, что этот антиген является причиной болезни. Наиболее часто при аллергических заболеваниях применяют методы количественного определения иммуноглобулинов различных классов, особенно IgE, количество которого закономерно увеличивается при бронхиальной астме. Реакция Кумбса применяется для распознавания гемолитической анемии.

Информативность аллергологических исследований. Накожные (аппликационные, patch-tests) пробы помогают в распознавании аллергических заболеваний кожи (дерматитов, экземы); скарификационные кожные пробы — аллергических заболеваний, вызываемых пыльцой растений (бронхиальной астмы, отека Квинке); при туберкулезе ставится внутрикожная проба (реакция Манту), а также их ставят для определения чувствительности к микробным, грибковым антигенам.

При аллергологическом обследовании условно можно выделить тесты 1-го, 2-го и 3-го уровней.

Тесты первого уровня позволяют выявить выраженные нарушения в аллергологическом статусе, являются информативными, специфическими и с достаточной степенью вероятности позволяют диагностировать атопические заболевания, даже протекающие латентно. Тесты первого уровня обязаны выполнять в любом аллергологическом кабинете в поликлинических условиях, они включают:

- аллергологический анамнез;
- фармакологический анамнез;
- пищевой анамнез;
- тесты с атопическими аллергенами;
- определение уровней общего IgE в сыворотке крови;
- лабораторные методы — клинический анализ крови (выявление эозинофилии), цитологическое исследование секретов (мазки из носа, конъюнктивы и т.д.) на эозинофилию.

К тестам 2-го уровня относятся:

- внутрикожные тесты с аллергенами;
- провокационные тесты (ингаляционный, оральные, назальные, конъюнктивальные и др.);
- уровень специфических IgE (к лекарственным препаратам, клещам домашней пыли, эпителию и перхоти животных, перьям птиц, белкам сыворотки и выделениям животных, продуктам питания, травам, ядам насекомых, гельминтам, инфекционным антигенам, пыльце деревьев, профессиональным аллергенам, древесной пыли, пыльце трав и др.);
- тесты преципитации, позволяющие выявить наличие преципитирующих антител;
- оценка иммунного статуса;
- клеточные тесты.

Тесты второго уровня выполняются как в амбулатории, так и в стационаре.

Выполнение тестов третьего уровня возможно только в крупных аллергологических центрах. К тестам третьего уровня относятся:

- определение специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови (их субклассов);
- специфическое высвобождение гистамина из базофилов;
- изучение состояния системы интерлейкинов;
- определение уровней простагландинов;
- изучение чувствительности рецепторного аппарата к специфическим антигенам и неспецифическим медиаторам;
- определение уровней медиаторов аллергии, ферментов и других биологически активных веществ, участвующих в реализации аллергических реакций.

Несомненно, что тесты второго и третьего уровней будут пополняться новыми методами, разработанными по мере совершенствования наших знаний и позволяющих выявить нарушения иммунного ответа на клеточном и цитокиновом уровнях.

- аллергологический анамнез;
- фармакологический анамнез;
- пищевой анамнез;
- тесты с атопическими аллергенами;
- определение уровней общего IgE в сыворотке крови;
- лабораторные методы — клинический анализ крови (выявление эозинофилии), цитологическое исследование секретов (мазки из носа, конъюнктивы и т.д.) на эозинофилию.

К тестам 2-го уровня относятся:

- внутрикожные тесты с аллергенами;
- провокационные тесты (ингаляционный, оральные, назальные, конъюнктивальные и др.);
- уровень специфических IgE (к лекарственным препаратам, клещам домашней пыли, эпителию и перхоти животных, перьям птиц, белкам сыворотки и выделениям животных, продуктам питания, травам, ядам насекомых, гельминтам, инфекционным антигенам, пыльце деревьев, профессиональным аллергенам, древесной пыли, пыльце трав и др.);
- тесты преципитации, позволяющие выявить наличие преципитирующих антител;
- оценка иммунного статуса;
- клеточные тесты.

Тесты второго уровня выполняются как в амбулатории, так и в стационаре.

Выполнение тестов третьего уровня возможно только в крупных аллергологических центрах. К тестам третьего уровня относятся:

- определение специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови (их субклассов);
- специфическое высвобождение гистамина из базофилов;
- изучение состояния системы интерлейкинов;
- определение уровней простагландинов;
- изучение чувствительности рецепторного аппарата к специфическим антигенам и неспецифическим медиаторам;
- определение уровней медиаторов аллергии, ферментов и других биологически активных веществ, участвующих в реализации аллергических реакций.

Несомненно, что тесты второго и третьего уровней будут пополняться новыми методами, разработанными по мере совершенствования наших знаний и позволяющих выявить нарушения иммунного ответа на клеточном и цитокиновом уровнях.

Глава 6
ОСНОВЫ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ И ИММУНОТЕРАПИИ

Студент должен знать: систему иммунопрофилактики в Российской Федерации, принципы и методы иммунотерапии.
Ключевые слова и термины: вакцины, сыворотки, анатоксины, иммуномодуляторы.

6.1. ОСНОВЫ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ

При первичном введении (вакцинации) иммунная реакция развивается на живые вакцины по истечении как бы инкубационного периода и проявляется ослабленным симптомокомплексом естественной инфекции. Иммунный ответ в этом случае характеризуется появлением в крови антител класса IgM с последующим переключением на синтез IgG. Очевидно, что образуются и клетки иммунной памяти.

При повторном введении антигена (ревакцинация) характер иммунного реагирования также будет зависеть от вида вакцины (живая или инактивированная). При введении инактивированной вакцины возникает бустерный эффект за счет включения клеток памяти. При этом практически сразу начинается продукция специфических антител, в основном IgG, и их уровень бывает более значительным, чем при первичном введении.

Третья доза антигена еще более усиливает процесс антителообразования, но эта закономерность не бесконечна, поскольку сила иммунного ответа генетически детерминирована. Последующие дополнительные дозы антигена могут и не привести к усилению антителопродукции, а наоборот — могут вызвать состояние иммунодепрессии.

Получение напряженного и длительного иммунитета обеспечивается путем повторного введения вакцинных препаратов. Для поддержания защитного уровня специфического иммунитета при проведении активной иммунизации большое значение имеет схема введения вакцинного препарата с определенными интервалами.

Иммунный ответ на вакцинацию строго специфичен и индивидуален. Активная иммунизация не обеспечивает развития у всех прививаемых одинаковой невосприимчивости. Существуют группы лиц, которые в силу тех или иных обстоятельств (индивидуальные особенности иммунного ответа, длительный прием цитостатиков, крайняя степень нарушения питания, первичный иммунодефицит и др.) не способны к полноценной выработке антител.

Наиболее эффективный искусственный иммунитет можно получить к тем инфекциям, после которых создается достаточный естественный иммунитет, и, наоборот, в тех случаях, когда после болезней формируется слабый иммунитет или таковой вовсе отсутствует, активная иммунизация часто оказывается малоэффективной.

Активная иммунизация приводит к выработке специфических антител лишь после определенного периода времени, поэтому ее применение целесообразно главным образом в профилактических целях, тогда как использование с лечебными целями имеет ограниченное значение.

Характеристика вакцинных препаратов. К вакцинам относятся препараты, получаемые из бактерий, вирусов, грибов, простейших, а также из продуктов их жизнедеятельности. Все вакцины можно разделить на две основные группы: инактивированные и живые.

Инактивированные: корпускулярные (цельновирионные) вакцины представляют собой бактерии и вирусы, инактивированные путем химического (формалин, спирт, фенол) или физического (тепло, ультрафиолетовое облучение) воздействия или комбинацией обоих факторов.

Для приготовления корпускулярных вакцин используют, как правило, вирулентные штаммы микроорганизмов, поскольку они обладают наиболее полным набором антигенов. Примерами корпускулярных вакцин являются коклюшная (компонент АКДС-вакцины), антирабическая, лептоспирозная, гриппозные цельновирионные инактивированные вакцины, вакцины клещевого и японского энцефалита и ряд других. Помимо цельновирионных в практике используют также расщепленные или дезинтегрированные препараты (сплит-вакцины), в которых структурные компоненты вириона разъединены с помощью детергентов.

Химические вакцины представляют собой антигенные компоненты, извлеченные из микробной клетки, которые определяют иммуногенный потенциал клетки. Для их приготовления используют различные физико-химические методики. К вакцинам такого рода относятся вакцины менингококковых групп А и С полисахаридные, вакцина против гемофильной инфекции типа b полисахаридная, вакцина пневмококков полисахаридная, вакцина брюшнотифозная — Vi-антиген брюшнотифозных бактерий. Так как бактериальные полисахариды являются тимуснезависимыми антигенами, то для формирования Т-клеточной иммунной памяти используют их конъюгаты с белковым носителем (дифтерийным или столбнячным анатоксином в количестве, не стимулирующем выработку соответствующих антител, или с белком самого микроба, наружной оболочки пневмококка).

К этой же категории могут быть отнесены субъединичные вирусные вакцины, содержащие отдельные структурные компоненты вируса, например, субъединичная гриппозная вакцина, состоящая из гемагглютинина и нейраминидазы. Важная отличительная особенность химических вакцин — их низкая реактогенность.

Рекомбинантные вакцины. В качестве примера можно назвать вакцину против гепатита В, для производства которой применяют рекомбинантную технологию. Участок гена, кодирующий синтез поверхностного антигена вируса гепатита В (HbsAg), встраивают в ДНК дрожжевых клеток, которые, размножаясь, осуществляют продукцию данного антигена. Белок HbsAg выделяют из дрожжевых клеток путем разрушения последних и подвергают очистке с помощью химических и физических методов. В результате полученный препарат HbsAg полностью освобождается от дрожжевой ДНК и содержит лишь следовое количество белка дрожжей.

Для создания полноценного иммунитета обычно необходимо двукратное или трехкратное введение инактивированных вакцин. Развивающийся после этого иммунитет относительно кратковременен и для поддержания его на высоком уровне требуются ревакцинации.

К этой же подгруппе могут быть отнесены и анатоксины, которые представляют собой бактериальные экзотоксины, обезвреженные длительным воздействием формалина при повышенной температуре. Подобная технология получения анатоксинов, с сохранением антигенных и иммуногенных свойств, делает возможной реверсию их токсичности. В процессе производства анатоксины подвергаются очистке от балластных веществ (питательной среды, продуктов метаболизма и распада микробной клетки).

Анатоксины выпускают в виде монопрепаратов (дифтерийный, столбнячный, стафилококковый и др.) и ассоциированных препаратов (дифтерийно-столбнячный). Для достижения напряженного антитоксического иммунитета требуются, как правило, двукратное введение препаратов анатоксинов и последующая ревакцинация. При этом их профилактическая эффективность достигает 95—100% и сохраняется в течение нескольких лет. Важной особенностью анатоксинов является также и то, что они обеспечивают в организме привитого сохранение стойкой иммунной памяти. Другой не менее важной особенностью анатоксинов является их относительно низкая реактогенность, что позволяет свести к минимуму перечень противопоказаний к их применению.

Живые вакцины изготовляются на основе аттенуированных штаммов со стойко закрепленной авирулентностью. Будучи лишенными вызывать инфекционный процесс, они сохранили способность к размножению в организме вакцинированного. Развивающаяся вследствие этого вакцинальная инфекция приводит в большинстве случаев к формированию стойкого иммунитета. Живые вакцины, за исключением полиомиелитной, выпускаются в лиофилизированном виде, что обеспечивает их стабильность в течение относительно длительного срока.

Аутовакцина. Одним из существенных недостатков вакцин, приготовленных из музейных штаммов бактерий, являются трудности в подборе культур бактерий с достаточно универсальным антигенным набором. Только в случае использования для приготовления вакцины возбудителя, выделенного от больного (аутовакцины), с последующей аутовакцинотерапией его, с учетом индивидуальной реактивности больного, наступает полноценный специфический иммунитет.

Аутовакцинотерапия используется, как правило, при лечении хронических гнойно-септических инфекций. Методика приготовления убитых аутовакцин может быть разнообразной (гретая, формалинизированная, с использованием бактерицидных свойств рыбьего жира). Курс аутовакцинотерапии проводится дробно, в постепенно возрастающих дозах препарата, что проводится с целью десенсибилизации (снятия повышенной чувствительности организма к антигену).

Аутовакцина может вводиться как парентеральным, так и пероральным способами (например, при дисбактериозе кишечника используют пероральное введение аутовакцины).

Перспективно применение аутовакцинотерапии при злокачественных новообразованиях. Препятствием на пути широкого использования аутовакцин служит сложность выделения микроба-возбудите-

ля, длительность процесса их изготовления, а также невозможность их применения с профилактической целью для иммунизации большого контингента больных в предоперационном периоде.

Вакцина из «госпитальных» штаммов возбудителей гнойно-септических инфекций. Преимущества вакцины, приготовленной из наиболее часто и устойчиво встречающихся в данном лечебном учреждении (закрытом коллективе), так называемых госпитальных, «ведущих» штаммов возбудителей гнойно-септических инфекций, перечислены ниже.

В такой вакцине более полно (по сравнению со стандартными вакцинами из музейных культур) представлен антигенный набор, соответствующий антигенам «госпитальных», циркулирующих в данном лечебном учреждении возбудителей.

Наличие вакцины из «госпитальных» штаммов дает возможность одновременно профилактически иммунизировать большие группы больных, обеспечивая при этом надежную защиту против гнойных осложнений, вызванных «госпитальными» штаммами;

Применение вакцины из «госпитальных», «ведущих» штаммов позволяет добиться защиты против внутригоспитальных инфекций, вызванных «госпитальными» штаммами, резистентных к антимикробным препаратам.

Вакцина из «госпитальных» штаммов позволяет добиться терапевтического эффекта при применении ее в случае возникновения в послеоперационном периоде осложнений в виде гнойно-септических инфекций, не дожидаясь выделения аутокультуры и приготовления аутовакцины.

Требования, предъявляемые к приготовлению аутовакцин и вакцин из «госпитальных» штаммов такие же, как и для стандартных вакцин из музейных культур бактерий.

Состав вакцин. В состав вакцин, помимо аттенуированных микроорганизмов или антигенов, обеспечивающих развитие специфической невосприимчивости, входят и другие компоненты, которые можно разделить на две группы.

В качестве стабилизаторов используются только вещества, внесенные в фармакопейные статьи: сахароза, лактоза, альбумин человека, натрия глутамат. Наличие их в препарате не оказывает какого-либо влияния на реактогенность.

Назначение консервантов — химических веществ, оказывающих бактерицидное действие, — состоит в обеспечении стерильности инактивированных вакцин, выпущенных стерильными. Наиболее распро-

страненным консервантом является мертиолат натрия (тиомерсал), представляющий собой органическую соль ртути. Содержание препарата в АКДС-вакцине, анатоксинах, вакцине против гепатита В и других сорбированных препаратах не более 50 мкг в дозе.

В качестве адъюванта используют, как правило, алюминия гидроксид.

Вторая группа включает вещества, присутствие которых в вакцинах обусловлено технологией их производства (гетерологичные белки субстрата культивирования, например, овальбумин в гриппозных вакцинах, антибиотики, вносимые в культуру клеток при производстве вирусных вакцин, компоненты питательной среды, вещества, используемые для вакцинации). По требованиям ВОЗ содержание гетерологичного белка в парентерально вводимых вакцинах не должно превышать 0,5 мкг в прививочной дозе, а содержание антибиотиков (канамицина или мономицина) в коревой, паротитной и краснушной вакцинах должно быть не выше 10 ЕД в прививочной дозе. При производстве вирусных вакцин запрещено использовать в качестве тканевых культур клетки злокачественных опухолей, а также антибиотики, обладающие выраженными сенсибилизирующими или токсическими свойствами (пенициллин и его производные, стрептомицин, тетрациклины). При производстве бактериальных вакцин антибиотики не используются вовсе.

Перечень вакцин, выпускаемых в Российской Федерации, представлен в табл. 6.1.

Таблица 6.1

Вакцины, выпускаемые в Российской Федерации

Виды вакцин	Инфекции, для профилактики которых применяются вакцины
Живые вакцины	Бруцеллез, грипп, корь, Ку-лихорадка, желтая лихорадка, эпидемический паротит, полиомиелит, сибирская язва, туберкулез, сыпной тиф, туляремия, чума
Убитые (инактивированные) и субъединичные вакцины	Бешенство, брюшной тиф, грипп, клещевой энцефалит, коклюш, холера, лептоспироз, гепатит А, сыпной тиф, герпес
Химические вакцины	Менингококковая инфекция, холера, брюшной тиф
Анатоксины	Дифтерия, столбняк, гангрена, ботулизм, холера, стафилококковые и синегнойная инфекции
Рекомбинантные вакцины	Гепатит В
Вакцины с искусственным адъювантом	Гриппозная вакцина с полиоксидонием

Вакцинация населения Российской Федерации производится согласно национальному календарю профилактических прививок, утвержденному приказом Министра здравоохранения от 21 марта 2014 г. № 125н (с изменениями на 16 июня 2016 г.) (табл. 6.2).

Таблица 6.2

Национальный календарь профилактических прививок

Категория и возраст граждан, подлежащих обязательной вакцинации	Наименование профилактической прививки
Новорожденные в первые 24 часа жизни	Первая вакцинация против вирусного гепатита В
Новорожденные на 3—7 день жизни	Вакцинация против туберкулеза
Дети 1 месяц	Вторая вакцинация против вирусного гепатита В
Дети 2 месяца	Третья вакцинация против вирусного гепатита В (группы риска)
	Первая вакцинация против пневмококковой инфекции
Дети 3 месяца	Первая вакцинация против дифтерии, коклюша, столбняка
	Первая вакцинация против полиомиелита
	Первая вакцинация против гемофильной палочки (группы риска)
Дети 4,5 месяца	Вторая вакцинация против дифтерии, коклюша, столбняка
	Вторая вакцинация против полиомиелита
	Вторая вакцинация против гемофильной инфекции (группы риска)
	Вторая вакцинация против пневмококковой инфекции
Дети 6 месяцев	Третья вакцинация против дифтерии, коклюша, столбняка
	Третья вакцинация против вирусного гепатита В
	Третья вакцинация против полиомиелита
	Третья вакцинация против гемофильной инфекции (группа риска)
Дети 12 месяцев	Вакцинация против кори, краснухи, эпидемического паротита
	Четвертая вакцинация против вирусного гепатита В (группы риска)
Дети 15 месяцев	Ревакцинация против пневмококковой инфекции

Окончание

Категория и возраст граждан, подлежащих обязательной вакцинации	Наименование профилактической прививки
Дети 18 месяцев	Первая ревакцинация против дифтерии, коклюша, столбняка
	Первая ревакцинация против полиомиелита
	Ревакцинация против гемофильной инфекции (группы риска)
Дети 20 месяцев	Вторая ревакцинация против полиомиелита
Дети 6 лет	Ревакцинация против кори, краснухи, эпидемического паротита
Дети 6—7 лет	Вторая ревакцинация против дифтерии, столбняка
	Ревакцинация против туберкулеза
Дети 14 лет	Третья ревакцинация против дифтерии, столбняка
	Третья ревакцинация против полиомиелита
Взрослые 18 лет	Ревакцинация против дифтерии, столбняка — каждые 10 лет от момента последней ревакцинации
Дети от 1 года до 18 лет, взрослые от 18 до 55 лет, не привитые ранее	Вакцинация против вирусного гепатита В
Дети от 1 года до 18 лет, женщины от 18 до 25 лет (включительно), не болевшие, не привитые, привитые однократно против краснухи, не имеющие сведений о прививках против краснухи	Вакцинация против краснухи
Дети от 1 года до 18 лет включительно и взрослые в возрасте до 35 лет (включительно), не болевшие, не привитые, привитые однократно, не имеющие сведений о прививках против кори	Вакцинация против кори
Дети с 6 месяцев, студенты и школьники; работники медицинских и образовательных организаций, транспорта, коммунальной сферы; беременные; взрослые старше 60 лет; призывники на военную службу; прочие	Вакцинация против гриппа

Распоряжением Правительства Российской Федерации от 17 июня 2015 г. № 1125-р акционерное общество «Национальная иммунобио-

логическая компания» определено единственным поставщиком отечественных иммунобиологических лекарственных препаратов, закупка которых осуществляется Минздравом России в целях проведения профилактических прививок, включенных в национальный календарь профилактических прививок.

Разработка новых вакцин осуществляется по следующим основным направлениям:

- создание ассоциированных вакцин на основе существующих монопрепаратов;
- расширение номенклатуры вакцин;
- использование новых технологий.

Ассоциированные вакцины. Разработка ассоциированных вакцин проводится на основе существующих монопрепаратов. К ассоциированным препаратам, выпускаемым в России, относятся вакцины АКДС, менингококковая А + С, а также АДС-анатоксины. В настоящее время за рубежом проходят клинические испытания такие ассоциированные препараты, как 6-валентная вакцина, содержащая дифтерийный и столбнячный анатоксины, бесклеточную коклюшную вакцину, HbsAg, конъюгированный полисахарид *H. Influenzae b*, инактивированную полиомиелитную вакцину; четырехвалентная живая вирусная вакцина против кори, краснухи, эпидемического паротита и ветряной оспы; комбинированная вакцина против гепатита А и В и ряд других препаратов.

Расширение номенклатуры вакцин против инфекций ведется как в отношении инфекций, от которых ранее не имелось средств специфической профилактики, против широко распространенных инфекционных болезней с целью последующего включения в календарь прививок, так и в отношении препаратов против эндемичных инфекций.

Вакцины, получаемые с помощью методов генной инженерии. Получение подобных препаратов заключается во встраивании гена, кодирующего определенное биологическое соединение в вектор с помощью высокоспецифических ферментов — рестрикционных эндонуклеаз, разрезающих ДНК вектора в строго определенных местах, и лигаз, вшивающих генную вставку в вектор. Следующий этап заключается в отборе клонов, несущих данный ген, и их размножении. Непременное условие для такого рода препаратов — сохранение способности вектора к размножению в организме человека.

Вакцины на основе трансгенных растений. С помощью методов генной инженерии представляется возможным «внедрить» чужеродные гены почти во все сельскохозяйственные культуры, получив при этом

стабильные генетические трансформации. Данные технологии особенно перспективны по получению оральных вакцин. Подобного рода «растительные вакцины» весьма перспективны:

- в ДНК растений может быть встроено до 150 чужеродных генов;
- будучи пищевыми продуктами, применяются орально;
- их использование приводит как к развитию системного иммунитета, так и местного иммунитета кишечника (иммунитет слизистых оболочек).

Антиидиотипические вакцины получаются в результате изготовления ряда моноклональных антител к идиотипам молекул иммуноглобулина, обладающего протективной активностью.

Вакцины в биодеградуируемых микросферах. Инкапсуляция антигенов в микросферы представляет собой заключение их в защитные полимеры с образованием специфических частиц. Наиболее часто используемым полимером для этих целей является poly-DL-lactide-co-glycolide (PLGA), который в организме подвергается гидролизу с образованием молочной и гликолевой кислот, являющихся нормальными продуктами обмена веществ. При этом скорость выделения антигена может варьировать от нескольких дней до нескольких месяцев.

Липосомальные вакцины. Липосомы представляют собой пузырьки с двухслойной мембраной, состоящей из фосфолипидов, их используют для транспортировки антигенов к антигенпрезентирующим клеткам. Размеры липосом варьируют от 0,01 до 150 мкм. Антигены могут включаться в липосомы в растворимой водной фазе или прикрепляться к мембране. При этом происходит как снижение их токсичности, так и более продолжительная циркуляция. Липосомы являются и иммунными адъювантами. В Швейцарии разработана липосомальная вакцина против гепатита А, проходят испытания вакцины для парентеральной иммунизации против гриппа, гепатита А и В, дифтерии, столбняка и гепатита А.

Синтетические пептидные вакцины. Альтернативой иммунизации живыми и инактивированными вакцинами является использование синтетических аналогов пептидов для производства вакцин. В отличие от традиционных вакцинных препаратов данные вакцины, будучи целиком синтетическими, не несут в себе риска реверсии или неполной инактивации, помимо этого их эпитопы могут быть селекционированы и освобождены от компонентов, которые определяют развитие побочного действия.

Поствакцинальные осложнения. Так как в состав вакцин кроме чужеродных антигенов входят консервант (мертиолят), антибиотики

(канамицин, мономицин и др.), гетерологичные белки (дрожжевые, сыворотка крупного рогатого скота, белки яйца), это может приводить к поствакцинальным осложнениям (табл. 6.3).

Таблица 6.3

Возможные осложнения, имеющие причинную связь с вакцинацией

Клинические формы осложнений	Вакцины	Сроки развития после прививки
Анафилактический шок	Все, кроме БЦЖ и ОПВ	До 12 часов
Тяжелые генерализованные аллергические реакции (рецидивирующий ангионевротический отек — отек Квинке)	Все, кроме БЦЖ и ОПВ	До 5 дней
Синдром сывороточной болезни	Все, кроме БЦЖ и ОПВ	До 15 дней
Энцефалит	АКДС	До 3 дней
	Коревая вакцина	5—15 дней
Другие поражения ЦНС с генерализованными или фокальными проявлениями:		
энцефалопатия	АКДС, АДС	До 3 дней
серозный менингит	Коревая вакцина Паротитная вакцина	5—15 дней 10—40 дней
Неврит, полиневрит	Инактивируемые	До 30 дней
Резидуальные судорожные осложнения — апфебрильные судороги (появившиеся после прививки при температуре ниже 38,5 °С и отсутствовавшие до прививки), повторившиеся в течение первых 12 мес. после прививки	АКДС, АДС Коревая, паротитная, краснушная	До 3 дней 5—10 дней
Вакциноассоциируемый полиомиелит:	ОПВ	
у привитого здорового		5—30 дней
у привитого с иммунодефицитом		5 дней — 6 мес.
Тромбоцитопеническая пурпура	Коревая вакцина	10—25 дней
Артралгия, артрит	Краснушная вакцина	5—40 дней
Генерализованная инфекция	БЦЖ	После 6 нед.
Лимфаденит, келоидный рубец	БЦЖ	После 6 нед

Помимо перечисленных выше осложнений различают также:

- осложнения, вызванные программными ошибками, т.е. связанные с нарушениями правил и техники вакцинации;
- осложнения, вызванные вакциной как таковой (поствакцинальные осложнения);

• события, косвенно связанные с вакцинацией (например, фебрильные судороги в результате температурной реакции, вызванные вакциной);

• случайные совпадения.

Истинные поствакцинальные осложнения могут быть связаны с различным влиянием вакцинного препарата на организм:

• токсический (фармакологический) эффект (инактивированные корпускулярные вакцины);

• инфекционный вакцинальный процесс (живые вакцины);

• сенсибилизация;

• аутосенсибилизация;

• реверсия вирулентных (живые вакцины) или токсигенных (анатоксины) свойств;

• влияние на генетический аппарат клетки.

К побочным явлениям, вызванным вакцинами, относятся все изменения функций органов и тканей, которые выходят за пределы физиологических колебаний и не способствуют развитию иммунитета.

Любые осложнения, возникающие после вакцинации, не способствуют развитию специфического иммунитета. Побочное действие вакцин может быть обусловлено действующим началом препарата или содержащимися в нем примесями, а общий побочный эффект вакцинации складывается из различных видов биологического действия ее компонентов.

Виды побочного действия вакцин:

1) фармакологическое действие;

2) поствакцинальный инфекционный процесс, вызванный:
   • остаточной вирулентностью вакцинного штамма,
   • реверсией патогенных свойств вакцинного штамма;

3) туморогенное действие;

4) индукция образования антител к непротективным антигенам вакцин;

5) аллергия:
   • к антигенам вакцины,
   • к примесям и добавкам,
   • к экзоаллергенам, не связанным с вакциной;

6) иммуномодулирующее действие:
   • действие антигенов вакцин,
   • действие сорбента, носителей и др.,
   • действие цитокинов, присутствующих в вакцинах;

7) индукция аутоиммунных состояний;

8) индукция иммунодефицитных состояний;

9) психогенное действие вакцин.

Фармакологическое действие. Вакцины вызывают образование различных медиаторов иммунного ответа с выраженным фармакологическим действием (интерферон вызывает лихорадку, гранулоцитопению и токсические явления в ЦНС; IL-1β является одним из основных провоспалительных цитокинов).

Поствакцинальный инфекционный процесс связан с остаточной вирулентностью вакцинного штамма и реверсией его патогенных свойств (лимфадениты, остеомиелиты при введении БЦЖ).

Туморогенное действие вакцин. В связи с интенсивным развитием биотехнологии, прежде всего рекомбинантной технологии с использованием клеточных линий и гибрида, особое значение приобретает безопасность генно-инженерных вакцин в смысле их влияния на человека, на генетический аппарат клетки и возможность обсеменения окружающей среды генетически измененными возбудителями. К таким препаратам относятся рекомбинантные вакцины, рекомбинантные цитокины (интерфероны, интерлейкины, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, Фактор некроза опухолей), моноклональные антитела. Безопасность препаратов во многом зависит от качества сырья и материалов использования, первичных и перевиваемых клеточных культур, гибрида, сыворотки крови животных, трипсина, которые могут быть контаминированы различными вирусами и микоплазмами. Для контроля препаратов применяются методы молекулярного анализа (определение содержания ДНК, аминокислотной и нуклеотидной последовательности, методы молекулярной гибридизации с применением ПЦР).

Присутствие в препаратах гетерологичной ДНК в большой концентрации представляет онкогенную опасность, так как ДНК может вызвать инактивацию супрессорных онкогенов или активацию протоонкогенов после ее интеграции с клеточным геномом.

Индукция образования антител к непротективным антигенам вакцин. Корпускулярные и многие растворимые вакцины представляют собой набор антигенных детерминант, число которых в одной вакцине может достигать нескольких десятков. Лишь небольшая часть этих детерминант обеспечивает развитие антиинфекционного иммунитета. Остальные антигены вызывают продукцию антител-свидетелей, не играющих существенной роли в становлении иммунитета.

Аллергия. Вакцины содержат разнообразные сенсибилизирующие субстанции. Большинство вакцин содержит различные примеси и до-

бавки: гетерологичный белок, консерванты, ростовые факторы, стабилизаторы, сорбенты и др.

Иммуномодулирующее действие вакцин. Многие возбудители и бактериальные препараты (пептидогликаны, ЛПС, белок А) обладают ярко выраженными неспецифическими иммуномодулирующими свойствами, влияющими на развитие иммунного ответа к другим антигенам.

Неспецифические реакции клеток возникают не только в результате прямого действия микробных продуктов на клетки, они могут быть опосредованы через медиаторы, выделяющиеся из лимфоцитов или макрофагов под влиянием этих продуктов.

Одно из новых направлений в изучении побочного действия вакцин — определение различных цитокинов в препаратах, для изготовления которых используются культуры клеток эукариотов. Многие цитокины (IL-1, IL-6, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий факторы) могут присутствовать в полиомиелитной, антирабической, коревой, краснушной вакцинах. Цитокины могут быть причиной повышенной реактогенности отдельных серий вакцин.

Индукция иммунодефицитных состояний. При соответствующих условиях поступления вакцины в организм (сроки, доза) происходит супрессия иммунного ответа. Она зависит от способности микробных антигенов активировать клетки-супрессоры, секрецию простагландина Е2 из макрофагов и т.д. Вакцинация способна подавлять неспецифическую антиинфекционную резистентность. Изучение неспецифического влияния вакцин должно входить в программу доклинических и клинических испытаний новых вакцин. Это позволит определить наиболее рациональные варианты вакцин и схемы их применения.

6.2. ОСНОВЫ ИММУНОТЕРАПИИ

Иммуномодуляция — это своего рода коррекция процессов иммунитета. Все фармакологические препараты, обладающие этим свойством, делятся на препараты, стимулирующие процессы иммунитета и иммунодепрессивные.

Целесообразно выделить третью группу препаратов этого класса — собственно иммуномодуляторы, т.е. вещества, оказывающие разнонаправленное действие на иммунную систему в зависимости от ее исходного состояния.

Таким образом, в зависимости от эффекта действия иммуномодуляторы подразделяют следующим образом:

- иммуносупрессоры;
- иммуностимуляторы;
- собственно иммуномодуляторы.

Иммунодепрессанты — это средства, подавляющие иммунный ответ (к ним относятся лекарственные препараты, обладающие иммунотропностью или оказывающие неспецифическое действие, а также другие агенты биологической или химической природы, угнетающие иммунные процессы).

Иммуностимуляторы — это средства, усиливающие иммунный ответ. К ним относятся лекарственные препараты, пищевые добавки, адъюванты и другие агенты биологической или химической природы, стимулирующие иммунные процессы.

Иммуномодуляторы — это лекарственные средства, обладающие иммунотропной активностью, которые в терапевтических дозах восстанавливают функции иммунной системы (эффективную иммунную защиту).

Практически все природные вещества, обладающие способностью воздействовать на иммунитет, можно подразделить на экзогенные и эндогенные иммуномодуляторы. Подавляющее большинство экзогенных иммуномодуляторов — это вещества микробного происхождения: в основном бактериального и грибкового. Известны также препараты растительного происхождения (экстракт коры мыльного дерева, полисахарид из проростков картофеля — вегетан).

Вещества эндогенного происхождения в соответствии с историей их появления условно можно подразделить на две группы: иммунорегуляторные пептиды и цитокины.

Иммунорегуляторные пептиды являются в основном экстрактами из органов иммунной системы (тимуса, селезенки) или продуктами их жизнедеятельности (костного мозга).

Под цитокинами понимают всю совокупность биологически активных белков, продуцируемых лимфоцитами и макрофагами: интерлейкины, монокины, интерфероны. В иммунотерапии они используются в виде рекомбинантных препаратов (беталейкин, ронколейкин).

В настоящее время проявление инфекционной патологии характеризуется наличием двух взаимосвязанных и взаимообусловленных процессов:

1) ростом количества хронических инфекционных заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами с атипичными биологическими свойствами, часто с множественной устойчивостью к антибиотикам;

2) снижением иммунологической реактивности населения, наблюдаемым практически во всех развитых странах.

Существуют три основные группы заболеваний иммунной системы: иммунодефициты, аллергические и аутоиммунные процессы, при которых показана иммуномодулирующая терапия. Наибольшую эффективность от назначения иммуномодуляторов с иммуностимулирующими свойствами следует ожидать при вторичных или приобретенных иммунодефицитах, которые в 80—90% случаев проявляются в виде инфекционного синдрома.

При аллергических заболеваниях использование иммуномодуляторов целесообразно в тех случаях, когда эти заболевания осложнены какими-либо проявлениями вторичной иммунологической недостаточности: атопический дерматит с пиодермией, бронхиальная астма с явлениями хронического гнойно-обструктивного бронхита, рецидивирующей герпетической или цитомегаловирусной инфекцией и т.д. Однако во всех случаях иммуномодулирующая терапия направлена не на основную причину заболевания. При аллергических заболеваниях отмечаются активация Th2-клеток и повышение продукции IL-l, -4, -5, -13. IL-5 способствует созреванию эозинофилов и их активации. IL-4 и IL-13 индуцируют синтез IgE В-клетками. Следовательно, существенной причиной аллергического процесса служит повышенная активность Th2-клеток, поэтому иммуномодулирующая терапия должна быть направлена на снижение активности Th2-клеток и повышение активности Th1-клеток. Однако в настоящее время не существует иммуномодуляторов с доказанной селективной способностью изменять активность Th1- и Th2-клеток в нужном направлении, поэтому внедрение в практику соответствующих иммунокорректоров, обладающих избирательной способностью снижать синтез и секрецию цитокинов Th2-клетками, является актуальной задачей.

При аутоиммунных заболеваниях так же, как и при аллергических, довольно широко применяются иммунодепрессанты для подавления воспалительного процесса. Но их применение является не этиотропным, а симптоматическим. В основе этиопатогенеза многих аутоиммунных заболеваний, как и аллергических процессов, лежит дисбаланс Th1- и Th2-клеток, когда активность Th1-клеток выше, чем Th2-клеток, поэтому, как и при аллергических заболеваниях, основанием для применения иммуномодуляторов при аутоиммунных заболеваниях будут инфекционные процессы с целью снижения риска инфекционных осложнений.

Эффективным при аутоиммунных заболеваниях оказалось применение препарата β-интерферона, снижающего продукцию IFNγ и IFNα. Разрабатываются и лекарственные средства химического происхождения — синтетические кополимеры из аминокислот и др., обладающие способностью изменять в организме баланс Th1- и Th2-клеток.

Вторичные иммунодефициты служат главной мишенью применения иммуномодулирующих препаратов. Вторичные иммунодефициты проявляются частыми, рецидивирующими трудно поддающимися лечению инфекционно-воспалительными процессами различной локализации. При назначении иммуномодулирующих препаратов учитываются основные принципы антиинфекционной защиты.

При проникновении микроба в макроорганизм первой клеткой, которая с ним встречается, является тканевой макрофаг. Он инициирует развитие неспецифической резистентности и специфического иммунного ответа.

Назначение иммуномодуляторов больным с недостаточностью антиинфекционной защиты также имеет свои особенности:

- иммуномодуляторы назначают в комплексной терапии одновременно с антибиотиками, противогрибковыми, противопротозойными или противовирусными препаратами;
- целесообразно как можно раннее назначение иммуномодулятора — с первого дня применения химиотерапевтического этиотропного средства;
- иммуномодуляторы, действующие на фагоцитарное звено иммунитета, можно назначать больным как с выявленными, так и с невыявленными нарушениями иммунного статуса, т.е. исходя из клинической картины заболевания;
- иммуномодуляторы целесообразно применять на фоне иммунологического мониторинга, который следует проводить вне зависимости от выявленных или невыявленных исходных изменений в иммунной системе;
- иммуномодуляторы можно применять и в виде монотерапии при проведении иммунореабилитационных мероприятий, в частности, при неполном выздоровлении после перенесенного острого инфекционного заболевания;
- снижение какого-либо параметра иммунитета, выявленное при иммунодиагностическом обследовании у практически здорового че-

ловека, не служит основанием для назначения ему иммуномодулирующей терапии.

6.3. МЕТОДЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ

Иммунологические методы используются как для выявления титра антител в сыворотке крови (серодиагностика), так и для обнаружения антигенов в биологических жидкостях.

Общие закономерности иммунологических методов (ИМ):

- исследование проводится in vitro;
- проявляются при иммунологическом соответствии (гомологичности) антигена и антитела;
- протекают в 2 фазы (невидимая и видимая).

Все иммунологические методы можно разделить на 3 группы:

1) ИМ, основанные на прямом взаимодействии антигена с антителом (феномены агглютинации, преципитации, гемагглютинации, иммобилизации и др.);

2) ИМ, основанные на опосредованном взаимодействии антигена с антителом (реакции непрямой гемагглютинации, коагглютинации, латекс-агглютинации, угольной агломерации, бентонит-агглютинации, связывания комплемента и др.);

3) ИМ с использованием меченых антител или антигенов (флюоресцирующих антител, иммуноферментный, радиоиммунный анализы и другие методы).

Реакция агглютинации (РА) основана на взаимодействии поверхностных антигенов бактерий и других корпускулярных частиц с антителами и протекает в две фазы:

1) специфическая фаза — связывание детерминантной группы (эпитопа) антигена с паратопом — активным центром иммуноглобулина (невидимая фаза);

2) неспецифическая (видимая) фаза — образующийся комплекс (АГ + АТ) утрачивает растворимость и выпадает в осадок в виде хлопьев. Однако это явление возможно лишь в электролитной среде, например, в 0,85%-ном растворе натрия хлорида.

РА можно применять для обнаружения специфических антител в сыворотке крови и, наоборот, при помощи стандартной агглютинирующей сыворотки можно идентифицировать выделенные микробы.

Реакция Кастеллани. Некоторые микробы помимо специфических видовых антигенов содержат и групповые антигены. При иммуниза-

ции организм отвечает на них выработкой соответствующих видовых и групповых антител. Поэтому содержащая групповые антитела сыворотка агглютинирует родственные между собой микробные виды, имеющие общий групповой антиген.

Метод Кастеллани основан на удалении из иммунной сыворотки антител, реагирующих с групповыми антигенами. Насыщение сыворотки культурой гомологичного (специфичного) микроба ведет к полному удалению как специфических, так и групповых антител. Однако насыщение сыворотки культурой гетерологичного (родственного) микроба ведет к удалению только групповых антител. Впоследствии эта сыворотка будет агглютинировать лишь гомологичные микробы (табл. 6.4).

Таблица 6.4

Использование реакции Кастеллани для серологической диагностики брюшного тифа и паратифов

Вид микробов, которые агглютинирует испытуемая сыворотка больного	Агглютинация исследуемой сыворотки до адсорбции агглютининов	Агглютинация исследуемой сыворотки после адсорбции агглютининов		
		Взвесью *S. Typhi*	Взвесью *S. Paratyphi A**	Взвесью *S. Paratyphi B*
S. Paratyphi A (антигены 1, 2, 12)	+	+	–	+
S. Paratyphi B (антигены 1, 4, 12)	+	+	–	–
S. Typhi (антигены 5, 9, 12)	+	–	–	+

* Можно предположить, что заболевание вызвано *S. Paratyphi A*.

Ориентировочная РА для идентификации микроба. Реакция служит для предварительного определения вида микроба. На предметное стекло наносят каплю узкоспецифичной адсорбированной сыворотки (т.е. сыворотку, содержащую только специфические антитела). Сыворотку наносят в разведении 1:100 и рядом каплю физиологического раствора (контроль). Исследуемую культуру микроба петлей вносят в обе капли и размешивают. Через 2—4 мин учитывают результат. При положительной реакции (соответствие исследуемой культуры диагностической сыворотке) наблюдается скучивание бактерий в виде хлопьев на фоне прозрачной жидкости. В контроле — равномерная муть. Реакцию ставят перед постановкой развернутой РА для идентификации микроба (рис. 6.1).

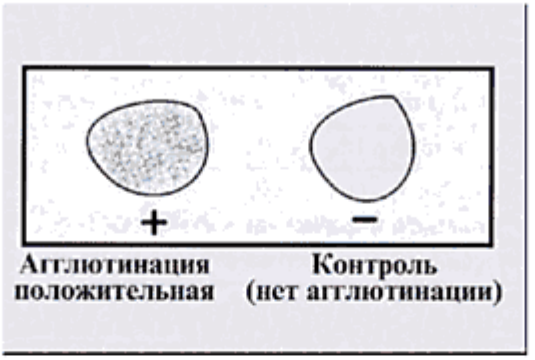

Рис. 6.1. Ориентировочная реакция агглютинации на стекле

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). РНГА является своеобразной модификацией РА. Сущность реакции состоит в том, что молекулы антигена адсорбируются на поверхности эритроцитов. Такие «нагруженные» антигенами эритроциты приобретают способность агглютинироваться иммунной сывороткой, специфичной для данного антигена. Эритроциты склеиваются и выпадают в осадок, образуя на дне пробирки гемагглютинат (рис. 6.2). В последнее время РНГА получила широкое распространение благодаря высокой чувствительности, экспрессности и методической простоте постановки.

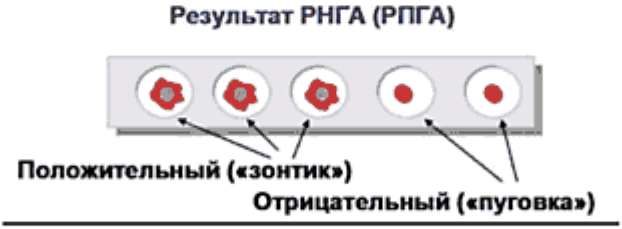

Рис. 6.2. Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации

Реакция латекс-агглютинации (РЛА). Помимо эритроцитов, в качестве носителей антигенов или антител можно использовать частицы полистирольного латекса, которые служат носителями антигена и при образовании иммунных агрегатов играют роль «мостиков» между молекулами антител. Латексные частицы являются как бы искусственными эритроцитами, но более устойчивы к внешним воздействиям. Каплю суспензии такого латекса прибавляют к капле исследуемой сыворотки, тщательно перемешивают. При положительной реакции

образуются мелкие, но хорошо видимые невооруженным глазом агглютинаты.

Реакция коагглютинации (РКА). Белок А некоторых штаммов золотистого стафилококка способен неспецифически адсорбировать на своей поверхности Fc-фрагменты иммуноглобулина G. Получившаяся молекула способна агглютинировать гомологичные антигены.

Помимо частиц латекса, белка А в реакциях антиген — антитело могут быть использованы и другие инертные носители (бентонит, каолин, активированный уголь и др.).

Реакция преципитации. В реакции участвуют мелкодисперсные антигены (преципитиногены), которые связываются с соответствующими антителами (преципитинами). Чаще всего эту реакцию применяют для выявления антигенов по известной иммунной преципитирующей сыворотке, содержащей антитела-преципитины. Это качественный метод исследования. Наиболее популярна в медицинской и ветеринарной практике реакция Асколи для обнаружения антигена возбудителя сибирской язвы.

В узкую преципитационную пробирку добавляют стандартную иммунную сыворотку и на нее осторожно наслаивают жидкость, содержащую определяемый антиген. Появление на границе двух жидкостей кольца (преципитина) свидетельствует о наличии антигена возбудителя сибирской язвы в исследуемой жидкости. Преципитат возникает вследствие укрупнения коллоидных частиц антигена. Иногда эту реакцию называют кольцепреципитацией. Важным условием образования нерастворимого комплекса антиген — антитело является полная прозрачность жидкостей, а также эквивалентное соотношение ингредиентов, так как образующийся комплекс растворяется в избытке антигена или антитела.

Реакция преципитации в агаре. Метод диффузной преципитации позволяет детально изучать состав сложных водорастворимых антигенных комплексов. Средой для растворения является слой застывшего агара, в котором пробиваются лунки. В одну лунку помещают жидкость, содержащую исследуемый антиген, в другую — стандартную иммунную сыворотку. Компоненты, входящие в состав антигена, диффундируют навстречу соответствующему антителу с различной скоростью. Комплекс антиген — антитело расположен в различных участках геля, где образуются линии преципитации. Каждая из линий соответствует только одному комплексу антиген — антитело (рис. 6.3).

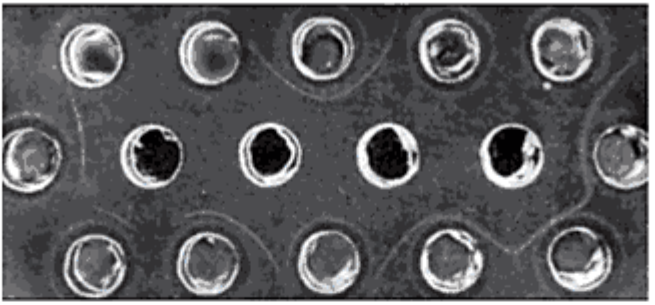

Рис. 6.3. Реакция преципитации в агаре

Реакция иммуноэлектрофореза. В основе реакции лежат два принципа — сочетание электрофореза и реакции преципитации. Реакция наиболее популярна в последние годы при исследовании антигенной структуры микроорганизмов. Антигенный комплекс помещают в лунку, которая находится в центре геля, залитого на стеклянную пластинку. Затем через гель пропускают электрический ток — происходит электрофорез белков, различные антигены перемещаются на неодинаковые расстояния соответственно своей электрофоретической подвижности. После окончания электрофореза в канавку, расположенную по краю пластинки (параллельно направлению движения белков), вносят специфическую иммунную сыворотку. Затем пластинку помещают во влажную камеру. В местах образования комплекса антиген — антитело появляются дугообразные линии преципитации.

Реакция иммунного лизиса. Антитела-лизины способны растворять микробы или другие клеточные элементы. Однако свое действие лизины могут проявлять только в присутствии комплемента. Для постановки реакции готовят ряд разведений инактивированной нагреванием сыворотки, затем добавляют живую микробную взвесь и комплемент. После инкубации в термостате реакцию оценивают с помощью повторных количественных высевов. В качестве контроля используют исследуемую культуру микробов, нормальную сыворотку и комплемент.

Феномен Исаева — Пфейффера. Реакцию иммунного лизиса ставят in vivo и употребляют обычно для лабораторной диагностики холеры. Смесь культуры микроба со специфической иммунной сывороткой вводят внутрибрюшинно морским свинкам. При соответствии выделенной культуры и иммунных антител происходит растворение микроорганизмов. Это можно установить микроскопией мазков, взятых из экссудата, или при посеве на агар (отсутствие роста).

Реакция связывания комплемента (РСК). РСК широко используют для лабораторной диагностики венерических болезней, риккетсиозов, вирусных инфекций. Реакция протекает в две фазы. Первая фаза — взаимодействие антигена и антител при обязательном участии комплемента, вторая — выявление результатов реакции при помощи индикаторной гемолитической системы (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка). Разрушение эритроцитов гемолитической сывороткой происходит только в случае присоединения к гемолитической системе комплемента. Если же комплемент адсорбировался ранее на комплексе антиген — антитело, то гемолиз эритроцитов не наступает.

При наличии в исследуемой сыворотке антител, комплементарных антигену, образующийся комплекс антиген — антитело связывает (адсорбирует) на себе комплемент. При добавлении гемолитической системы гемолиза не происходит, так как весь комплемент израсходован на специфическую связь комплекса антиген — антитело, а эритроциты остались неизменными.

При отсутствии в сыворотке антител, комплементарных антигену, специфический комплекс антиген — антитело не образуется, и комплемент остается несвязанным. Поэтому при добавлении гемолитической системы комплемент присоединяется к ней. Результатом реакции в данном случае будет гемолиз эритроцитов — в пробирках образуется так называемая лаковая кровь.

Ввиду сложности реакции все компоненты, участвующие в ней, должны быть оттитрованы и взяты в реакцию в равных объемах.

Метод флюоресцирующих антител (МФА). Для обнаружения антигенов и антител используют прямой и непрямой методы иммунофлюоресценции. Основу МФА составляет реакция между антигеном и специфическим по отношению к нему антителом. Флюоресцирующие антитела — это иммунноглобулины, выделенные из иммунных сывороток и меченые флюорохромами. Для этих целей используют изотиоцианат флюоресцеина (ФИТЦ). Меченый флюорохромом иммуноглобулин при нанесении на исследуемый мазок специфически адсорбируется на поверхности антигена, прочно с ним связываясь. Если антиген не комплементарен антителу, то при промывании препарата такие антитела легко смываются.

В России используют, как правило, прямой МФА. С целью уменьшения неспецифической флюоресценции исследуемых препаратов применяют контрастирование неспецифического свечения. Исследуемые препараты при этом окрашивают смесью специфических флю-

оресцирующих антител, меченых ФИТЦ, обеспечивающим зеленое свечение, и альбумина нормальной сыворотки быка (БСА), меченого родамином, дающим красную люминесценцию фона (рис. 6.4).

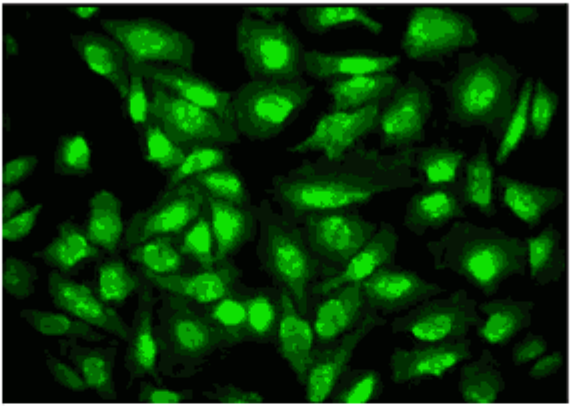

Рис. 6.4. Иммунофлюоресценция

Препараты для люминесцентной микроскопии готовят на предметных стеклах, хорошо обезжиренных. Все надписи делают простым карандашом на матовой площадке у края предметного стекла. Несколько капель исследуемого материала наносят пастеровской пипеткой или бактериологической петлей вдоль предметного стекла.

Мазки и препараты культур клеток 15—20 мин фиксируют в охлажденном химически чистом обезвоженном ацетоне в закрытом сосуде.

Окрашивают мазки при 37 °С в течение 30 мин во влажной камере, чтобы капли флюоресцирующей сыворотки не высыхали. После этого избыток флюоресцирующих смесей смывают водой, и препараты исследуют с применением люминесцентного микроскопа. Результаты иммунофлюоресцентной микроскопии учитывают по интенсивности и специфической флюоресценции исследуемого объекта.

Непрямой метод имеет преимущество перед прямым как более доступный: с помощью одной и той же антивидовой сыворотки, меченой флюорохромом, можно обнаружить различные антигены. Например, имея набор специфических иммунных сывороток кроликов к различным вирусным антигенам и единую меченую глобулиновую фракцию сыворотки лошади, иммунизированной нормальной сывороткой кроликов, можно осуществлять лабораторную диагностику многих вирусных инфекций.

Иммуноферментный анализ (ИФА).

В настоящее время ИФА является наиболее широко распространенным иммунологическим методом. Принцип ИФА аналогичен непрямому варианту МФА, но имеет ряд отличий:

- антитела или антигены фиксируются не на стеклах, а на внутренней поверхности полистироловых планшетов для иммунологических реакций;
- в качестве метки используется не флюорохром, а фермент (пероксидаза из корней хрена);
- реакция учитывается не под микроскопом, а визуально, после добавления в лунку субстрата для данного фермента.

Для объективной оценки результатов ИФА можно использовать простейшие фотометры (ридеры) с вертикальным ходом лучей.

Метод ИФА с использованием индикаторных полосок. В данном методе используется система ферментных каналов, предусматривающая включение двух ферментов. Эта пара подбирается таким образом, чтобы продукты одной ферментативной реакции служили субстратами для второго фермента. Поверхность индикаторной полоски покрыта антителами против вирусного антигена. Вместе с антителами на твердой фазе иммобилизованы молекулы фермента глюкозооксидазы. Готовую полоску погружают в исследуемый образец. Антитела связывают молекулы антигена из образца. Степень заполнения вакантных антител пропорциональна концентрации вирусного антигена. Затем индикаторную полоску переносят в раствор, содержащий конъюгат стандартного антигена с пероксидазой, субстрат для глюкозооксидазы (глюкозу) и хромоген (4-хлорнафол).

Глюкозооксидаза катализирует превращение глюкозы в глюконовую кислоту с образованием перекиси водорода. Конъюгат связывается свободными антителами на полоске, и пероксидаза оказывается в непосредственной близости от области наибольшей концентрации перекиси водорода. Атомарный кислород, образующийся в результате ферментативного расщепления перекиси, окисляет хромоген. В результате образуется голубое нерастворимое соединение, которое проявляется на полоске.

Интенсивность развивающейся окраски обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества в образце. Регистрацию проводят визуально или с помощью фотометра, предназначенного для измерения отраженного света. Такой вариант иммуноферментного анализа не требует промывок и разделения связанных и свободных молекул конъюгата. Анализируемый материал (сыворотки, слюна,

моча) не требует предварительного разведения и дополнительной обработки.

Для упрощения интерпретации полученных результатов в индикаторные полоски вводят внутренний стандарт. На индикаторной полоске в отдельном месте иммобилизуют антитела к пероксидазе. Концентрацию антипероксидазных антител подбирают в такой концентрации, чтобы связанный ими конъюгат пероксидаза-антиген содержал некоторое диагностически значимое количество антигена.

Интенсивность окраски зоны внутреннего стандарта сравнивают с окраской основной части индикаторной полоски. Если таковая превышает зону опытного образца, значит концентрация определяемого вещества больше условной концентрации антигена внутреннего стандарта.

Методы иммуноблотинга (ИБ). Иногда существует необходимость определять антитела к определенным белкам вируса, т.е. спектр специфических антител. Если с этой целью использовать ИФА, то в таком случае придется предварительно из вирусного патогена выделить и очистить необходимые антигены. Полученные белки наносят отдельно на твердую фазу. В случае использования 96-луночного планшета — в каждую лунку по одному виду антигена. Затем определяют специфические антитела непрямым методом ИФА.

По наличию положительной реакции в лунке с тем или иным антигеном можно судить о наличии соответствующих специфических антител. Такого рода иммуноферментные тест-системы предлагаются фирмами-производителями, однако широкое распространение благодаря большей информативности и простоте исполнения самого исследования получил метод иммунного блотинга (Western blot).

Иммунный блотинг позволяет определять в сыворотке крови антитела одномоментно и в то же время дифференцированно ко всем диагностически значимым белкам вируса. В переводе с английского Western blot означает западный перенос (дословно — промакивание). История этого необычного термина следующая. E. Southern в 1975 г. впервые предложил метод переноса из геля на мембрану электрофоретически разделенных фрагментов ДНК. По автору метод и был назван Southern blot, что в переводе означает «южный перенос». Метод переноса молекул РНК в свою очередь был специалистами прозван Northen blot — «северный перенос». Поначалу в шутку, а затем это название закрепилось и в официальной научной литературе.

В 1979 году были опубликованы результаты первых опытов по белковому блотингу. В продолжение традиций «географических» наиме-

нований методов переноса биологических макромолекул данный метод стал именоваться «западным» переносом — Western blot.

На первом этапе этого метода осуществляют электрофоретическое разделение смеси белков патогена в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). ДСН, являясь поверхностно активным веществом, равномерно обволакивает молекулы белка и придает всем им отрицательный заряд приблизительно равной величины. Поэтому молекулы движутся в электрическом поле в одном направлении, а скорость продвижения зависит только от размеров молекулы (молекулярной массы) белка.

В результате электрофоретической процедуры получают гелевую пластину, в толщине которой в виде отдельных тонких линейных зон располагаются белки. По направлению движения они разделяются в следующем порядке: ближе к старту находятся белки большой молекулярной массы, порядка 120—150 кДа, а к финишу далее всех продвинулись протеины массой 5—10 кДа. На втором этапе гелевую пластину накладывают на лист нитроцеллюлозы, и помещают эту конструкцию между электродами источника постоянного тока. Под действием электрического поля белки перетекают из пористого геля на более плотную мембрану, где достаточно прочно закрепляются.

Полученный блот обрабатывается блокирующим раствором, содержащим индифферентные в антигенном отношении белки и (или) неионные детергенты (Твин 20), молекулы которых блокируют на мембране свободные от антигена места. Затем лист мембраны разрезают на узкие полоски таким образом, чтобы каждая полоска содержала все антигенные фракции. Описанные этапы выполняются фирмой-производителем.

В коммерческих тест-системах для определения антител методом иммунного блотинга содержатся уже готовые к исследованию блоты (полоски, или стрипы). Пользователь проводит определение всего спектра специфических антител к белкам патогена по схеме непрямого метода. В качестве хромогена для проведения цветной (ферментативной) реакции используют растворимое бесцветное вещество, продукт которого приобретает окраску, становится нерастворимым и оседает (преципитирует) на нитроцеллюлозе.

В результате проведения последовательно иммунных и ферментативной реакций при наличии в исследуемой пробе антител к белкам патогена на блоте появляются темные поперечные полоски, расположение которых находится в зоне определенных белков патогена. Каждая такая полоса свидетельствует о наличии специфических антител

к соответствующему антигену. Результат исследования, проведенного методом иммунного блотинга, выдается в виде перечисления антител к конкретным белкам патогена.

Нитроцеллюлозные блоты после проявления могут долго храниться в высушенном виде. Однако интенсивность окраски при этом значительно ослабевает. Для хранения полученной информации в архиве влажные блоты можно фотографировать. С появлением сканеров, позволяющих вводить в память персональных компьютеров графическое изображение блота, задача сохранения результатов упростилась.

Учебно-методические материалы

Практическое занятие на тему **«Методы иммунопрофилактики и иммунотерапии»**.

Вопросы и задания для предварительного изучения

1. Расскажите о национальном календаре прививок.
2. Каковы показания и противопоказания к вакцинации?
3. Какова классификация вакцин?
4. Перечислите иммуномодуляторы.
5. Какие иммунологические реакции in vitro вам известны?

Глава 7

АНТИМИКРОБНЫЕ СРЕДСТВА. ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

7.1. ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Для контроля нежелательного микробного роста используют физические, химические, биологические или комплексные воздействия на микроорганизмы. Эффект от таких воздействий может быть микробицидным (гибель микроорганизмов), микробостатическим (прекращение их роста и размножения) или литическим (разрушение микробных клеток).

В зависимости от характера и целей антимикробного воздействия различают:

- стерилизацию — полное уничтожение в (на) объектах жизнеспособных микроорганизмов и их спор (обеспложивание объектов);
- дезинфекцию — уничтожение на объектах патогенных микроорганизмов (обеззараживание объектов);
- антисептику — уничтожение или ограничение роста микроорганизмов в (на) живых тканях;
- деконтаминацию — процесс уничтожения микроорганизмов в целях обеспечения инфекционной безопасности. Деконтаминация изделий медицинского назначения складывается из дезинфекции, предстерилизационной обработки и стерилизации;
- консервацию — предотвращение роста и размножения микроорганизмов в (на) объектах.

Чувствительность микроорганизмов к тем или иным воздействиям определяется рядом факторов:

- структурно-функциональными особенностями микроорганизма и его физиологическим состоянием,
- силой и продолжительностью воздействия;

наличием сопутствующих факторов, усиливающих или ослабляющих антимикробную активность.

Наибольшей устойчивостью к различным воздействиям обладают споры бактерий, что объясняется их особым строением (толстая оболочка, гелеподобная концентрированная протоплазма, наличие дипиколиновой кислоты, высокое содержание кальция при пониженном содержании воды) и тем, что у спор практически отсутствует метаболизм. Повышенная устойчивость микобактерий туберкулеза обусловлена высоким содержанием в их клетках липидов и воска. Следует отметить, что одно и то же воздействие может быть антимикробным в отношении одних микроорганизмов и в то же время стимулировать рост и размножение других. Так, кислород губителен для анаэробов, но стимулирует рост аэробных микроорганизмов, а применение антибактериальных антибиотиков может способствовать росту грибов.

7.2. ДЕЙСТВИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Фильтрация. Фильтрация является механическим методом освобождения жидкостей и газов от микроорганизмов. Для предотвращения заражения через воздух, например, в хирургических стационарах используют ватно-марлевые повязки и специальную одежду. Фильтрование применяют для стерилизации воздуха, например, с целью создания условий строгой стерильности при работе в ламинарном боксе или в помещениях, где находятся ослабленные (иммунодефицитные) больные. Для удаления микробов из жидкостей обычно применяют мембранные фильтры с диаметром пор менее 0,2 мкм, однако многие фильтры не задерживают вирусы, микоплазмы и другие мельчайшие микроорганизмы.

Высушивание. Высушивание губительно действует на микробов, однако разные виды различаются по чувствительности. Так, холерный вибрион погибает через 48 ч, а возбудитель туберкулеза — через 70 дней. Длительно сохраняются микробы в высохших пленках из гноя, крови или мокроты (месяцами). Высушивание практически не действует на споры. В процессе высушивания клетка лишается воды, происходит

инактивация ферментных систем, что в итоге ведет к гибели микроба. Высушивание применяют в медицине: в сухом виде хранят лекарственное сырье, многие лекарства. Широко применяется лиофильная сушка — быстрая заморозка и высушивание из замороженного состояния в вакууме. В этом случае вода переходит из кристаллического состояния в парообразное, минуя жидкую фазу, и жизнеспособность микробов сохраняется; срок годности живых вакцин и других иммунобиологических препаратов увеличивается до 1 г и более.

Лучистая энергия. Ультрафиолет и ионизирующее излучение непосредственно действуют на нуклеиновые кислоты в клетке, вызывая смертельные мутации, или приводят к образованию свободных радикалов, вызывающих инактивацию ферментных систем и разрушение клеточных структур. Солнечный свет, особенно его коротковолновая часть спектра, оказывает выраженное бактерицидное действие. УФО используют в медицине для обработки (дезинфекции) воздуха и поверхностей в операционных, родильных домах и отделениях, асептических помещениях аптек, в бактериологических лабораториях. Для этих целей в помещениях устанавливают бактерицидные облучатели с длиной волны 260—300 нм. Волны 260 нм максимально поглощаются ДНК, что приводит к образованию димеров тимина и соответственно к летальным мутациям. Вместе с тем УФО обладает низкой проникающей способностью и оказывает антимикробное действие только на поверхностях или в прозрачных растворах. Ионизирующее излучение (чаще гамма-лучи) используют для стерилизации термочувствительных материалов, например, изделий из пластика. Обладая высокой проникающей способностью, этот вид излучения приводит к потере электронов и образованию из атомов ионов, появлению свободных радикалов, которые могут приводить к полимеризации и другим химическим реакциям, сопровождающим разрушение химических структур микроорганизмов, а также появлению токсичных перекисных соединений. Чувствительность микроорганизмов к ионизирующему излучению сильно варьирует.

Ультразвук. Ультразвук вызывает гибель микроорганизмов в суспензиях: в микробной клетке образуются кавитационные полости с резкими перепадами разрежения и избыточного давления, что приводит к разрушению клетки. Этот метод используют для очистки (деконтаминации) медицинских инструментов, обеззараживания некоторых жидких препаратов, питьевой воды, а также для получения компонентов микробной клетки для исследований или в ходе биотехнологического производства.

Температура. Температура ниже 0 °С не оказывает губительного действия, однако у микробов прекращается рост и размножение.

Некоторые вирусы сохраняются при −270 °С. Лекарственное сырье, многие лекарственные и иммунобиологические препараты, а также пищевые продукты хранят при температуре от 0 до +10 °С (температура бытового холодильника). При этой температуре резко замедляется метаболическая активность и размножение большинства микроорганизмов (исключение составляют психрофильные и психротрофные микроорганизмы). Разрушение и гибель части микробных клеток вызывают повторное замораживание и оттаивание материалов. Высокие температуры губительны для микробов, однако разные виды обладают неодинаковой чувствительностью. Так, менингококки гибнут уже при комнатной температуре, возбудитель сифилиса — при +40 °С, возбудитель дизентерии — при +60 °С, бруцеллы — при +100 °С. Споры бактерий погибают лишь через 2—3 ч кипячения. При температурах выше +60 °С в обычных условиях происходит денатурация белка, ведущая к инактивации ферментов и разрушению микробных структур.

7.3. ДЕЙСТВИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Различные химические вещества, обладающие антимикробным действием, в зависимости от его спектра и активности могут обозначаться разными терминами. Вещества, убивающие микроорганизмы, называют микробицидами: бактериоциды, фунгициды, вирулициды, спороциды, альгициды (действуют соответственно на бактерии, грибы, вирусы, споры бактерий, водоросли). Если вещества подавляют рост и размножение микроорганизмов, их называют, например, бактериостатиками или фунгиостатиками (микостатиками).

В зависимости от целей применения антимикробные вещества подразделяют на несколько групп:

- антибиотики (вещества, которые в малых концентрациях специфически подавляют размножение или вызывают гибель определенных групп микробов и опухолевых клеток);
- антисептики (вещества, вызывающие гибель широкого круга микроорганизмов или предотвращают их размножение в (на) тканях организма);
- дезинфектанты (вещества, уничтожающие микробов в (на) объектах внешней среды);
- консерванты (вещества, препятствующие размножению микробов в пищевых продуктах, косметических средствах и других объектах).

Для антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов характерна специфичность и избирательность действия на микроорганизмы. Антисептики и дезинфектанты, как правило, обладают неспецифическим (общетоксическим) действием на широкий круг микроорганизмов. Эти различия в антимикробном действии обусловлены химическим строением веществ и отражаются в величине их действующих доз: у химиотерапевтических препаратов тот же эффект наблюдается при концентрациях в 100—1000 раз меньших, чем у других антимикробных средств.

Различают несколько групп антимикробных средств, для каждой из которых характерны строение или особенности их действия на микроорганизмы.

Фенолы. Эти вещества денатурируют белки, повреждают клеточные мембраны и используются в качестве дезинфектантов, а некоторые их нетоксичные для тканей производные (гексахлорофен и др.) — для антисептики.

Галогены. Препараты хлора, йода являются окислителями или галогенизируют белки (йод соединяется с остатками тирозина). Хлорирование широко применяется для дезинфекции воды и других объектов, а йодсодержащие препараты — в качестве антисептиков.

Спирты. 70%-ный водный раствор этанола и другие спирты растворяют липиды и денатурируют белки. Они обладают бактерицидным и фунгицидным действием, но малоэффективны в отношении спор и некоторых вирусов. Обычно их используют для целей дезинфекции и антисептики.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ). Группа ПАВ включает мыла и детергенты, которые обеспечивают механическое удаление микроорганизмов с поверхностей кожи и объектов внешней среды. Катионные детергенты, включая четвертично-аммониевые соединения (ЧАС), обладают антимикробной активностью — они взаимодействуют с фосфолипидами мембран, нарушая их функции. Применяют для дезинфекции и антисептики.

Соли тяжелых металлов. Соли серебра, меди, ртути, цинка используются для дезинфекции и антисептики. Так, ионы серебра и меди преципитируют белки, а ионы ртути взаимодействуют с сульфгидрильными (SH–) группами белков, блокируя их.

Красители. Бриллиантовый зеленый и некоторые другие красители взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, нарушая их функции. Их используют в качестве антисептиков.

Окислители. Перекись водорода, озон, перманганат калия повреждают ферментные системы. Их используют для целей деконтаминации, дезинфекции и антисептики. В некоторых случаях они могут выступать в качестве стерилянтов (уничтожают в том числе споры бактерий, что обеспечивает стерилизующий эффект).

Кислоты и щелочи. Эти вещества также обладают антимикробной активностью. Органические кислоты (бензойная, салициловая, молочная, аскорбиновая, пропионовая) широко применяются в качестве консервантов в пищевой и фармацевтической промышленности. Иногда их используют для антисептики.

Альдегиды. Глютаровый и другие альдегиды обладают выраженным антивирусным действием и используются для деконтаминации и дезинфекции.

7.4. ДЕЗИНФЕКЦИЯ

Дезинфекция — это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение на (в) объектах конкретных патогенных микробов. После дезинфекции могут сохраняться непатогенные микробы или их споры. В медицине применяют физические и химические методы дезинфекции.

Физические методы. Физический метод дезинфекции прост, надежен, экологически чист и безопасен для персонала, поэтому, если позволяют условия, этому методу следует отдавать предпочтение. К физическим методам дезинфекции относят:

1) механические (вытряхивание, проветривание, влажная уборка, стирка с моющим средством);

2) действие высокой температуры (проглаживание утюгом, кипячение, пастеризация);

3) УФО (облучение бактерицидными лампами).

Кипячение. Кипячение в дистиллированной воде используют для дезинфекции изделий из стекла и металла, термостойких полимеров и резин. Экспозицию (не менее 30 мин) выдерживают, начиная с момента закипания воды при полном погружении изделий, а при кипячении в воде с 2% бикарбоната натрия (содой) время экспозиции — не менее 15 мин.

Пастеризация. Пастеризация — это однократное кратковременное прогревание при температуре ниже 100 °С с последующим быстрым охлаждением. Прогревание проводят при 65—95 °С от 30 с до 2 мин, что ведет к частичному обеспложиванию объектов.

Как и кипячение, пастеризация не является методом стерилизации. После пастеризации сохраняются живыми споры и часть вегетативных форм, поэтому пастеризованный продукт (молоко, соки и т.д.) хранят в холодильнике.

Облучение ультрафиолетом. УФО (облучение бактерицидными лампами) используют в медицине для обработки воздуха и поверхностей в операционных, родильных домах и других помещениях лечебно-профилактических учреждений. Расчет необходимого количества бактерицидных облучателей и времени экспозиции ведут исходя из кубатуры помещения и характера микробной контаминации.

Химические методы. При дезинфекции химическим методом применяют следующие дезинфицирующие вещества:

- хлорсодержащие препараты (хлорная известь, хлорамин Б, гипохлорит кальция, гипохлорит натрия, получаемый электрохимическим путем и др.);
- окислители (перекись водорода с моющим средством и без него, перманганат калия);
- фенолы (карболовая кислота, лизол); йод и йодофоры (иод + ПАВ);
- соли тяжелых металлов (сулема, диоцид, мертиолят);
- поверхностно-активные вещества — ПАВ (сульфанол);
- четвертичные аммониевые соединения (мирамистин, роккал, бензалкония хлорид и др.);
- спирты (70%-ный этанол);
- формальдегид (формалин);
- красители (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий);
- кислоты (салициловая, борная и др.);
- альдегиды (глютаровый).

Выбор метода дезинфекции определяется устойчивостью конкретных микроорганизмов, контаминировавших объект, а также свойствами самого объекта. По устойчивости к действию дезинфицирующих средств в настоящее время выделяют пять групп возбудителей инфекций: вирусных, бактериальных, туберкулеза, кандидомикоза, дерматомикозов. В зависимости от направления дезинфекции могут быть использованы различные вещества, разные концентрации одного и того же вещества или время экспозиции. Различные методы и режимы дезинфекции применяют для изделий из стекла, металлов, пластмасс, резин, эндоскопов и сложной техники, стоматологических инструментов. Например, если проводится дезинфекция изделий из коррозионно-стойкого металла, контаминированных микобактериями туберкулеза, используют 5%-ный раствор хлорамина с экспозицией

240 мин, а если другими бактериями — используют 1%-ный раствор и время экспозиции сокращают до 30 мин.

7.5. КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФЕКЦИИ

Контроль текущей и заключительной дезинфекции в очагах кишечных инфекций основан на обнаружении в исследуемом материале кишечной палочки (этот микроб постоянно находится в выделениях больных и по устойчивости близок к возбудителям кишечных инфекций). После проведения дезинфекции в исследуемом материале кишечная палочка должна отсутствовать.

Для контроля работы дезинфекционных камер используют эталонные культуры, например: стафилококк — при обработке вещей из очагов инфекций, вызванных неспорообразующими микроорганизмами, споры антракоидной палочки — при дезинфекции вещей из очагов инфекций, вызванных спорообразующими микробами.

О качестве проведенной дезинфекции изделий медицинского назначения судят по отсутствию золотистого стафилококка (*S. aureus*), синегнойной палочки (*P. aeruginosa*) и БГКП. Для этого методом смывов исследуют 1% (не менее 3—5 единиц) одновременно обработанных изделий одного наименования. По 0,1 мл смывов, взятых марлевыми салфетками (5 × 5 см), наносят на поверхность желточно-солевого, кровяного агаров и среды Эндо и инкубируют засеянные чашки при 37 °С. Дезинфекцию считают эффективной, если через 48 ч на чашках не вырастают колонии указанных микроорганизмов.

Дезинфекция, предстерилизационная очистка и стерилизация изделий медицинского назначения являются важнейшим комплексом мер, препятствующих возникновению и распространению ВБИ среди больных и персонала.

Предстерилизационная очистка изделий медицинского назначения. Очистку таких изделий осуществляют ручным или механизированным (с применением ультразвука) методом после их дезинфекции и последующего отмывания остатков дезинфицирующих средств питьевой водой. Если средство одновременно обладает моющим и антимикробным действием, допускается совмещение в одном процессе дезинфекции и предстерилизационной очистки. Для очистки используют различные химические вещества, кипячение, замачивание, ершевание, тампоны, салфетки, струйный метод. Разъемные изделия очищают в разобранном виде, тщательно очищают каналы и полости изделий. После очистки изделия ополаскивают и высушивают. Режи-

мы очистки и высушивания определяются видом изделия и характером загрязнения. Контроль качества очистки проводят центры гигиены и эпидемиологии и дезинфекционные станции (не реже одного раза в квартал), а в качестве самоконтроля — централизованные стерилизационные (не реже одного раза в неделю). При этом проверяют не менее 1% изделий (трех единиц), обработанных за смену.

Качество очистки оценивают путем постановки амидопиридиновой (азопирамовой) пробы на остаточные количества крови и фенолфталеиновой пробы на остатки щелочных компонентов моющих средств. При положительном результате той или иной пробы всю группу изделий подвергают повторной очистке до получения отрицательного результата.

На практике важно различать между собой и отличать от дезинфекции асептику и антисептику.

Асептика — это система профилактических мероприятий, направленных на предотвращение попадания микроорганизмов в рану, лекарственные препараты, питательные среды и другие объекты. Она включает:

1) стерилизацию инструментов, приборов, материалов;

2) специальную (антисептическую) обработку рук перед асептичной работой;

3) соблюдение определенных правил и приемов работы (стерильный халат, маска, перчатки, исключение разговоров и т.п.);

4) осуществление специальных санитарно-противоэпидемических и гигиенических мероприятий (правильная вентиляция, влажная уборка с применением дезинфицирующих средств, использование бактерицидных облучателей, боксированных помещений).

Антисептика — это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микробов, попавших в рану, лекарственный препарат или другой объект. Различают антисептику:

- механическую (например, при обработке раны удаление из нее инфицированных и нежизнеспособных тканей);
- физическую (наложение гигроскопических повязок, применение гипертонических растворов, способствующих оттоку раневого отделяемого в повязку, сухого тепла, УФО, лазера и т.д.);
- химическую (применяют химические вещества, обладающие бактерицидными или бактериостатическим действием при минимальном органотропном действии, например, мирамистин или хлоргексидин; в лекарственные препараты вносят борную кислоту, мертиолят и др.);

• биологическую (применение антибиотиков, бактериофагов, иммуноглобулинов, средств, стимулирующих защитные силы организма).

7.6. СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Стерилизация — полное обеспложивание объектов, при котором уничтожаются все формы микроорганизмов (вегетативные и споры). Для стерилизации применяют физические и химические методы. Выбор метода определяется видом стерилизуемого материала, который после стерилизации должен сохранять свои основные свойства (форму, эластичность, активность и др.). Если объект должен сохранять некоторое время состояние стерильности, перед стерилизацией он должен быть соответствующим образом упакован, а изделия медицинского назначения, кроме того, подвергают дезинфекции и предстерилизационной очистке (эти меры направлены на профилактику внутрибольничных инфекций у больных и персонала, контактирующих с такими изделиями). 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 сут., в пергаменте или коробке с фильтром — 20 сут.

Тепловые методы. Физические методы стерилизации включают действие высокой температуры, ионизирующего излучения, фильтрование через коллодийные фильтры.

Помимо указанных имеются и другие методы тепловой стерилизации. Например, стерилизация в среде горячих стеклянных шариков, так называемая гласперленовая стерилизация (так стерилизуют зубные боры, рабочие части зондов, гладилок и другие стоматологические инструменты).

Контроль тепловой стерилизации. Контроль процесса стерилизации осуществляют несколькими методами:

• по показаниям приборов (мановакуумметров, термометров, таймеров);

• с использованием физико-химических тестов (вместе со стерилизуемым материалом в аппарат закладывают ампулы с кристаллами веществ или специальные бумажные термохимические индикаторы; при нужной температуре вещества расплавляются, а индикаторы меняют цвет);

• биологические тесты (в аппарат помещают флакончики с салфетками или бумажными дисками, пропитанными взвесью термостойкого спорообразующего микроба (*Bacillus stearotermophilus* для контроля паровых или *Bacillus licheniformis* для контроля воздушных стерилизаторов), и после стерилизации их инкубируют в ПБ, который, если споры погибли, не должен мутнеть).

Максимальные термометры, физико-химические и биотесты помещают в определенные точки аппарата. Показателями эффективной работы стерилизационной аппаратуры являются: отсутствие роста тест-культуры в сочетании с удовлетворительными результатами физического и химического контроля.

Воздействие ионизирующим излучением. Обработка ионизирующими лучами («холодная стерилизация») — наиболее перспективный способ стерилизации, так как возможна полная автоматизация всех процессов. Стерилизацию проводят в товарной упаковке, что обеспечивает длительность сохранения материала стерильным. Установка представляет собой бетонную камеру с толстыми стенами для защиты персонала от излучения. После обработки материал контролируют на остаточную радиоактивность. Этим способом стерилизуют хирургический инструментарий, изделия из пластмасс (например, шприцы однократного использования), вакцины, лечебные сыворотки, многие лекарства.

Фильтрование. Для стерилизации жидкостей используют фильтры из коллодия, диаметр пор которых меньше размеров вирусов. Этот метод применяют в биотехнологическом производстве при изготовлении вакцин, иммунных сывороток, растворов антибиотиков, бактериофагов и других материалов, не пригодных для тепловых или других методов стерилизации. Фильтрование через бактериальные фильтры (асбестовые, целлюлозные) не является в строгом смысле стерилизующим, так как у этих фильтров более крупные поры. Через них могут проходить вирусы и фильтрующиеся формы бактерий.

Химические методы стерилизации. Стерилизация растворами химических средств. Этот метод является вспомогательным, так как изделия нельзя простерилизовать в упаковке, а по окончании процесса их надо промыть стерильной жидкостью (например, питьевой водой), что нарушает правила асептики и может привести к вторичному обсеменению изделий. Эти методы применяют для изделий, которые нельзя стерилизовать другими методами (из-за термолабильности, конструкции и т.п.). Используют различные режимы стерилизации, например: 6%-ный раствор перекиси водорода, экспозиция 6 ч (изде-

лия из полимерных материалов, стекла, коррозионностойких металлов); 4,8%-ный раствор первомура, экспозиция 15 мин (лигатурный шовный материал).

Обязательными условиями являются: полное погружение изделия в раствор (с заполнением каналов и полостей) и температура раствора не менее 18 °С. После стерилизации все манипуляции проводят, строго соблюдая правила асептики (достают из раствора стерильным пинцетом или корнцангом, промывают стерильной жидкостью). Если изделия используют не сразу после стерилизации, то их помещают в стерильную коробку со стерильной простыней и хранят не более 3 сут.

Газовая стерилизация. Этот метод применяется для обработки оптики, кардиостимуляторов, сложной техники (аппаратов искусственного кровообращения), изделий из полимеров, стекла, металлов. Используют окись этилена или смесь ОБ (окись этилена с бромистым метилом), озон, а также пары раствора формальдегида в этиловом спирте, которыми наполняют стационарные газовые стерилизаторы или портативные анаэростаты. Для поддержания температуры (35 или 55 °С) анаэростаты помещают в термостат или водяную баню. Для упаковки используют полиэтиленовую пленку (два слоя), пергамент и специальный упаковочный материал. Выбор метода и режима газовой стерилизации зависит от вида стерилизуемого изделия (например, смесью ОБ разные изделия стерилизуют от 4 до 16 ч). Стерилизованные газом изделия применяют после их выдержки (в течение 1—21 сут.) в вентилируемом помещении. Срок сохранения стерильности для изделий в упаковке из полиэтиленовой пленки — 5 лет, пергамента или бумаги — 20 сут. Контроль процесса ведут по показаниям приборов (термометров, мановакуумметров), а контроль эффективности стерилизации — с помощью биотестов.

Контроль стерильности изделий медицинского назначения. Контроль изделий, простерилизованных в ЛПУ, проводят в специально оборудованных боксах с предбоксниками, соблюдая асептические условия, исключающие возможность вторичной контаминации изделий микробами. В боксах используют бактерицидные облучатели, поверхности обрабатывают моющими и дезинфицирующими средствами, воздух подают в бокс через бактериальные фильтры. Перед входом в бокс сотрудники лаборатории тщательно моют руки, надевают в предбоксник стерильную спецодежду (халаты, бахилы, шапочки, перчатки, 4-слойные маски). В процессе работы в боксе проверяют обсемененность воздуха: на рабочем столе на 15 мин открывают две чашки с питательным агаром, которые затем инкубируют 48 ч при 32 °С (до-

пускается рост не более трех колоний неспорообразующих сапрофитов). Пробы для исследования (не менее 1% из числа одновременно простерилизованных изделий в той же упаковке) отбирает лаборант или медсестра под наблюдением сотрудника баклаборатории. Контроль стерильности проводят путем прямого посева (погружения) изделий в питательные среды (мелкие изделия или детали разъемных изделий — целиком, от шовного или перевязочного материала — отрезанные фрагменты). Стерильность крупных изделий контролируют методом смывов. Материалом обязательно засевают две среды — тиогликолевую (для роста бактерий) и среду Сабуро (для роста грибов). Посевы на тиогликолевой среде выдерживают при 32 °С, на среде Сабуро — при 22 °С в течение 7 сут. (для изделий после тепловой стерилизации). При отсутствии роста во всех пробирках (флаконах) делают заключение о стерильности изделий.

7.7. АНТИБИОТИКИ

Крупнейшим достижением биологии и медицины XX в. является открытие антибиотиков, используемых для подавления жизнедеятельности возбудителей во внутренней среде организма. Эти лекарственные препараты должны вызывать гибель или задерживать размножение патогенных микроорганизмов, но при этом не нарушать функции жизненно важных систем организма человека.

Антибиотики, или антибактериальные препараты (АБП), — это вещества микробного происхождения, а также их полусинтетические и синтетические аналоги, способные избирательно подавлять рост и размножение патогенных микроорганизмов в организме больного. На сегодняшний день известно около 2000 антибиотиков, а в широкой клинической практике используется около 200 препаратов.

Механизм действия антибиотиков представлен в табл. 7.1.

Определение показаний для исследования чувствительности микробов к антибиотикам является очень актуальной в наши дни.

Обязательному исследованию на чувствительность к АБП подлежат все микроорганизмы, выделенные из первично стерильных жидкостей, органов и тканей человека. В остальных случаях оценке чувствительности должна предшествовать оценка клинической значимости выделенного микроорганизма.

Определение чувствительности выделенного штамма микроорганизма показано, если уровень его устойчивости к АБП не может быть предсказан на основании данных идентификации или вероятной так-

сономической принадлежности микроорганизма. Важной задачей является выявление приобретенной резистентности к АБП у природночувствительных к ним микроорганизмов. Подтверждение природной чувствительности или резистентности микроорганизма к АБП не является целью практических исследований.

Таблица 7.1

Механизм действия антибиотиков

Механизм действия антибиотиков	Препараты
Нарушение синтеза клеточной стенки микроорганизмов	Пенициллины Цефалоспорины Монобактамы Карбапенемы Гликопептиды
Нарушение функции цитоплазматической мембраны	Полимиксины Полиены
Нарушение синтеза белка на уровне рибосом	Аминогликозиды Тетрациклины Амфениколы Макролиды Линкозамиды
Нарушение синтеза нуклеиновых кислот	Фторхинолоны Рифамицины Гризеофульвин
Нарушение метаболизма фолиевой кислоты	Сульфаниламиды Триметоприм

Исследованию по оценке антибиотикочувствительности подлежат чистые культуры микроорганизмов или материал изолированных колоний с плотных питательных сред после первичного посева образца клинического материала, в последнем случае необходимо параллельно провести идентификацию культуры.

При обнаружении на плотных питательных средах после первичного посева смешанной культуры исследовать антибиотикочувствительность до идентификации и оценки этиологической значимости отдельных микроорганизмов нецелесообразно.

Прямое определение чувствительности с использованием клинического материала (без выделения чистой культуры) возможно только в исключительных случаях при условии подтверждения однородности культуры и высокой степени обсемененности при окраске по Граму, причем исследование нужно повторить после выделения чистой культуры микроорганизма.

Следует уделять особое внимание определению чувствительности микроорганизмов, относящихся к таксономическим группам, для которых характерна высокая частота распространения приобретенной резистентности. У микроорганизмов, проявляющих универсальную чувствительность к каким-либо АБП, т.е. когда случаев резистентности не описано (например, у *Streptococcus pyogenes* все штаммы чувствительны к пенициллину), проводить определение чувствительности к этим препаратам в повседневной практике нецелесообразно.

Факты выявления резистентности у микроорганизмов, для которых этот феномен ранее не был описан в научной литературе, следует оценивать с крайней осторожностью, а полученные штаммы рекомендуется отправлять в референтные лаборатории и в специализированные учреждения для проверки. Не следует в практических целях исследовать микроорганизмы, для которых методы определения чувствительности в настоящее время не стандартизованы и отсутствуют критерии интерпретации результатов.

Результаты, полученные в данном случае, не могут служить основанием для назначения антибактериального препарата, если соответствующая нозологическая форма не приведена в утвержденной инструкции по его применению. Исследование чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам проводят стандартными унифицированными методами, регламентированными официальными инструкциями, в частности методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (МУК 4.12.1890—04).

Современные методы определения чувствительности микробов к АБП делят на методы серийных разведений и диффузионные методы.

Методы серийных разведений основаны на определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность АБП, — величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК), т.е. минимальной концентрации, подавляющей рост исследуемого микроорганизма. Для этого заданные концентрации АБП вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма, и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

В зависимости от характера используемой питательной среды различают методы серийных разведений в агаре или в бульоне. В зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют методы серийных макро- и микроразведений.

Разновидностью метода серийных разведений является также метод, основанный на использовании только двух концентраций АБП, соответствующих пограничным значениям МПК. Этот принцип широко используется в автоматизированных системах для определения чувствительности микроорганизмов.

Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК.

В настоящее время существуют две основные модификации диффузионного метода: диско-диффузионный и Е-тест.

В диско-диффузионном методе в качестве носителя АБП используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. Величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК (рис. 7.1). Однако диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, а результатом исследования является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный).

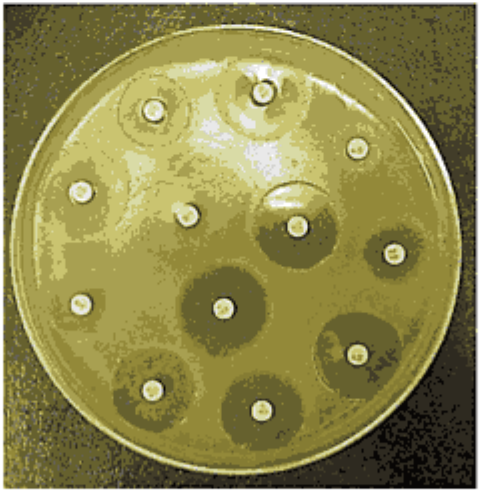

Рис. 7.1. Диско-диффузионный метод определения чувствительности к антибиотикам

Е-тест представляет собой узкую полимерную полоску, на которую нанесен градиент концентраций АБП (от минимальных до максимальных). Подавление роста микроорганизма вокруг полоски Е-теста

происходит только в той зоне, где концентрация АБП, диффундирующего из носителя, выше МПК; при этом образуется каплевидная зона ингибиции. Значения концентрации АБП в каждом участке носителя типографским способом нанесены на наружной (обращенной к исследователю) поверхности Е-теста. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста вплотную подходит к носителю (рис. 7.2).

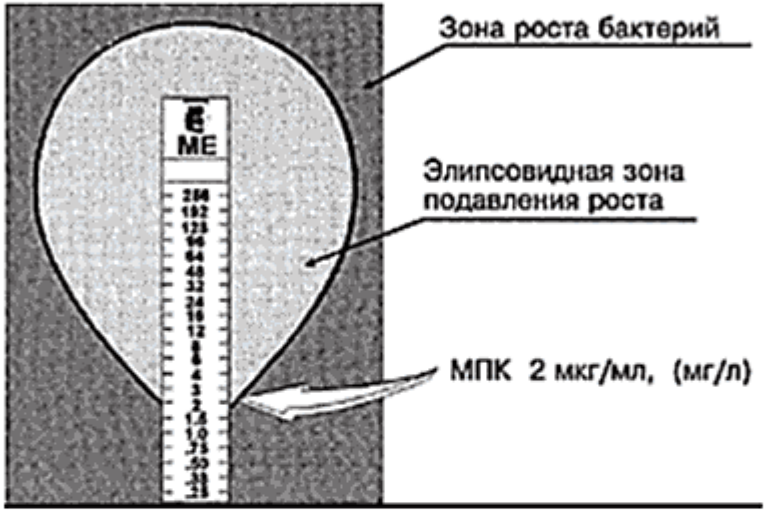

Рис. 7.2. Е-тест определения чувствительности к антибиотикам

Для оценки чувствительности необходимо использовать только специально предназначенные для этой цели среды (Мюллера — Хинтона, АГВ и др.).

Вид питательной среды для оценки чувствительности определяется выбранным методом проведения исследования (агар или бульон), а также видом тестируемого микроорганизма. Выбранная питательная среда для определения чувствительности готовится из сухой среды промышленного производства в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования питательную среду сразу же разливают в стерильные пробирки или в чашки Петри или (если необходимо) колбы со средой помещают на водяную баню при 48—50 °С, где выдерживают до достижения указанной температуры, после чего в них асептически вносят термолабильные питательные добавки и (или) рабочие растворы антибиотиков, а затем разливают в пробирки или в чашки Петри.

Агар разливается по чашкам слоем 4 мм (на чашку диаметром 100 мм требуется 25 мл агара, на чашку диаметром 90 мм — 20 мл). Чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Приготовленные указанным образом чашки Петри предпочтительнее использовать немедленно. Допускается хранение в запаянных полиэтиленовых пакетах в холодильнике при 4—8 °С в течение недели.

Оптическая плотность бактериальной суспензии с данной концентрацией соответствует стандарту мутности 0,5 по Мак-Фарланду. Существуют коммерчески доступные стандарты мутности и спектрофотометры.

Отбирают несколько однотипных, четко изолированных колоний, выросших на неселективных плотных питательных средах. Петлей переносят незначительное количество материала с верхушек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором или питательным бульоном, доводя плотность до 0,5 по стандарту Мак-Фарланда. Приготовленную суспензию следует использовать в течение 15 мин после приготовления.

Приготовление суспензии из бульонной культуры. Можно использовать 5—6-часовую бульонную культуру микроба. Для этого отбирают несколько однотипных изолированных колоний, петлей переносят незначительное количество материала в пробирку с 5,0 мл жидкой неселективной питательной среды. Инкубируют при 35 °С. Примерно через 5—6 ч инкубации плотность микробной суспензии приблизительно соответствует необходимой, и ее точно доводят до 0,5 по Мак-Фарланду путем добавления стерильного бульона или физиологического раствора.

Каждая партия плотных питательных сред для определения чувствительности должна проверяться на пригодность для роста тестируемых микроорганизмов. Для этого используются соответствующие контрольные штаммы: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49247 или ATCC 10211, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. Из суточных культур указанных микроорганизмов готовят микробную взвесь, соответствующую по плотности 0,5 по стандарту Мак-Фарланда (содержащую приблизительно 1,5 — 10^8 КОЕ/мл). Из полученной микробной взвеси готовят серию последовательных разведений 1:10. Затем на приготовленные чашки с соответствующим агаром высевают по 0,1 мл взвеси.

В настоящее время перечень АБП, чувствительность к которым рекомендуется определять у различных видов микроорганизмов, при-

нято подразделять на две группы: подлежащие изучению в первую очередь (I группа) и дополнительные (II группа). Оценка чувствительности к препаратам I группы позволяет получить минимально необходимую информацию для обоснования рациональной терапии инфекции, вызванной исследуемым микроорганизмом. Информативность исследований возрастает по мере увеличения количества включенных в исследование АБП из группы II.

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что прогнозирование клинической эффективности АБП на основе оценки фенотипа (антибиотикограммы) менее информативно, чем ее прогнозирование на основе выявления генотипа (набора детерминант резистентности) данного патогена. Однако непосредственная детекция детерминант резистентности генетическими методами (генотипирование) в рутинной практике в большинстве случаев неосуществима. В ряде случаев генотипирование может быть заменено оценкой чувствительности к АБП, являющимися маркерами того или иного механизма устойчивости. Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности заключается в отнесении исследуемого микроорганизма к одной из трех категорий:

- «чувствительный» — конкретный штамм подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых режимах дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, обычно эффективно при применении АБП в рекомендуемых дозах;
- «промежуточный» — МПК АБП в отношении штаммов этой категории выше, чем в отношении чувствительных, но находится в пределах, достижимых при рекомендуемых режимах дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, может быть эффективным при применении АБП в повышенных дозах либо при локализации очага инфекции в тех органах или тканях, в которых в силу физиологических особенностей создаются повышенные концентрации АБП;
- «устойчивый» — штамм не подавляется при концентрациях АБП, возникающих в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования. Для устойчивых штаммов характерно наличие определенных механизмов резистентности. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, скорее всего, будет неэффективным.

Интерпретация осуществляется на основании сопоставления результатов исследования (величины МПК АБП или диаметра зоны ин-

гибиции роста) с пограничными значениями этих параметров, отделяющих чувствительные штаммы от промежуточных и промежуточные от устойчивых.

При выборе значений пограничных концентраций АБП учитывают микробиологические, фармакокинетические, фармакодинамические, а также клинические факторы. Обоснование значений пограничных концентраций является сложным и во многом субъективным процессом.

Приведенные выше категории являются клинически ориентированными и не всегда коррелируют с микробиологическими.

Учебно-методические материалы

Практическое занятие на тему **«Методы определения чувствительности к антибиотикам»**.

Вопросы и задания для предварительного изучения

1. Перечислите основные группы химиотерапевтических препаратов.
2. На основе каких принципов строится классификация антибиотиков?
3. Что подразумевается под лекарственной устойчивостью бактерий, каковы пути ее преодоления?
4. Каковы причины устойчивости вирусов к антибиотикам?
5. Перечислите осложнения антибиотикотерапии инфекционных заболеваний.
6. Какие методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам используются в практике?

гибиции роста) с пограничными значениями этих параметров, отделяющих чувствительные штаммы от промежуточных и промежуточные от устойчивых.

При выборе значений пограничных концентраций АБП учитывают микробиологические, фармакокинетические, фармакодинамические, а также клинические факторы. Обоснование значений пограничных концентраций является сложным и во многом субъективным процессом.

Приведенные выше категории являются клинически ориентированными и не всегда коррелируют с микробиологическими.

Учебно-методические материалы

Практическое занятие на тему **«Методы определения чувствительности к антибиотикам»**.

Вопросы и задания для предварительного изучения

1. Перечислите основные группы химиотерапевтических препаратов.
2. На основе каких принципов строится классификация антибиотиков?
3. Что подразумевается под лекарственной устойчивостью бактерий, каковы пути ее преодоления?
4. Каковы причины устойчивости вирусов к антибиотикам?
5. Перечислите осложнения антибиотикотерапии инфекционных заболеваний.
6. Какие методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам используются в практике?

Глава 8

КЛАССИФИКАЦИЯ ГРИБОВ. СТРОЕНИЕ И ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ ГРИБОВ, МЕТОДЫ ИХ ИЗУЧЕНИЯ

Студент должен знать: особенности морфологии и физиологии грибов, методы лабораторной диагностики микозов, средства этиотропной терапии микозов.

Ключевые слова и термины: микозы. Гифы. Конидии. Споры. Мицелий. Таллом.

8.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ГРИБОВ

В отличие от бактерий грибы являются эукариотами. Они составляют особое царство живых организмов — *Mycota*. Грибы вызывают заболевания как человека, так и животных (микозы). Участие грибов в патологии человека не ограничивается микозами. Споры многих грибов способны проникать через респираторный тракт, вызывая сенсибилизацию. При этом формируются различные аллергические заболевания, такие как бронхиальная астма, аллергические альвеолиты, риниты.

Все грибы, за немногим исключением, имеют мицелиальное строение (рис. 8.1). Мицелий — это совокупность гиф (разветвленных нитей) гриба, из которых состоит его тело — таллом. Мицелий может быть либо одноклеточным (цинотичным), либо разделен перегородками (септами), т.е. многоклеточным. Грибы, имеющие слаборазвитый, несептированный мицелий, относятся к низшим. Таллом, состоящий

из почкующихся или делящихся клеток, характерен для дрожжей. Дрожжи могут образовывать мицелиальные структуры, однако такой мицелий отличается от истинного, так как возникает в результате почкования, а не апикального роста гиф, и называется ложным, или псевдомицелием. Почкование присуще и некоторым мицелиальным грибам. Грибы, способные наряду с мицелием образовывать почкующиеся клетки, называются диморфными. Они представлены преимущественно возбудителями глубоких и подкожных микозов (*Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, Crysosporium parvum var. crescens, Sporothrix schenckii*).

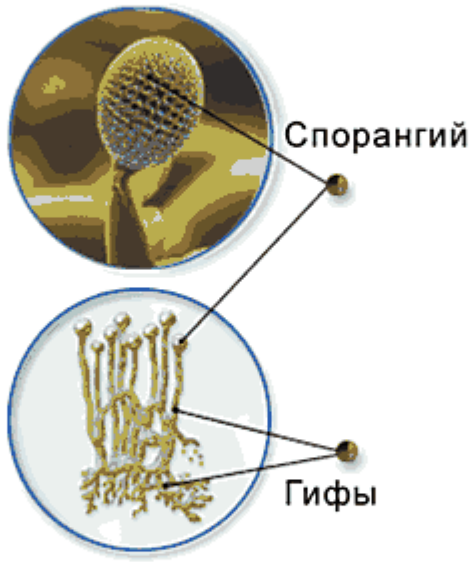

Рис. 8.1. Мицелиальное строение грибов

Грибы размножаются как половым, так и бесполым (вегетативным) способом. Последнее осуществляется с помощью простого митоза. Основные способы размножения:

- путем фрагментации гиф мицелия грибов, в результате чего образуются артроспоры; если они образуют толстостенную оболочку, то называются хламидоспорами, высокоустойчивы к действию неблагоприятных факторов внешней среды;
- путем почкования, в результате чего образуются бластоспоры;
- с помощью бесполых спор, которые у одних грибов образуются в специальных вместилищах (спорангиях) и называются спорангио-

спорами (эндоспоры), у других они образуются открыто на специализированных гифах — конидиеносцах и называются экзоспорами или конидиями.

Число, форма и размер конидий имеют особую организацию. Некоторые виды способны образовывать различные типы конидий — одноклеточные (микроконидии), либо многоклеточные (макроконидии). Бесполые структуры грибов называются анаморфами, а половые — телеоморфами. Последние наиболее значимы для систематики грибов. Половые стадии обнаружены у совершенных грибов, принадлежащих к классам *Ascomycetes* и *Basidiomycetes*, а также у немногочисленных представителей класса *Zygomycetes*. Процесс созревания половых спор у этих грибов происходит в специальных структурах:

- аскоспор — в асках (сумка);
- базидиоспор — на (в) плодовых телах.

Классификация грибов до настоящего времени остается несовершенной и незавершенной. Ранее грибы считали организмами, ближе всех стоящими к растениям, и классифицировали как низшие растения. Основные таксоны, включающие группы грибов, назывались отделами. Большинство грибов, имеющих медицинское значение, относили к формальному отделу *Fungi imperfecti*. При обнаружении половой стадии развития этих грибов их относили к одному из отделов совершенных грибов (*Ascomycota* или *Basidiomycota*).

Достижения последних лет в области молекулярной генетики показали, что «родственные связи» между грибами установить крайне сложно. Царство *Mycota* объединяет две группы организмов: грибоподобные протоктисты и истинные грибы. Первая группа представлена следующими отделами: *Myxomycota, Plasmadiophoromycota, Labyrinthulomycota, Oomycota, Hyphochytriomycota, Chytridiomycota*. Вторая группа представлена отделами: *Zygomycota, Ascomycota* и *Basidiomycota*, а также «несовершенными грибами». К этой группе относятся большинство патогенных и условно-патогенных грибов. Внутри отделов грибы, согласно классификации, разделены на классы, порядки, семейства. Грибы относятся к порядку *Actinomycetales*, семейству *Actinomycetaceae*. Отдел *Zygomycota* включает лишь единичных возбудителей микозов (мукороза и энтомофтороза). Представители отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota* являются возбудителями микозов, относящихся к III и IV группам патогенности. Ряд представителей диморфных грибов, например, *Coccidioides immitis*, относятся ко II группе патогенности, так как они способны вызывать системные заболевания человека. Такой же уровень биологической опасности имеют некоторые возбудители феогифомикоза

(Cladophialophora bantiana), способные поражать мозговую ткань даже у людей с нормальной иммунной системой.

Работа с культурами этих грибов требует специальных условий и особой осторожности персонала микробиологических лабораторий.

В отечественной практике используется классификация микозов, предложенная в 1976 г. Н.Д. Шеклаковым, основанная на патогенных свойствах возбудителя, клинических формах и эпидемиологии заболевания.

1. Поверхностные микозы, или кератомикозы. Возбудители этих заболеваний поражают лишь поверхностный слой кожи и кутикулу волос, без воспалительных проявлений. К этой форме заболеваний относятся разноцветный лишай, белая и черная пьедра.

2. Эпидермомикозы, или дерматомикозы. При этих формах заболевания поражаются глубокий слой кожи, ее придатки (волосы, ногти), слизистые оболочки. Эти микозы вызываются грибами дерматофитами, способными к колонизации кератинсодержащих слоев кожи (*Trichophyton spp., Microsporum spp., Epidermatophyton floccosum*), а также плесневыми и дрожжевыми грибами рода *Candida*, способными поражать кожу и слизистые оболочки.

3. Подкожные, или субкутанные, микозы. Поражают глубокие слои кожи, мышцы, фасции, кости. Такие клинические формы вызываются возбудителями споротрихоза, хромомикоза, феогифомикоза, мицетомы.

4. Системные, или глубокие (висцеральные), микозы, вызванные патогенными (преимущественно эндемичными) грибами — возбудителями кокцидиоидоза, паракокцидиоидоза, бластомикоза, криптококкоза, гистоплазмоза; вызванные условно-патогенными (оппортунистическими грибами рода *Candida* и плесневыми грибами).

8.2. МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ МИКОЗОВ

Основными в этиологической лабораторной диагностике микозов до настоящего времени продолжают оставаться классические методы, включающие микроскопию материала, выделение чистой культуры возбудителя с последующей его идентификацией. Иммунологические методы диагностики имеют вспомогательное значение. Они используются для выявления наиболее значимых возбудителей: патогенных диморфных грибов, а также возбудителей криптококкоза, кандидоза и аспергиллеза. Методы геноиндикации (полимеразная цепная реакция) также имеют ограниченное применение ввиду их недостаточной

специфичности, но применяются преимущественно при диагностике глубоких и оппортунистических микозов.

Материалом для исследования при лабораторной диагностике микозов в зависимости от формы заболевания могут быть: кожа и ее придатки (волосы, ногти), отделяемое ран и свищей, мокрота, кровь, ликвор и моча, тканевые биоптаты. Правильностью взятия патологического материала во многом определяется эффективность дальнейшего лабораторного исследования. При кожных поражениях материал отбирается чаще всего методом соскобов или с использованием липкой ленты (преимущественно при поверхностных формах) до лечения из свежих, но полностью развившихся очагов по периферии, где находятся наиболее жизнеспособные возбудители.

При выявлении грибов-дерматофитов чрезвычайно информативным материалом являются волосы, поскольку характер поражения волос позволяет идентифицировать возбудителя. Определению очага поражения в ряде случаев помогает использование лампы Вуда. Пораженные волосы вместе с чешуйками извлекаются эпиляционным пинцетом. При хронической черноточечной трихофитии волосы извлекают из кожи препарировальной иглой.

Ногти отбирают на протяжении всех слоев, срезая острым скальпелем или ножницами. Более эффективен отбор с использованием зубного бура. При кандидозных поражениях материал отбирается с помощью соскоба с ногтевого валика. Отобранный материал доставляется в лабораторию в пакетах из темной бумаги, чтобы избежать высыхания и контаминации посторонней микрофлорой. Материал, содержащий гной, доставляется в стерильных бакпечатках или чашках Петри. Мокрота отбирается в стерильную посуду. Исследование мокроты должно быть проведено не позднее 2 ч после сбора. При удлинении сроков исследования образцы должны храниться в холодильнике при + 4 °С, в противном случае могут возникнуть диагностические ошибки, связанные с появлением псевдомицелиальных форм дрожжевых клеток.

Кровь и спинномозговая жидкость отбираются с соблюдением правил асептики. Посев крови осуществляется в жидкую среду Сабуро. Для исключения контаминации образцов крови проводят их повторные исследования. Спинномозговую жидкость центрифугируют, а осадок используют для микроскопирования и посева.

Моча отбирается утром в стерильную посуду, при этом необходимо избегать загрязнения материала микрофлорой кожи промежности. Посев мочи осуществляется с использованием количественных методов посева.

В диагностике микозов используются препараты как из нативного материала, так и окрашенные. При исследовании неокрашенных препаратов плотный материал предварительно просветляют (мацерируют) 10—30% раствором КОН (можно использовать растворы диметилсульфоксида), а затем микроскопируют по методу «раздавленной капли». Для придания контрастности препараты прокрашивают водным раствором метиленового синего.

Окраску фиксированных мазков осуществляют различными способами: по Граму, метиленовым синим, по Романовскому — Гимзе. Последний способ позволяет увидеть мелкие дрожжевые клетки и стадии фагоцитоза. Для криптококков используют окраску тушью, окраску с муцикармином по Саутгейту. Меланинсодержащие грибы (темноокрашенные), например *Cladophialophora bantiana*, окрашивают по Массои — Фонтана (окраска меланина, входящего в состав клеточной стенки). Флюоресцирующие сыворотки используются при диагностике возбудителей глубоких микозов, возбудителей дерматофитии, грибов рода *Candida*.

Выделение чистой культуры возбудителя дает возможность установить родовую и видовую принадлежность гриба, изучить его свойства и чувствительность к антимикробным препаратам. Для выделения и идентификации грибов используют плотные и жидкие питательные среды Сабуро, сусло-агар. Эти среды обеспечивают рост большинства патогенных и условно-патогенных грибов. Кроме того среда Сабуро (рис. 8.2) стимулирует процессы пигментообразования у грибов, что имеет значение при идентификации.

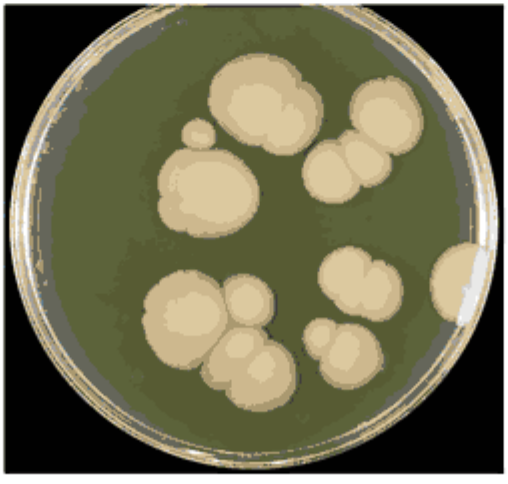

Рис. 8.2. Грибы на среде Сабуро

Для подавления роста бактерий-контаминантов в среды добавляют антибиотики: левомицетин, стрептомицин, пенициллин, тетрациклин. Для выделения прихотливых патогенных грибов используют среды, обогащенные кровью и сердечно-мозговым экстрактом. Специальные среды используют для культивирования и идентификации грибов: среда Чапека — для формирования конидий при идентификации плесневых грибов, картофельный (картофельно-морковный) агар, рисовый агар — для выявления типов роста и получения хламидоспор при идентификации грибов рода *Candida*, морковный (овощной) агар — для получения типичных колоний культуры гриба *Trichophyton schönleini*, среда Кашкина — для выделения пигментообразующих грибов. Используются и дифференциально-диагностические среды, например, для идентификации *C. albicans* — хромогенные среды или среды, позволяющая определить фосфолипазную активность гриба.

Время инкубации грибов составляет от нескольких суток до 1 месяца и более. При подозрении на патогенные диморфные грибы для выдачи отрицательного ответа культивирование проводится в течение 8 недель.

Посевы проводят на среды, разлитые по пробиркам, флаконам и чашкам Петри. Посевы материала на грибы-дерматофиты осуществляют одновременно на несколько пробирок со средой. Материалы, подозрительные на содержание плесневых грибов (мокрота), засевают в 3 точки и инкубируют при 28 и 37 °С. Для решения вопроса об отсутствии контаминации при заборе материала осуществляют контрольные посевы воздуха на содержание плесневых грибов в помещениях лаборатории и палатах, где находятся больные.

При культивировании грибов в микологической лаборатории соблюдаются меры безопасности, аналогичные таковым в бактериологических лабораториях. Работу с плесневыми грибами и микотоксинами во избежание аллергизации персонал проводит в боксированных помещениях в марлевых повязках или в настольных боксах с вытяжкой. Работа с культурами, относящимися ко II группе патогенности (патогенные диморфные грибы), возможна только в специализированных лабораториях.

Идентификация видов грибов проводится на основании комплекса культуральных, морфологических и других признаков. К первым относятся морфология колонии, ее окраска и размеры при культивировании на специальных средах, строение края и центра, характер поверхности, наличие и характер репродуктивных органов, ко вторым — особенности микроскопического строения мицелия, строение, форма

и размеры репродуктивных органов — конидиеносцев, конидий, хламидоспор, артроспор и т.д.

Грибы формируют различные типы колоний на плотных питательных средах. Ученые из института Г. Вентера (США), учитывая способность грибов выделять в среду пигментные вещества, создали в питательной среде «новогоднюю елку» (рис. 8.3).



Рис. 8.3. «Новогодняя елка» из грибов
(верхушка: *Talaromyces stipitatus*; дерево *Aspergillus nidulans*; украшения: *Penicillium marneffei*; пенек: *Aspergillus terreus*)

Ферментативные и ассимиляционные способности культур имеют большое значение при идентификации дрожжей (дрожжеподобных грибов). В настоящее время для идентификации часто встречающихся грибов — возбудителей заболеваний человека и животных — применяются коммерческие тест-системы: BBL Mycotube, API 20C bio Merieux и др.

8.3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНТИМИКОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Особенностью антимикотических препаратов является их высокая токсичность по сравнению с антибактериальными. Это связано со схожестью строения эукариотической грибной клетки с клетками организма человека.

Видовая идентификация возбудителя заболевания и знание спектра действия терапевтического препарата позволяют проводить этиотропную терапию без побочного токсичного действия. Для определения чувствительности грибов к антифунгальным препаратам используется диско-диффузионный метод, хотя он крайне неточен. Для получения более информативных результатов используется метод серийных разведений. Необходимость в этом методе исследования возникает при лечении рецидивирующих и глубоких форм кандидоза, неэффективности лечения микозов препаратами из группы азолов, например, у ВИЧ-инфицированных.

К противогрибковым препаратам (антимикотикам) относятся природные и синтетические лекарственные вещества, избирательно действующие на возбудителей микозов (табл. 8.1).

Таблица 8.1

Классификация лекарственных средств, применяемых для лечения микозов

Основные группы антимикотиков	Номенклатура антимикотиков
1. Полиеновые антибиотики	Амфотерицин В, амфоглюкамин, натамицин, нистатин, леворин, микогептин
2. Азолы	Бифоназол, изоконазол, итраконазол (орунгал), клотримазол (канестен), миконазол (дактарин), кетоконазол (низорал), оксиконазол, флуконазол (дифлюкан)
3. Аллиламины	Тербинафин (ламизил), нафтифин
4. Прочие антимикотики	Препараты ундециленовой кислоты, гризеофульвин, нитрофунгин, декамин, ко-тримоксазол, йодид калия, аморолфин, циклопироксоламин, пентамидин
5. Антисептики, обладающие антигрибковой активностью	Кислоты (салициловая, бензойная, борная), раствор йода, метиленовый синий, бриллиантовый зеленый

Большинство антимикотиков (азолы, аллиламины, аморолфин, циклопироксоламин) нарушают синтез эргостерола, входящего в со-

став цитоплазматической и митохондриальной мембран грибковых клеток. Полиеновые антибиотики повреждают внешние оболочки грибковых клеток за счет непосредственного связывания с эргостеролом. Под действием названных выше антимикотиков в клеточных мембранах грибов появляются довольно крупные каналы, через которые происходит утечка ионов и низкомолекулярных метаболитов, что ведет к нарушениям осмотического давления, обмена веществ и гибели клетки. Гризеофульвин нарушает синтез ДНК, а ко-тримоксазол — синтез фолиевой кислоты в цитоплазме возбудителей.

Антимикотики этой группы (амфотерицин В, амфоглюкамин, натамицин, нистатин, леворин и микогептин) были разработаны и внедрены в клиническую практику в начале 1950-х гг. Они обладают преимущественно фунгицидным типом действия и относятся к природным антимикотикам (продуцентами их служат различные виды актиномицетов). Среди антигрибковых препаратов полиены имеют самый широкий спектр активности. К ним чувствительны грибы родов *Blastomyces, Candida, Coccidioides, Cryptococcus, Histoplasma, Mucor, Paracoccidioides, Rhizopus и Sporothrix*, а также некоторые простейшие (амебы, трихомонады, лейшмании, трипаносомы). Активность полиенов в отношении плесневых грибов (дерматофиты, аспергиллы и др.) значительно ниже.

Амфотерицин В, амфоглюкамин и микогептин подавляют рост большинства возбудителей глубоких микозов (бластомикоз, кокцидиоидоз, криптококкоз, гистоплазмоз и др.). Препараты довольно токсичны, поэтому применять их следует с осторожностью. Резистентность к ним развивается медленно, но является перекрестной ко всей группе полиенов.

Нистатин, леворин и натамицин используют в основном для лечения кандидозов (кольпиты, вульвовагиниты, поражения желудочно-кишечного тракта и др.). Эти препараты обычно хорошо переносятся больными и имеют минимум побочных реакций. В настоящее время нистатин и леворин применяются относительно редко, что связано с внедрением в клиническую практику новых эффективных противогрибковых средств.

Новую эру в антигрибковой терапии открыли азолы, впервые внедренные в клиническую практику в начале 1970-х гг. Эти синтетические препараты отличаются более высокой избирательностью действия, чем полиеновые антибиотики, и поэтому обладают меньшей токсичностью. Азолы характеризуются широким спектром противогрибкового действия (*Aspergillus spp., Blastomyces spp., Candida spp.,*

Coccidioides spp., Cryptococcus spp., Epidermophyton spp., Fusarium spp., Histoplasma spp., Malassezia spp., Microsporum spp., Paracoccidioides spp., Sporothrix spp., Trichophyton spp.). Их разделяют на производные имидазола (миконазол, кетоконазол, клотримазол, эконазол) и появившиеся относительно недавно производные триазола (флуконазол, итраконазол, тетраконазол и др.). Существует также деление азолов на препараты для местного (бифоназол, изоконазол, кетоконазол, клотримазол, миконазол, оксиконазол, эконазол) и системного (итраконазол, флуконазол) применения. Благодаря улучшенной фармакокинетике и хорошей переносимости азолы вытеснили из широкой клинической практики большинство других антигрибковых препаратов.

Основными показаниями к назначению азолов являются аспергиллезы, кандидозы, дерматомикозы, споротрихоз, разноцветный лишай, отомикоз, себорейный дерматит, эритразма, глубокие микозы (кокцидиоидоз, криптококкоз, бластомикозы, гистоплазмоз). В связи с наличием преимущественно фунгистатического эффекта препараты этой группы назначают обычно в течение длительного времени (4—6 и более недель). Азолы (миконазол, эконазол и др.), обладающие активностью в отношении грамположительных бактерий (стафило- и стрептококки, коринебактерии и др.), используют для лечения смешанных грибково-бактериальных инфекций («пеленочный» дерматит и прочие).

Аллиламины относятся к синтетическим препаратам и представлены двумя лекарственными формами (тербинафин и нафтифин). Механизм их действия основан на накоплении в цитоплазме клеток фунгицидных продуктов (сквален) и нарушении синтеза клеточных мембран. Они активны в отношении возбудителей дерматомикозов и дрожжеподобных грибов, хорошо переносятся больными и почти не вызывают побочных эффектов. Тербинафин (ламизил) назначают местно и перорально, нафтифин — только местно. Основными показаниями к назначению аллиламинов являются трихофития, микроспория, эпидермофития, фавус, стригущий и отрубевидный лишай, хромобластомикоз, кандидоз кожи и др.

К прочим относятся препараты ундециленовой кислоты, гризеофульвин, нитрофунгин, декамин, ко-тримоксазол, йодид калия, аморолфин, циклопироксоламин, пентамидин.

Производные ундециленовой кислоты (цинкундан, ундецин, дустундан, микосептин) обладают умеренной фунгистатической активностью и применяются преимущественно для местной терапии эпидермофитий.

Гризеофульвин, впервые полученный в 1946 г., продуцируется грибом рода *Penicillium* и относится к антимикотикам узкого спектра действия. Он активен преимущественно в отношении возбудителей дерматомикозов (трихофития, микроспория, эпидермофития, фавус). Противогрибковое действие препарата связано с подавлением репликации ДНК и угнетением клеточного деления.

Декамин относится к категории поверхностно-активных веществ, нарушающих проницаемость цитоплазматических мембран грибковых клеток. Этот антимикотик, в зависимости от концентрации в воспалительном очаге, обладает фунгистатическим и фунгицидным эффектом. Его применяют для лечения кандидозов (молочница, поражения кожи и ногтей) и эпидермофитии стоп.

Ко-тримоксазол (комбинация триметоприма с сульфаметаксазолом) является ингибитором системы фолиевой кислоты и с успехом применяется для лечения вызываемого бластомицетами пневмоцистоза. В качестве альтернативы этому препарату используют пентамидин, механизм действия которого заключается в повреждении системы репродукции пневмоцист.

Циклопироксоламин (батрафен) — высокоэффективный и малотоксичный синтетический препарат для местного применения. Обладает бактерицидным типом действия в отношении плесневых и дрожжеподобных грибов, умеренной активностью против грамположительных (стафило- и стрептококки) и грамотрицательных (кишечная палочка, гарднерелла) бактерий, внутриклеточных патогенов (хламидии, микоплазмы) и простейших (трихомонады). Быстро проникает в пораженные участки, повреждая жизненно важные клеточные структуры грибов (цитоплазматическую мембрану, митохондрии, рибосомы и др.). Циклопироксоламин назначают для лечения дерматомикозов, онихомикозов и кандидозных вульвовагинитов.

Нитрофунгин применяют местно в виде спиртового раствора для лечения эпидермофитии, трихофитии и кандидоза кожи при отсутствии более эффективных средств. Йодид калия используют в основном для лечения споротрихоза. Аморолфин в виде лака для ногтей назначают для профилактики и лечения онихомикоза.

Для местного лечения нетяжелых форм микозов применяют антисептические препараты, обладающие неспецифическим действием на грибы (салициловая, бензойная и борная кислоты, раствор йода, метиленовый синий, бриллиантовый зеленый и др.).

Патогенные грибы, как и клетки млекопитающих, являются эукариотами, поэтому многие противогрибковые средства довольно ток-

сичны. Например, полиеновые антибиотики характеризуются нефротоксичностью, а азолы нарушают стероидный обмен в организме и обладают гепатотоксичностью. В связи с этим большое значение имеет поиск новых антифунгальных препаратов, мишенью действия которых должны быть специфичные только для грибов структуры (хитин, маннан-глюкановый комплекс и др.). Наиболее перспективным направлением является разработка лекарственных средств, которые являются ингибиторами синтеза клеточной стенки грибов. В настоящее время интенсивно изучаются природные и полусинтетические липопептиды и липосахариды, направленные на подавление синтеза хитинов (никкомицины и полиоксин), глюканов (пневмокандины, эхинокандины, папулокандины, малюнокандины) и других компонентов клеточной стенки грибов (прадимицин).

Учебно-методические материалы

Практическое занятие на тему «Методы диагностики микозов».

Вопросы и задания для предварительного изучения

1. Перечислите основные особенности грибов как возбудителей микозов.
2. Каковы правила отбора проб для микологического исследования?
3. Как классифицировать антимикотики?

Глава 9

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОСТЕЙШИХ. ГЕЛЬМИНТЫ

9.1. ПАРАЗИТОЛОГИЯ КАК НАУКА

Наука, изучающая паразитов и вызываемые ими заболевания, называется медицинской паразитологией. Организмы, живущие за счет других организмов, называются паразитами. Паразитология делится на протозоологию (наука о простейших), гельминтологию (наука о гельминтах) и арахноэнтомологию (наука о членистоногих, вредящих здоровью человека).

Из простейших известны тысячи видов, из которых несколько десятков видов могут паразитировать у человека. Они проникают в различные органы и ткани человека и вызывают заболевания. Так, в кишечнике человека паразитируют лямблии и амебы, во внутренних органах — токсоплазмы, плазмодии. Очень распространены патогенные виды простейших. Так малярией (возбудители — плазмодии) ежегодно болеют свыше 100 млн человек, в основном в странах Юго-Восточной Азии, Африки и Латинской Америки. В РФ зарегистрированы единичные случаи.

Отечественные ученые, среди которых можно назвать Е.Н. Павловского, В.Я. Данилевского, Д.Л. Романовского, Е.И. Марциновского, В.А. Догеля, Э.И. Коренберга, внесли большой вклад в развитие протозоологии.

Основным методом лабораторной диагностики заболеваний, вызванных простейшими, является микроскопическое исследование патологического материала (приготовление как нативных препаратов «толстая капля», так и мазков, окрашенных по методу Романовского — Гимзе). Реже применяют серологический и аллергологический методы диагностики.

9.2. ПРОСТЕЙШИЕ (ТИП PROTOZOA)

Тело простейших состоит из цитоплазмы, ядра, различных органелл. Простейшие передвигаются с помощью жгутиков, подвижной мембраны и ресничек. Пищей одноклеточным служат органические частицы, в том числе и живые микроорганизмы.

Для простейших характерна способность к инцистированию. Она заключается в том, что простейшие округляются и покрываются плотной оболочкой. Циста более устойчива к воздействию неблагоприятных условий внешней среды. При попадании в благоприятные условия простейшие выходят из цисты и начинают размножаться. Размножение происходит бесполым (поперечное, продольное деление) и половым путем. Простейшие, которые обитают в организме человека, относятся к 4 классам: класс Жгутиконосцы, класс Саркодовые, класс Споровики и класс Ресничные. Классы соответственно подразделяются на отряды, семейства, роды.

Жгутиконосцы. Основное отличие простейших этого класса — наличие на одной из стадий развития жгутика — одного или нескольких. Наиболее патогенное значение имеют трипаносомы, лямблии, лейшмании, трихомонады.

Трипаносомы — для животных патогенны все виды. У человека вызывают трипаносомоз. Это заболевание встречается в Центральной и Восточной Африке. Переносчиком является муха цеце. Клинические проявления: инкубационный период — 2—3 недели. На месте укуса мухи цеце образуется изъязвляющаяся папула (трипаносомидный шанкр). Иногда клинические проявления отсутствуют, но паразит размножается в месте проникновения и диссеминирует по лимфатической системе в кровоток. Через 2—3 недели у больного развивается характерная симптоматика заболевания: болезненная лимфоденопатия, кожная сыпь, головная боль. Возможны психические расстройства. Болезнь может прогрессировать с поражением мозга и миокарда.

Лечение. В начальной стадии заболевания назначают сурамин, пентадион. Профилактика: прием лекарственных препаратов, уничтожение мест выплода мух цеце.

Лямблии особенно часто обнаруживаются у детей. Возбудители распространены повсеместно. Основной механизм заражения — фекально-оральный, через грязные руки, пищу и воду. Развитие заболевания зависит от вирулентности возбудителя, инфекционной дозы. Попадание 10 цист в организм вызывает заболевание (лямблиоз). В организме лямблии размножаются в верхних отделах тонкого кишечни-

ка. В сутки человек может выделять с испражнениями от 10 до 15 млрд цист. В большом количестве лямблии вызывают механическое раздражение слизистой кишечника. Клинические проявления могут быть самые разнообразные: диарея, снижение аппетита, боли в животе, потеря массы тела, бледность кожных покровов.

Обнаружить возбудителя можно в фекалиях путем микроскопирования.

При лечении лямблиоза используют фуразолидон, хинакрина гидрохлорид. Профилактика — соблюдение правил личной гигиены.

Трихомонады. Возбудители этого семейства представлены несколькими видами: *T. hominis* обитает в толстом кишечнике, *T. elongata* выделяют из ротовой полости, *T. vaginalis* вызывает воспаление мочеполовой системы, передается половым путем. Это заболевание (трихомоноз) распространено повсеместно. Ежегодно в России заболевают около 5 млн человек. У женщин *T. vaginalis* вызывает острый или подострый вагинит. Для трихомоноза характерно: зуд и жжение во влагалище, боли при половых актах, серозно-гнойные выделения. У мужчин обычно поражаются мочеиспускательный канал и предстательная железа. У мужчин клинические проявления трихомоноза имеют стертые формы. Это связано с удалением большого количества трихомонад при мочеиспускании, что приводит в большинстве случаев к развитию хронического простатита.

Лабораторная диагностика трихомоноза проводится с помощью микроскопирования (рис. 9.1). Для лечения этого заболевания назначают химиопрепарат — метронидазол.



Рис. 9.1. Трихомонада под микроскопом

Саркодовые. В этот класс включены обитатели морей, водоемов и почвы. Они относятся к примитивным простейшим, которых называют амебами. Многие виды амеб обитают внутри организма животных. Для человека патогенным является вид *Entamoeba histolytica*, который вызывает амебную дизентерию. Основной хозяин этого возбудителя — человек. Дизентерийная амеба существует в виде вегетативной формы и цисты. Обычно они обитают в верхнем отделе толстого кишечника. При амебной дизентерии отмечаются боли внизу живота, частый жидкий стул цвета мясных помоев. Температура тела обычно нормальная. Заболевание может тянуться с периодическими обострениями несколько лет. Амебы из кишечных язв с кровью могут заноситься в печень, легкие, мозг и другие органы, вызывая там абсцессы.

Амебную дизентерию диагностируют по наличию *E. histolytica* в испражнениях. Подвижность вегетативных форм выявляют в нативных препаратах, а при выявлении цист проводят окраску раствором Люголя.

Для лечения амебной дизентерии используют химиопрепарат — метронидазол.

Споровики. В этот класс включены паразитические виды простейших. В процессе своего развития имеют стадию так называемой споры, которая образуется в результате слияния половой мужской и женской клетки. Из представителей этого класса для человека патогенное значение имеют плазмодии и токсоплазмы.

Плазмодии вызывают у человека малярию — повсеместно распространенное заболевание. В РФ зарегистрированы спорадические случаи заболевания. Отмечают смертельные исходы этого заболевания, особенно среди детей. Переносчиками малярии являются комары, заражение может также произойти при переливании крови или гемотерапии.

Инкубационный период варьирует от 10 до 14 дней. Для малярии типичны приступ лихорадки, анемия, нарушение кровообращения. Начало болезни острое. Температура поднимается до 40 °С и выше, озноб сменяется сильным жаром. Через несколько часов температура резко падает до 35 °С. После приступа больной чувствует сильную слабость и нередко засыпает. Число приступов достигает 10—15, затем они прекращаются, хотя паразиты в крови еще могут присутствовать в течение некоторого времени. Клинически малярию можно заподозрить на основании характерных приступов, которые повторяются через день или два дня. Печень обычно увеличена, гиперемирована, при

хронических поражениях ее масса достигает 3—5 кг. Достоверный диагноз малярии можно поставить при микроскопическом исследовании крови больного.

Лечение малярии: используют химиопрепарат — хингамин, который активен в отношении всех видов плазмодий.

Профилактика малярии сводится к разрыву биоценоза плазмодий — комар — человек. Это достигается путем уничтожения возбудителя в организме человека и ликвидацией мест выплода комаров рода *Anopheles*.

Токсоплазмы — простейшие, поражающие птиц, животных и человека. У человека вызывают токсоплазмоз — паразитарную инфекцию, характеризующуюся хроническим течением, поражением нервной системы, увеличением печени и селезенки. *Toxoplasma gondii* — внутриклеточный паразит, который попадает в организм следующим образом:

1) через рот — с плохо проваренным мясом, сырыми молочными продуктами и птичьими яйцами;

2) через кожу или слизистые оболочки — при разделке туш и мяса;

3) внутриутробно — от матери плоду через плаценту.

Таким образом, токсоплазмоз может быть врожденным и приобретенным.

Для выделения возбудителя токсоплазмоза используют пунктаты и биоптаты органов (мазки, гистологические срезы), СМЖ, экссудаты, кровь, костный мозг и др. Окрашивают препараты по способу Романовскому — Гимзе.

Можно заразить белых мышей, хомячков. Широко используют серологические реакции — реакция Сабина — Фельдмана, НМФА, РСК.

Метод выявления гиперчувствительности состоит в использовании внутрикожной пробы с токсоплазмином (тест Френкеля).

Клиническая картина токсоплазмоза: повышенная температура, увеличиваются лимфатические узлы, поражаются внутренние органы — глаза, мозг, на коже появляется сыпь. Поставить достоверный диагноз нельзя, так как для этого заболевания отсутствуют типичные симптомы. При подозрении на токсоплазмоз исследуют кровь, спинномозговую жидкость (ликвор). Достоверным способом обнаружения токсоплазм являются микроскопирование, биологическая проба и серологическая диагностика.

Для лечения токсоплазмоза используют сульфаниламидные препараты в сочетании с пириметамином.

хронических поражениях ее масса достигает 3—5 кг. Достоверный диагноз малярии можно поставить при микроскопическом исследовании крови больного.

Лечение малярии: используют химиопрепарат — хингамин, который активен в отношении всех видов плазмодий.

Профилактика малярии сводится к разрыву биоценоза плазмодий — комар — человек. Это достигается путем уничтожения возбудителя в организме человека и ликвидацией мест выплода комаров рода *Anopheles*.

Токсоплазмы — простейшие, поражающие птиц, животных и человека. У человека вызывают токсоплазмоз — паразитарную инфекцию, характеризующуюся хроническим течением, поражением нервной системы, увеличением печени и селезенки. *Toxoplasma gondii* — внутриклеточный паразит, который попадает в организм следующим образом:

1) через рот — с плохо проваренным мясом, сырыми молочными продуктами и птичьими яйцами;

2) через кожу или слизистые оболочки — при разделке туш и мяса;

3) внутриутробно — от матери плоду через плаценту.

Таким образом, токсоплазмоз может быть врожденным и приобретенным.

Для выделения возбудителя токсоплазмоза используют пунктаты и биоптаты органов (мазки, гистологические срезы), СМЖ, экссудаты, кровь, костный мозг и др. Окрашивают препараты по способу Романовскому — Гимзе.

Можно заразить белых мышей, хомячков. Широко используют серологические реакции — реакция Сабина — Фельдмана, НМФА, РСК.

Метод выявления гиперчувствительности состоит в использовании внутрикожной пробы с токсоплазмином (тест Френкеля).

Клиническая картина токсоплазмоза: повышенная температура, увеличиваются лимфатические узлы, поражаются внутренние органы — глаза, мозг, на коже появляется сыпь. Поставить достоверный диагноз нельзя, так как для этого заболевания отсутствуют типичные симптомы. При подозрении на токсоплазмоз исследуют кровь, спинномозговую жидкость (ликвор). Достоверным способом обнаружения токсоплазм являются микроскопирование, биологическая проба и серологическая диагностика.

Для лечения токсоплазмоза используют сульфаниламидные препараты в сочетании с пириметамином.

хронических поражениях ее масса достигает 3—5 кг. Достоверный диагноз малярии можно поставить при микроскопическом исследовании крови больного.

Лечение малярии: используют химиопрепарат — хингамин, который активен в отношении всех видов плазмодий.

Профилактика малярии сводится к разрыву биоценоза плазмодий — комар — человек. Это достигается путем уничтожения возбудителя в организме человека и ликвидацией мест выплода комаров рода *Anopheles*.

Токсоплазмы — простейшие, поражающие птиц, животных и человека. У человека вызывают токсоплазмоз — паразитарную инфекцию, характеризующуюся хроническим течением, поражением нервной системы, увеличением печени и селезенки. *Toxoplasma gondii* — внутриклеточный паразит, который попадает в организм следующим образом:

1) через рот — с плохо проваренным мясом, сырыми молочными продуктами и птичьими яйцами;

2) через кожу или слизистые оболочки — при разделке туш и мяса;

3) внутриутробно — от матери плоду через плаценту.

Таким образом, токсоплазмоз может быть врожденным и приобретенным.

Для выделения возбудителя токсоплазмоза используют пунктаты и биоптаты органов (мазки, гистологические срезы), СМЖ, экссудаты, кровь, костный мозг и др. Окрашивают препараты по способу Романовскому — Гимзе.

Можно заразить белых мышей, хомячков. Широко используют серологические реакции — реакция Сабина — Фельдмана, НМФА, РСК.

Метод выявления гиперчувствительности состоит в использовании внутрикожной пробы с токсоплазмином (тест Френкеля).

Клиническая картина токсоплазмоза: повышенная температура, увеличиваются лимфатические узлы, поражаются внутренние органы — глаза, мозг, на коже появляется сыпь. Поставить достоверный диагноз нельзя, так как для этого заболевания отсутствуют типичные симптомы. При подозрении на токсоплазмоз исследуют кровь, спинномозговую жидкость (ликвор). Достоверным способом обнаружения токсоплазм являются микроскопирование, биологическая проба и серологическая диагностика.

Для лечения токсоплазмоза используют сульфаниламидные препараты в сочетании с пириметамином.

Глава 10

КЛАССИФИКАЦИЯ И СТРУКТУРА ВИРУСОВ. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСОВ

10.1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСОВ

Вирусы — мельчайшие неклеточные биологические объекты, обширная группа уникальных микроорганизмов, расположенных на границе жизни, отличительными признаками которых являются обязательный паразитизм на генетическом аппарате живых клеток (растений, бактерий, насекомых, животных) и наличие в геноме нуклеиновой кислоты только одного типа. Вирусами поражены все формы жизни: от растений и бактерий до человека. Способность вирусов вносить новую информацию в генетический аппарат клетки-хозяина определяет их роль важнейшего фактора изменчивости и биологической эволюции всего живого. Наконец, с вирусами связывают возникновение опухолей, атеросклероза, диабета, разнообразных нервно-психических заболеваний и другой инфекционной патологии.

В последние десятилетия на фоне существенного снижения эпидемических бактериальных инфекций резко возрос удельный вес вирусных инфекционных заболеваний человека (до 80% всей инфекционной заболеваемости). Грипп, аденовирусные инфекции, вирусные гепатиты и другие инфекции вирусной природы продолжают наносить большой ущерб здоровью общества, экономике. Есть немало особо опасных вирусов, которые оцениваются западными стратегами как весьма эффективное средство ведения биологической войны.

Вирусы — автономные генетические структуры, способные функционировать и репродуцироваться в восприимчивых к ним клетках (растений, бактерий, грибов, простейших, животных и человека), используя их генетический и белоксинтезирующий аппарат.

Основоположником вирусологии является российский ученый петербуржец Дмитрий Иосифович Ивановский (1864—1920), открывший на рубеже XIX и XX вв. уникальный мир вирусов (рис. 10.1). Еще будучи студентом, во время каникул он приступил к изучению мозаичной болезни табака, которая наносила колоссальный экономический ущерб табакопроизводству. Пропуская через бактериальные фильтры Шамберлана сок из пораженных листьев, он установил, что данную болезнь вызывает мельчайший микроорганизм, который проходит через фильтр и способен вызывать заболевание при искусственном заражении. В своей диссертации (1888) он описал это заразное заболевание табака и указал, что возбудитель имеет корпускулярную природу, гораздо мельче бактерий, невидимый в обычном световом микроскопе. В 1892 году Д.И. Ивановский опубликовал материалы своих опытов, поэтому возникновение вирусологии ведет свой отсчет с данного времени.

Наука вирусология имеет свой самостоятельный объект изучения — вирусы, которые рассматриваются как своеобразная форма живой материи, форма жизни на Земле. Вирусы интересны для исследования тем, что они поражают все живое на планете, легко преодолевают межвидовые барьеры и распространяют генетическую информацию между различными видами живых организмов, что играет огромную роль в адаптации живых организмов к постоянно меняющимся условиям существования.

Существует несколько гипотез происхождения вирусов.

1. Вирусы — потомки доклеточных форм жизни. Данная гипотеза основана на многообразии способов хранения генетической информации у вирусов. Различают 7 типов строения ДНК и 5 типов строения РНК вирусов. Природа как бы отрабатывала на модели вирусов различные способы записи и сохранения генетической информации, отобрав для других живых структур наиболее надежную, двунитевую ДНК.



Рис. 10.1. Д.И. Ивановский

2. Вирусы являются результатом регрессивной эволюции одноклеточных организмов в процессе углубления паразитизма. Потомки внутриклеточных паразитировавших бактерий постепенно теряли те или иные атрибуты клетки, которые были не нужны при нахождении внутри клетки-хозяина.

3. Вирусы произошли от определенных клеточных генов, которые приобрели способность покидать клетку, но сохранили способность относительно легко в нее возвращаться. Этой гипотезой, в частности, объясняется слабость и несвоевременность иммунного ответа организма человека на внедрение многих вирусов.

Вирусы — это форма жизни, которой присущи своеобразные атрибуты:

- способность к самовоспроизведению;
- способность передавать потомкам основные свойства — наследственность (отмечается консерватизм наследственности у возбудителя оспы и, наоборот, большая изменчивость у возбудителя гриппа и вирусов иммунодефицита человека);
- генетическая изменчивость; мутации генов вируса гриппа А происходят в миллион раз быстрее, чем в клетках, в которых они паразитируют; быстрому изменению подвержены поверхностные структуры вируса — гемагглютинины и нейраминидаза; иммунная система человека не успевает за этими изменениями, вот почему даже при наличии массы противогриппозных вакцин управлять данной инфекцией человек еще не научился; процесс изменчивости поверхностных структур ВИЧ в 100—1000 раз более быстрый, чем вируса гриппа, поэтому создание надежных вакцин против «чумы XXI в.» еще более сложная задача;
- адаптация к определенной экологической нише, к определенному хозяину (растения, бактерии, грибы, простейшие, насекомые, земноводные, теплокровные животные и человек); отдельные группы вирусов циркулируют со сменой хозяев, это полигостальные вирусы (вирусы, «рожденные» членистоногими — арбовирусы); они размножаются в организме насекомых и животных; другие вирусы относятся к моногостальным и имеют узкий круг хозяев (бактериофаги);
- способность вызывать инфекцию, размножаться в клетке хозяина (проникает внутрь чувствительной клетки одна вирусная частица, а выходит из нее 100—1000 новых вирусных частиц); вирусы чаще вызывают персистентные инфекции (носительство), реже заболевания с гибелью хозяина;
- функционирование вирусного генома по общим законам генетического кода.

Несмотря на то что вирусы относятся к представителям живого, их нельзя назвать организмами. Вирусы имеют ряд принципиальных отличий от других живых систем:

- малые размеры;
- очень простое строение вириона — геном, состоящий из ДНК или РНК и капсид (белковая оболочка);
- отсутствие клеточного строения (нет цитоплазмы, клеточных мембран, рибосом);
- наличие у вириона только одного вида нуклеиновых кислот — ДНК или РНК, по этому принципу вирусы разделены на два подцарства;
- отсутствие способности к росту и бинарному делению;
- вирусы имеют паразитизм на молекулярном (генетическом) уровне, в клетку проникает только геном вируса и полностью подчиняет ее своим интересам;
- способность к интеграции собственного генома с геномом клетки;
- вирусы не могут существовать без клетки хозяина, так как репродукция возможна только в клетке хозяина.

10.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

Вопросами классификации занимается Международный Комитет по таксономии вирусов (МКТВ). Современная классификация универсальна для всех вирусов, известных науке (растений, насекомых, животных, человека).

В основу ее положены следующие основные критерии.

1. Тип нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), ее структура.
2. Наличие суперкапсидной оболочки.
3. Размер и морфология вириона, тип его симметрии, число капсомеров.
4. Особенности репродукции (в ядре, цитоплазме клетки).
5. Феномены генетических взаимодействий.
6. Антигенные свойства.
7. Круг восприимчивых хозяев.
8. Способ передачи вируса.
9. Патогенность.
10. Географическое распространение и др.

Классификация вирусов является незавершенной, продолжается работа по ее совершенствованию. На основании перечисленных признаков вирусы делят на семейства, подсемейства, роды, виды (некото-

рые вирусы) и типы (серовары). Известно 54 семейства, из них 20 семейств включают вирусы, имеющие медицинское значение.

Для упорядочения названий вирусов принят ряд правил. Название семейств оканчивается на viridae, подсемейств — virinae, рода — virus. Прежние видовые названия, в связи с тем что они исторически устоялись, также сохранены.

В качестве примера следует привести классификацию вируса гриппа.

Семейство *Orthomyxoviridae*.

1. Род *Influenzavirus* A, B — виды: вирусы гриппа А и В.

2. Род *Influenzavirus* C — вид: вирус гриппа С.

У вируса гриппа А есть подвиды: вирусы гриппа А человека, животных и птиц. У вируса гриппа человека имеются сероварианты: H1 N1, H2 N2, H3 N2. У серовариантa H1 N1 — подсероварианты: H1 N1, H0 N1, Hsw1 N1.

Ниже приведены краткие характеристики основных семейств вирусов.

Семейство *Parvoviridae*.

Название происходит от лат. parvus — маленький. Самые мелкие вирусы, размеры лежат в пределах 20 нм. Семейство включает:

род *Parvovirus* — могут вызвать поражение клеток красного костного мозга человека и теплокровных животных;

род *Dependovirus* — аденоассоциированные вирусы, размножаются только в присутствии аденовирусов, так как сами дефектны; вызывают: ОРЗ, бронхиты, конъюнктивиты, энтероколиты;

род *Densovirus* — включает только вирусы насекомых.

Семейство *Papovaviridae*.

Название происходит от двух слов «папиллома» и «полиома». Род *Papillomavirus* — вирусы бородавок человека. Род *Polyomavirus* вызывают опухоли у животных.

Семейство *Adenoviridae*.

Впервые были выделены из ткани удаленных аденоидов (отсюда и название семейства). Аденовирусы разделены на два рода:

род *Mastadenovirus* включает 1—49-й типы аденовирусов человека;

род *Aviadenovirus* — аденовирусы птиц.

Семейство *Iridoviridae*.

Вирусы радужности насекомых. Для человека патогенен вирус африканской лихорадки свиней.

Семейство *Herpesviridae*.

Вирусы герпеса (от греч. herpes — ползучая), более 70 представителей, поражают человека, обезьян, многие виды животных, грызунов,

птиц, земноводных, 8 вирусов данного семейства патогенны для человека.

1. Подсемейство *Alnhaherpesvirinae* включает три рода. 1-й род — вирусы герпеса человека 1-го и 2-го типов. ВГЧ (вирус герпеса человека) 1-го типа вызывает герпес на губах, коже лица. ВГЧ 2-го типа — половой герпес. Персистирует в спинных ганглиях и дает соответствующие рецидивы. ВГЧ 1-го типа также может вызывать половой герпес при орально-генитальных контактах.

В состав ВГЧ 3-го типа входят вирусы ветряной оспы, опоясывающего лишая (варицелла). У взрослых вызывают межреберную невралгию, межреберный опоясывающий лишай (*Zoster*). Персистирует пожизненно в грудном отделе спинного мозга.

До 90% людей являются носителями ВГЧ 1—3-го типов, но далеко не у всех в течение жизни могут быть клинические проявления. Роды 2-й, 3-й включают вирусы герпесов животных.

2. Подсемейство *Betaherpesvirinae* включает 2 рода. Род цитомегаловирус человека (ВГЧ 4) состоит из 2 сероваринтов. Названы они по морфологическим изменениям в поражаемых клетках. Вызывают цитомегалию — заболевание, при котором в моче, слюне, тканях появляются характерные гигантские клетки. Вирус персистирует пожизненно. При тяжелых операциях, стрессах, физических нагрузках он активируется и вызывает иммунодефицитные состояния. Род 2 — вирусы животных.

3. Подсемейство *Ganumaherpesvirinae*. Для медицины имеет значение вирус Эпстайна — Барр (ВГЧ 5). Это СПИД-ассоциированные вирусы. У белых людей заболевание протекает легко, в детском возрасте (у детей 2—10 лет) — в виде инфекционного мононуклеоза с выздоровлением; у азиатов возникает злокачественная назокарцинома; у африканцев — лимфома Беркитта (множественное поражение лимфоидной ткани с большой смертностью).

Другой представитель данного подсемейства ВГЧ 6 — В-лимфотропный вирус человека HBLV. У детей это причина внезапной экзантемы и небольшой лихорадочной реакции. У взрослых — яппи-синдром (болезнь менеджеров) — хроническая усталость молодых людей. Разрушаются нейроны головного мозга, что приводит к нарастанию усталости, снижению работоспособности, снижению памяти, распаду интеллекта и личности.

Семейство *Poxviridae*

Название происходит от англ. pox — язвы, пустула. Семейство состоит из двух подсемейств.

1. Подсемейство *Chordopoxvirinae* — вирусы оспы позвоночных — включает 6 родов:

1) *Orthopoxvirus* — истинные вирусы оспы (вирус натуральной оспы, осповакцины, оспы животных),
2) *Parapoxvirus* — вирусы оспы животных,
3) *Avipoxvirus* — вирусы оспы птиц,
4) *Capripoxvirus* — вирусы оспы овец,
5) *Leporipoxvirus* — вирусы фибромы и миксомы кроликов,
6) *Suipoxvirus* — вирусы оспы свиней.

2. Подсемейство *Entomopoxvirine* — вирусы насекомых.

Семейство *Hepadnaviridae*

Это ДНК-геномные вирусы, поражающие печень. В это семейство входят вирусы гепатита В человека, гепатита пекинской утки, земляного сурка, лесной белки.

Второе подцарство — РНК-вирусы. Включает в себя следующие семейства.

Семейство *Picornaviridae*

Это семейство представлено мельчайшими РНК-геномными вирусами и включает:

1) род *Enterovirus* (место первичной репродукции в кишечнике) включает:

- полиовирусы 1, 2, 3-го типов (сероваринтов), которые вызывают полиомиелит,
- вирусы Коксаки А 1—24,
- вирусы Коксаки В 1—6,
- вирусы ECHO 1—9, 11—27, 29—34 (энтеропатогенные цитопатогенные человеческие вирусы «сиротки»),
- энтеровирусы человека 68—73 (диарею вызывают только 69—70, остальные поражают мышцы, плевру, вызывают бронхопневмонию, но при этом размножаются в кишечнике);

2) род *Hepatovirus*, содержащий вирус гепатита А;

3) род *Rhinovirus*, вызывающий заразный легко протекающий насморк у детей (100 сероваринтов, перекрестного иммунитета нет);

4) род *Cardiovirus* — для человека нет патогенных вирусов;

5) род *Aphtovirus* — возбудитель ящура (может вызывать заболевание и у человека).

Семейство *Caliciviridae*

Название происходит от лат. calex — чашка. Под электронным микроскопом видно чашевидное углубление в центре капсида).

Данное семейство включает вирусы гастроэнтеритов человека и HVE — вирус гепатита Е.

Семейство *Togaviridae*

Название происходит от лат. toga — мантия, накидка. Семейство включает 3 рода.

1. Род *Alphavirus* — 25 арбовирусов (вирусы венесуэльского, восточного и западного энцефаломиелитов лошадей).

2. Род *Rubivirus* — вирус краснухи (не арбовирус, передается воздушно-капельным путем и через плаценту).

3. Род *Pestivirus* — вирус чумы свиней и других млекопитающих.

Семейство *Flaviridae*

Название происходит от лат. flavus — желтый. В семейство входят 27 вирусов, передающихся комарами. Они вызывают желтую лихорадку, другие энцефалиты (японский, Сент-Луис). 12 видов передается клещами (Повассан, Лангат, клещевого энцефалита); у 18 вирусов переносчик не установлен. Сюда же включен и род *Hepacivirus* (вирус гепатита С).

Семейство *Arenaviridae*

Вирусы данного семейства в составе капсида содержат фрагменты клеточных рибосом, имеющих вид песчинок. Род *Arenavirus* — 12 вирусов: вирус ЛХИ вызывает лимфоцитарный хориоменингит; ряд вирусов является возбудителями геморрагических лихорадок (Ласса — африканская, Мачупо — бразильская, Хунин — аргентинская).

Семейство *Coronaviridae*

Включает коронавирусы человека — возбудители ОРЗ, напоминает солнечную корону за счет поверхностных шипов.

Семейство *Retroviridae*

Название происходит от лат. retro — обратный. Вирусы содержат РНК-зависимую ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу).

1. Подсемейство *Oncovirinae* — онковирусы. Роды A, B, C, D — вирусы животных. Для человека патогенны HTLV I, II (серовариванты), вызывают Т-лимфолейкозы с летальным исходом.

2. Подсемейство *Lentivirinae* (медленный) — медленные инфекции: меди, висна, вирусы иммунодефицита животных и человека (ВИЧ I и II).

3. Подсемейство *Spumavirinae* (пенящий) — выделяются после трансплантации, дают характерное ЦПД (вспенивание культур клеток), но роль в патологии человека не выявлена.

Семейство *Bunyaviridae*

Название семейства дано по местечку в Африке. Данное семейство включает более 100 вирусов).

1. Род *Bunyavirus* включает 16 антигенных групп — 145 видов. Сюда входит вирус Hantaann — возбудитель ГЛПС — геморрагической лихорадки с почечным синдромом (актуальна для Дальнего Востока, Крыма). Остальные представители — вирусы членистоногих. Передают кровососы тропической зоны.

2. Род *Flebovirus* — 20 вирусов-возбудителей москитных лихорадок (лихорадка долины Рифт).

3. Род *Nairovirus* — 6 антигенных групп, 26 вирусов, в том числе вирус ККГЛ (Конго-крымской геморрагической лихорадки).

4. Род *Uukuvirus* (местечко в Финляндии) — 7 вирусов вызывают легкую лихорадку у человека, передают комары.

Семейство *Paramyxoviridae*

Вирусы данного семейства находятся рядом с истинными вирусами, поражающими слизистую оболочку.

1. Род *Paramyxovirus* — вирусы парагриппа человека 1—5-го типов и животных.

2. Род *Morbillivirus* — вирусы кори человека и животных (чумка собак).

3. Род *Pneumovirus* — RS-вирусы человека (респираторно синцитиальный, образуют синцитий — многоядерные структуры, вызывают ОРЗ).

Семейство *Rhabdoviridae*

Название происходит от греч. *rhabdos* — прут. Семейство включает:

1) род *Vesiculovirus* — ВВС (вирус везикулярного стоматита);

2) род *Lissavirus* — вызывает бешенство у животных и человека.

Семейство *Reoviridae*

У вирусов данного семейства нет суперкапсида, размеры от 80 до 100 нм. Семейство включает:

1) род *Reovirus* — реовирусы человека 1, 2, 3-го типов (сероваринтов), респираторные энтеропатогенные вирусы-сиротки;

2) род *Rotavirus* (от слова «колесо») — вирусы человека и животных. Вызывают гастроэнтериты, диареи у детей, подростков, молодых солдат;

3) род *Orbivirus* — орбивирусы, 10 антигенных групп, 75 вирусов (вирусы лихорадки Кемерово и Колорадской лихорадки).

Семейство *Filoviridae*

Это нитевидные вирусы. Сюда входят вирусы Марбург-лихорадки и лихорадки Эбола.

10.3. МОРФОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ВИРУСОВ

Размеры вирусов определяются косвенно на микрофотографиях, микрофильтрацией либо ультрацентрифугированием. Вирус, находящийся внутри клетки, называется вирионом.

Фотографирование осуществляется в электронном микроскопе (рис. 10.2). Но вирусы прозрачны для электронов, поэтому препараты для микроскопии готовят специальным способом. Создают подложку из чистого углерода либо коллодия, на нее наносят вирионы в испаряющейся жидкости и проводят лиофильную сушку. Методом напыления на материал на подложке под углом наносят тяжелые металлы (палладий, уран). Другим способом контрастирования является метод реплик — вируссодержащий материал, очищенный от балластных белков, заливают тонким слоем пластмассы. После высыхания образуется рельефная матрица, которую просматривают в электронном микроскопе. Негативное контрастирование можно осуществить путем помещения материала на подложку и добавлением нейтрального раствора фосфовольфрамовой кислоты или урацилацетита, затекающего во все углубления вириона и создающего для электронов непроницаемый фон, на котором видны детали строения вирусных частиц.

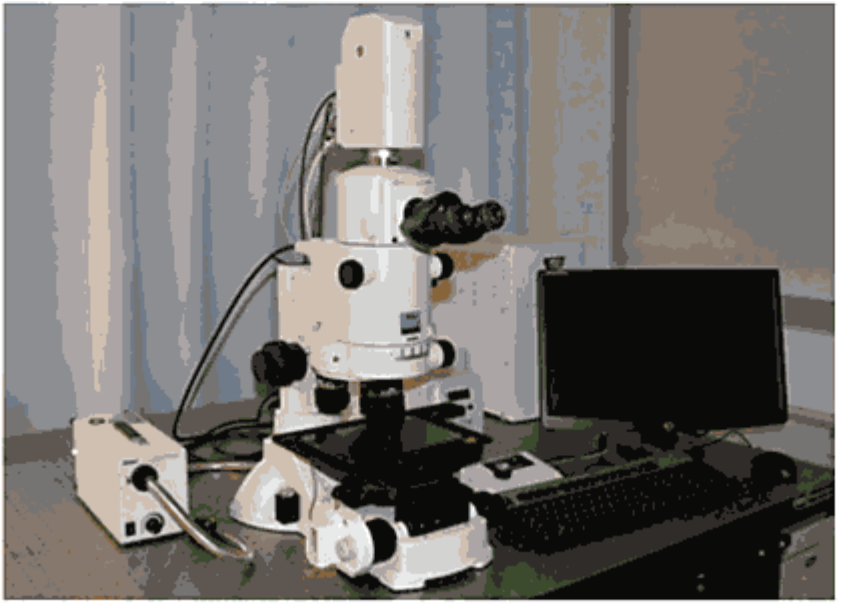

Рис. 10.2. Вид электронного микроскопа

Масса вирионов определяется косвенно при ультрацентрифугировании в единицах Сведберга.

Размеры вирусов колеблются от 20 нм у самых мелких до 350—400 нм (у вирусов семейства *Poxviridae*). 1 нм равен 10^{-9} метра. Колебания размеров вирусов измеряют на микрофотографиях.

Размеры частиц можно определять при их фильтрации через заведомо известные диаметры фильтров. Крупные вирионы можно видеть и в световой микроскоп в виде мелких точек (тельца Пашена при натуральной оспе).

Морфология вирусов учитывается при их классификации. Основной компонент вириона — белковая оболочка (капсид), содержащая внутри нуклеиновую кислоту. Капсиды построены из белковых субъединиц (капсомеров). Каждый капсомер — молекула белка с определенной молекулярной массой одного вида или разных видов белков. У вируса табачной мозаики 2130 одинаковых капсомеров. Капсид включает пространство сог, у многих вирусов помимо нуклеиновой кислоты есть еще специальные ферменты. Состав белков и ферментов может быть различным: у вируса герпеса — 32 белка, есть вирусы всего с 1—2 ферментами. Ферменты играют важную роль в репродукции вирусов.

По структуре вирионов выделяют простые и сложноустроенные вирионы (рис. 10.3).

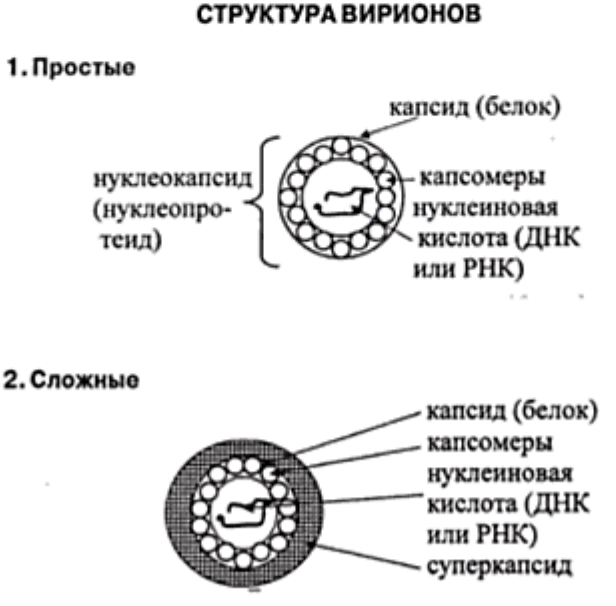

Рис. 10.3. Структура вирионов

Тип симметрии определяется только нуклеокапсидом, суперкапсид при этом не учитывают. Например, вирус гриппа снаружи выглядит как сфера, нуклеокапсид имеет спиральный тип симметрии.

Икосаэдр — многогранник, он состоит из 12 вершин и 20 ребер. К данному типу симметрии относятся аденовирусы человека и животных. Капсомеры могут иметь разное строение и содержать разные белки. У аденовирусов боковые капсомеры в виде гексонов, а вершинные — пентонов (соседствуют с пятью капсомерами). От пентамеров отходят выросты (фибры), это прикрепительные белки. Икосаэдр обеспечивает прочность капсида (защита от внешних факторов), прочная связь между капсомерами обеспечивает минимум свободной энергии.

Многие вирусы имеют суперкапсид — дополнительную оболочку сложно устроенных вирусов, или пеплос. Структурные элементы суперкапсида — шипики, или пепломеры. У вируса гриппа их 2 типа: гемагглютинины и нейраминидаза; у парагриппа два комплекса — гемагглютинин и нейраминидаза вместе и второй так называемый белок слияния; у вирусов иммунодефицита человека они представлены гликопротеидами (GP 120). Большинство вирусов, патогенных для человека, — сложно устроенные. Если у вируса нет суперкапсида, это просто устроенные вирусы.

У большинства сложноустроенных вирусов суперкапсид — это модифицированная (путем встраивания белков вируса) цитоплазматическая мембрана клеток хозяина. Модификация идет путем встраивания шипиков вируса в участки цитоплазматической мембраны (ЦПМ). Исключением являются поксвирусы, у них суперкапсид вирусоспецифический, так как имеются собственные гены, ответственные за синтез суперкапсида. Если культивировать один и тот же вирус в разных клетках, получим разные по биохимическому составу суперкапсиды. Шипы выполняют роль прикрепительных белков на поверхности чувствительных клеток. Если их удалить жирорастворителем или детергентом, вирус полностью теряет инфекционную активность.

Биохимия вирусов также хорошо изучена. В состав вириона входят белки — 70—80%; нуклеиновые кислоты — 4—6% (РНК), 20—30% — ДНК-вирусы; липиды и углеводы в незначительных количествах.

Вирусные белки — полипептиды, которые состоят из обычных левовращающих аминокислот, отличаются лишь последовательностью. Принцип субъединичности построения капсида — полипептиды небольшой величины и повторяющиеся. Это позволяет экономить генетический материал. Если бы капсид был построен из разных белков, требовался бы огромный геном. У вируса табачной мозаики масса кап-

сида 37,2.106 дальтон, а для кодирования этого капсида вирусом используется всего 600 нуклеотидов. Весь геном вируса составляет около 6000 нуклеотидов. Некоторые гены вирусов способны кодировать несколько белков со сдвигом рамки. Например, у вируса гриппа 8 генов, а кодируют 10 вирусных белков.

Капсид за счет упорядоченности капсомеров по сравнению с простой пептидной цепью обладает меньшей свободной энергией. На уровне вирусов действует принцип саморегуляции — самосборка капсида. Принцип самосборки вирусных белков заключается в том, что при определенных условиях (pH, температура) наблюдается спонтанная сборка вирусных белков близких капсидов. При добавлении вирусных нуклеиновых кислот этот процесс упорядочивается.

В отличие от обычных у вирусных белков изменена чувствительность к протеазам. Белки вирусов несут защитную функцию, в том числе от нуклеаз, ультрафиолетового и ионизирующего излучений. Белки обладают высокой, но не абсолютной устойчивостью, поскольку при репродукции необходимо «раздевание» вируса (освобождение генома). При этом изменяется чувствительность белков к протеазам. При проникновении в чувствительную клетку белки изменяются и легко гидролизуются протеазами. Вирусы проникают внутрь клетки за счет фагоцитоза вирусных частиц — виропексиса либо слиянием с клеточной мембраной.

Вирусные белки подразделяются на структурные и неструктурные. Структурные белки составляют суперкапсид, в составе сердцевины — геномные белки. Неструктурные белки не входят в состав вирусных частиц и обнаруживаются только в зараженной клетке в процессе репродукции. Это ферменты, осуществляющие функции регуляторов, и белки-регуляторы. Аминокислотная последовательность белков вирусов иная, чем у человека, поэтому их можно определять внутри клетки.

Синтез вирусных белков на рибосомах клеток идет по общим законам и регулируется иРНК, которая образуется на матричных вирусных нуклеиновых кислотах. Белки вирусов выполняют следующие функции.

1. Защитная — экранирование нуклеиновой кислоты вируса от химических факторов, нуклеаз и т.д., благодаря этому вирусы существуют тысячи лет.

2. Адресная функция — проникновение только в нужную чувствительную клетку, а не в любую.

3. Регулирующие функции. Их выполняют внутриклеточные белки вирусов, ферменты, ферментные комплексы.

Вирусные нуклеиновые кислоты имеют существенные отличия от нуклеиновых кислот всех других существ. Обычно генетическая информация закодирована в двуспиральной ДНК и имеется однонитевая РНК (информационная, транспортная, рибосомальная). У вирусов в качестве геномной может быть как ДНК, так и РНК. У некоторых вирусов (РНК-геномных) вирионная РНК одновременно может выполнять роль информационной. Такие вирусы называют +нитевые. Если выделить в чистом виде такую РНК и поместить в клетку, то инфекция будет протекать так же, как если бы туда проник целый вирус. У других вирусов, нитевых, РНК не может выполнять функцию информационной.

Вирусы отличает многообразная структура нуклеиновых кислот. Их можно получить, разрушив вирус химическими (фенолом) или физическими (ультразвуком) факторами. Выделяют ДНК-содержащие вирусы, у которых она может присутствовать в виде: классической двунитевой (аденовирусы, герпесвирусы); двунитевой линейной с замкнутыми концами (оспа); двунитевой линейной с разрывами одной цепи (Т-фаги); с несколькими разрывами одной нити (каждый фрагмент — уникальный ген); двунитевой, замкнутой в кольцо со сверхвитками, (суперспирализация) или без них (тогавирусы); двунитевой, у которой внешняя нить замкнута в кольцо (L-нить), а у внутренней $^1/_3$ отсутствует (S-нить, шорт), — гепаднавирусы; уникальной линейной однонитевой ДНК (парвовирусы); однонитевой замкнутой в кольцо (фаги).

РНК-содержащие вирусы также имеют несколько типов: классическая однонитевая линейная (пикорновирусы, тоговирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы); линейная однонитевая фрагментированная (ортомиксовирусы); однонитевая фрагментированная, но каждый фрагмент замкнут в кольцо (буньявирусы); две нити, идентичные друг другу, (ретровирусы), говорят о диплоидности этих вирусов; двунитевая фрагментированная (реовирусы).

По химическому составу вирусные РНК и ДНК сходны с клеточными. В их составе те же нуклеотиды, но отличаются метилированным урацилом.

Липиды имеют сложно устроенные вирусы, их наличие характерно для патогенных вирусов. Данный признак используется при классификации. Содержание липидов вариабельно — от 1,5 до 54% (тогавирусы). Липидный состав вирусов не постоянен, у большинства это липиды клеточного происхождения. Липиды содержатся в суперкапсиде и зависят от клетки хозяина. По липидному составу различные

чувствительные клетки при помещении в них одного и того же вируса останутся разными, тогда как одинаковые клетки при включении в них разных вирусов сохранят идентичность. Липиды играют важную роль: защитная функция укрепляет белковый скелет суперкапсида. Они содержатся в виде липопротеидного или гликопротеидного комплекса. У поксвирусов синтезируются собственные липиды под контролем самого вируса, и поэтому состав липидов у них постоянен.

Углеводы входят в суперкапсид сложно устроенных вирусов преимущественно в составе различных шипиков в виде моносахаридов, аминосахаридов (2—3 цепочки в комплексе с белковым или липидным компонентом (гликопротеид, гликолипопротеид). У вируса гриппа это гемагглютини и нейраминидаза, у парагриппа — комбинированный шип гемагглютинина и нейраминидазы, у ВИЧ — поверхностные структуры gp 41 и gp 120 — гликопротеиды, у вируса клещевого энцефалита — шипы гемагглютинина.

Количество углеводов может достигать 1—3% и более, они состоят из глюкозы, маннозы, галактозы, нейраминовой кислоты. Углеводный компонент определяется клеткой хозяина, укрепляет суперкапсидную структуру, придает ей жесткость. Удаление гликопротеидных комплексов у сложно устроенных вирусов ведет к потере способности к адсорбции на чувствительных клетках. У просто устроенных вирусов углеводный компонент отсутствует.

В составе вирусов могут быть и другие компоненты: в состав полипептидов часто включаются фосфаты (аденовирусы, ретровирусы, герпесвирусы, поксвирусы, ортомиксовирусы), их конкретная функция пока точно не установлена. У некоторых вирусов есть микроэлементы: медь, молибден. Отдельные вирусы содержат целый набор ферментов: поксвирусы — 10, ВИЧ — 4, у вируса гриппа 3 фермента. Ферменты обеспечивают этапы вирусной репродукции: реакции полимеризации (образования иРНК), репликацию (образование новых нитей нуклеиновых кислот) по принципу комплементарности. В ряде случаев ферменты синтезируются за счет генома вируса. Вирусы также активно используют клеточные ферменты, например, у гриппа гемагглютинин находится в составе шипов в неактивном состоянии и для адсорбции на клеточном эпителии необходима протеолитическая активация гемагглютинана за счет ферментов клеточного секрета. Только после этого достигается соответствие прикрепительного белка со структурами чувствительной клетки.

У ДНК-геномных вирусов есть ДНК-зависимая полимераза, которая обеспечивает синтез иРНК. Ферменты обеспечивают модифи-

кации синтезированной цепочки НК: удлинение цепи, укорочение, «подчищение» или процессинг нуклеиновых кислот — разрезание и удаление из определенных участков 1—2 нуклеотидов, а затем сшивание этого участка лигазой. Ферменты концевого присоединения включают добавочные нуклеотиды. Эндонуклеазы и экзонуклеазы обеспечивают разрезание (деградацию) НК.

Вирусы неспособны к росту и бинарному делению, их размножение тесно связано с клеткой-хозяином. Процесс взаимодействия вирусов с чувствительной клеткой называется репродукцией. Выделяют раннюю и позднюю ее фазы. Ранняя фаза включает:

1) адсорбцию вириона на чувствительной клетке;

2) проникновение в клетку (пенетрация);

3) раздевание вириона.

Начальные процессы адсорбции имеют неспецифический характер, в их основе может лежать электрическое взаимодействие положительно и отрицательно заряженных группировок на поверхности вируса и клетки. На адсорбцию влияет также pH, буферность среды, температура. При 4 °С адсорбция носит синхронный характер, с повышением температуры скорость адсорбции увеличивается, но она приобретает асинхронный характер. Дальнейшее взаимодействие клеточных рецепторов и вирусных прикрепительных белков носит специфический характер.

Вирусы используют рецепторы, предназначенные для проникновения в клетку необходимых для ее жизнедеятельности веществ: гормонов, ферментов, факторов роста, других питательных веществ. Клеточные рецепторы имеют разную химическую природу. Так, для вируса гриппа и парагриппа рецепторами являются структуры, содержащие сиаловую (нейраминовую) кислоту.

Прикрепление вириона к клеточной поверхности. Вначале происходит образование единичной связи прикрепительного белка с рецептором — обратимая адсорбция. В этот момент, изменяя pH среды, воздействуя ультразвуком, антителами, можно удалить вирион с поверхности клетки. Для того чтобы наступила необратимая адсорбция, должны появиться множественные связи между вирионами и клеточными рецепторами. Число молекул клеточных рецепторов, участвующих в адсорбции, может доходить до 3000.

Прикрепительные белки вирусов могут находиться в составе уникальных образований, таких как фибры у аденовирусов, у сложно организованных вирусов эти белки входят в состав шипов на поверхности суперкапсиды, например, у вируса гриппа имеется 300—450 шипов

гемагглютинина. Просто организованные вирусы содержат прикрепительные белки в составе капсида.

Проникновение (пенетрация) вирусов в клетку осуществляется за счет двух механизмов, взаимодополняющих друг друга, — путем виропексиса (эндоцитоза) и путем слияния вирусной и клеточной мембраны.

Термин «виропексис», предложенный в 1948 г. Фазекасом де Сан Гро, означает, что вирион попадает в цитоплазму в результате инвагинации участка плазматической мембраны и образования вакуоли. Виропексис является частным случаем рецепторного эндоцитоза, который является механизмом, обеспечивающим поступление в клетку аминокислот, нуклеотидов, гормонов и других веществ из межклеточной жидкости. Большинство вирусов проникает в клетку путем рецепторного эндоцитоза. Некоторые проникают в клетку за счет механизма слияния. Функцию белка слияния у вируса гриппа выполняет малая гемагглютинирующая субъединица НА2, у вирусов парагриппа белок слияния — fusion protein (англ. fusion — слияние)

Раздевание вируса происходит параллельно с его проникновением. В результате раздевания освобождается внутренний компонент вируса, способный вызвать инфекционный процесс. Раздевание вириона осуществляют ферменты клетки: липазы и протеазы. Оно сопровождается рядом характерных особенностей: вирион теряет инфекционную активность, появляется чувствительность к нуклеазам, возникает устойчивость к нейтрализующему действию антител и др. Раздевание вириона осуществляется постепенно. Так, вирус гриппа вначале теряет липопротеиновую оболочку, на втором этапе удаляется М-белок и освобождается нуклеокапсид.

10.4. БАКТЕРИОФАГИ

Бактериофаг — вирус бактерий, паразитирующий только на живой микробной клетке и являющийся важным генетическим фактором микроорганизмов. Открыт в 1917 г. французским ученым Д´Эррелем. Название происходит от греч. «фагос» — пожиратель. Бактериофаг имеет корпускулярное строение и представляет собой шаровидное тело (головку) с отростком. Вирус покрыт белковой оболочкой. В головке фага заключены ДНК или РНК. Размеры фага колеблются в пределах 45—100 нм (рис. 10.4).

По сравнению с вирусами фаги довольно устойчивы во внешней среде. Они хорошо переносят низкие температуры, но при +70 °С инак-

тивируются. Формалин инактивирует фаги через несколько минут. Также губительно действуют на фаги ультрафиолетовое и ионизирующее излучения, но в малых дозах могут вызвать мутации.

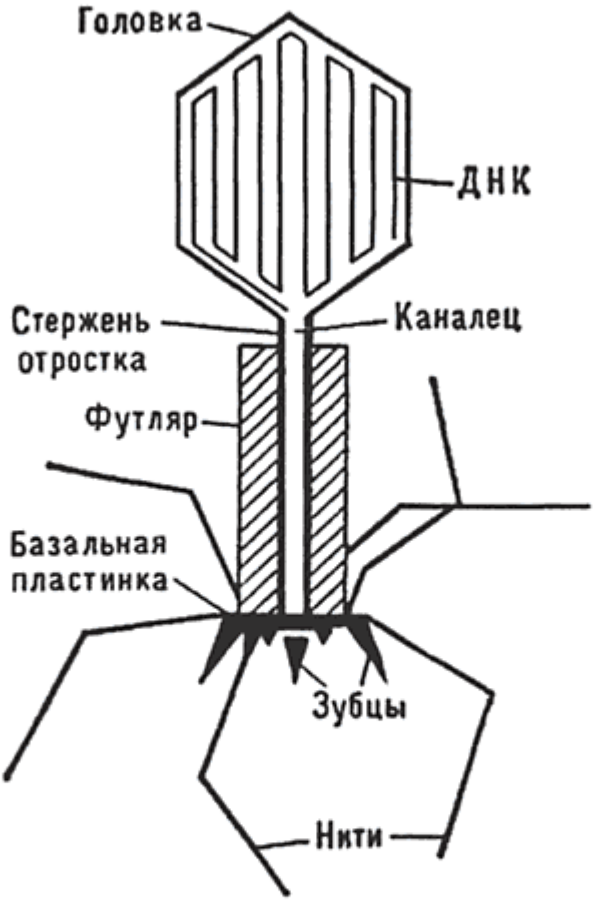

Рис. 10.4. Строение бактериофага

Стадии взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой.

I фаза — адсорбция на клетке при соответствии фаговых рецепторов с рецепторами бактериальной клетки.

II фаза — внедрение фага в клетку. Через канал фага в клетку попадает его нуклеиновая кислота. В отличие от вирусов капсидные белки головки и отростка остаются вне клетки.

III — репликация фаговой РНК или ДНК, синтез фагоспецифических ферментов транскрипции и репликации.

IV — сборка фаговых частиц, которая происходит гораздо быстрее, чем при репродукции других вирусов.

V — выход фагов из клетки происходит по типу взрыва, во время которого зараженные бактерии лизируются.

Существуют вирулентные и умеренные фаги. Вирулентные фаги вызывают инфекцию, заканчивающуюся лизисом бактериальных клеток и синтезом новых фаговых частиц. Умеренные фаги не лизируют зараженные ими клетки. ДНК этих фагов включается в хромосому бактерий и передается при их делении неограниченному числу потомков. Такой тип взаимодействия фага с клеткой называется лизогенией, а бактерии, несущие в геноме фаговую ДНК (профаг), называются лизогенными. Они широко распространены в природе и обнаруживаются в воде, почве, сточных водах, испражнениях больных и других биосубстратах.

Репродукция вирулентного фага в клетках бульонной бактериальной культуры сопровождается их лизисом и просветлением среды. На газоне чувствительных бактерий, выращенных на агаровой среде в чашке Петри, фаги образуют зоны очагового или сплошного лизиса, что зависит от их концентрации. Зоны очагового лизиса получили название негативных колоний фага или стерильных пятен-бляшек. Они имеют морфологию, характерную для определенных фагов и образуются из одной фаговой частицы при внедрении ее и последующей репродукции в клетках микроорганизмов.

Большинство фагов характеризуется видоспецифичностью в отношении бактерий. Однако существуют фаги, способные поражать только отдельные варианты одного и того же вида бактерий. Их используют для определения фаговаров (фаготипов) внутри данного вида.

В практической работе фаги применяют для:

- фаготипирования бактерий, что важно для маркировки исследуемых культур при эпидемиологическом анализе заболеваний;
- дифференцировки бактериальных культур с целью установления их видовой принадлежности;
- фагодиагностики, заключающейся в выделении фага из организма больного (например, из испражнений), что косвенно свидетельствует о наличии в материале соответствующих микроорганизмов.

Фаги, так как они обладают антигенными свойствами, также используют для иммунизации животных с целью получения диагностических антифаговых сывороток. Кроме того в отдельных случаях фаги используют для фаготерапии — лечения инфекционных заболеваний.

10.5. МЕТОДЫ ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Вирусы в отличие от бактерий размножаются лишь в живых клетках. В связи с этим культивирование вирусов может осуществляться на уровне организма подопытного животного (куриный эмбрион как развивающийся организм относят к подопытным животным) или живой клетки, выращиваемой вне организма, т.е. на уровне культуры клеток.

Использование лабораторных животных. Один из методов выделения и культивирования вирусов — заражение лабораторных животных. Их используют для выделения вирусов, не вызывающих развития цитопатических изменений в культурах клеток и не размножающихся в куриных эмбрионах. Применение лабораторных животных позволяет также по клиническому симптомокомплексу идентифицировать характер вирусной инфекции. В качестве лабораторных животных, в зависимости от целей работ и вида исследуемых вирусов, чаще всего применяют белых мышей, хомяков, морских свинок, кроликов. Из более крупных животных используют обезьян различных видов и некоторых других животных. Из птиц используют кур, гусей, уток. В последние годы чаще применяют новорожденных животных (более чувствительных к вирусам), «стерильных животных» (извлекают из матки и содержат в стерильных условиях с использованием стерильного воздуха и стерилизованного корма) и животных чистых линий с известной наследственностью (инбредные или линейные животные).

Животные должны быть в достаточной степени восприимчивы к инфекции данным вирусом и не нести в себе латентной инфекции и каких-либо паразитов. Имеют значение также вид животного, порода, возраст, масса, пол, упитанность, условия содержания. В опыт берут животных одного вида и возраста и содержат их в одинаковых условиях. Иногда используют разные виды животных, обладающих различной чувствительностью к одному и тому же вирусу, что помогает выявить разнообразные формы инфекции.

В эксперимент берут только здоровых животных, лучше из одного питомника и одной партии. Температуру тела измеряют в одно и то же время, так как имеются суточные колебания ее. Исследуемый материал вводят с учетом тропизма вирусов к определенным тканям. Так, для выделения нейтротропных вирусов материал вводят в мозг, для выделения пневмотропных — через нос (под легким эфирным наркозом).

У лабораторных животных после заражения вируссодержащим материалом важно своевременно и правильно взять материал для даль-

нейшего исследования, причем асептически. Результаты выделения вируса считают положительными, если у животного после соответствующего инкубационного периода развиваются симптомы инфекции.

Использование куриных эмбрионов. В тканях эмбриона, его оболочках, желточном мешке способны размножаться многие патогенные вирусы человека и животных. При этом имеет значение избирательность вирусов к той или иной ткани: вирусы группы оспы хорошо репродуцируются и накапливаются в клетках хорион-аллантоисной оболочки, вирус паротита — в амнионе, вирусы гриппа — в амнионе и аллантоисе, вирус бешенства — в желточном мешке.

Культивирование вирусов в развивающихся эмбрионах имеет ряд преимуществ перед другими методами: плотная скорлупа довольно надежно защищает внутреннее содержимое от микробов; при заражении куриных эмбрионов получают больший, чем при других методах культивирования, выход вируссодержащего материала; метод заражения куриных эмбрионов прост и доступен любым вирусологическим лабораториям; эмбрионы обладают достаточной жизнеспособностью и устойчивостью к возбудителям внешних факторов. Однако куриные эмбрионы не всегда свободны от латентных вирусных и бактериальных инфекций. Трудно наблюдать за динамикой патологических изменений, происходящих в эмбрионе после заражения его вирусом. При вскрытии зараженных эмбрионов часто не обнаруживают видимых изменений и выявляют вирус с помощью реакции гемагглютинации и другими методами. В зараженных эмбрионах невозможно проследить за нарастанием титра антител. Метод пригоден не для всех вирусов.

Для вирусологических исследований используют эмбрионы 7—12-дневного возраста, которые получают из птицеводческих хозяйств. Можно выращивать эмбрионы в обычном термостате, на дно которого ставят лотки с водой для увлажнения воздуха. Температура в термостате должна быть 37 °С, а влажность воздуха — 60—65%. Отбирают крупные, чистые (но немытые), оплодотворенные яйца от белых кур, хранившиеся не более 10 суток при температуре 5—10 °С. Оплодотворенные яйца распознают по наличию зародышевого диска, который при просвечивании с помощью овоскопа имеет вид темного пятнышка.

При работе с вирусами могут быть использованы различные методы заражения эмбрионов, но наибольшее практическое применение получили нанесение вируса на хорион-аллантоисную оболочку, введение в аллантоисную, амниотическую полость и желточный мешок

(рис. 10.5). Выбор метода зависит от биологических свойств изучаемого вируса.

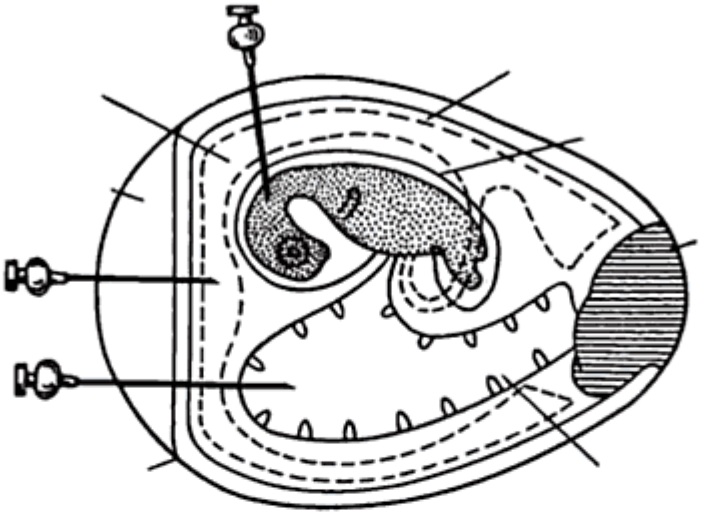

Рис. 10.5. Способы заражения куриного эмбриона

Перед заражением определяют жизнеспособность эмбриона на овоскопе. Живые эмбрионы подвижны, хорошо видна пульсация сосудов оболочек. При овоскопировании отмечают простым карандашом на скорлупе границы воздушного мешка или место расположения эмбриона, которое определяют по его тени на скорлупе.

Куриные эмбрионы заражают в боксе в строго асептических условиях, используя инструменты, стерилизованные кипячением.

При заражении на хорион-аллантоисную оболочку наиболее пригодны 12-дневные эмбрионы. Для заражения в аллантоисную полость используют эмбрионы 10—11-дневного возраста, в амниотическую полость — эмбрионы 7—11-дневного возраста, в желточный мешок — эмбрионы 7-дневного возраста.

Яйца с зараженными эмбрионами устанавливают на подставках тупым концом вверх. Температурный режим и срок инкубации зависят от биологических свойств инокулированного вируса. Ежедневно жизнеспособность эмбрионов контролируют под овоскопом. Эмбрионы, погибшие в первые сутки после заражения вследствие травмы, не исследуют.

Перед сбором материала эмбрионы охлаждают при 4 °С в течение 18—20 ч для сужения сосудов и предотвращения кровотечения

при вскрытии. Эмбрионы вскрывают в боксе с соблюдением правил асептики.

Аллантоисную жидкость насасывают пипеткой, контролируют стерильность путем посева в сахарный или мясо-пептонный бульон, проверяют на наличие вируса в реакции гемагглютинации и хранят при 4 °С в замороженном состоянии.

Для получения амниотической жидкости вначале отсасывают аллантоисную жидкость, затем пинцетом захватывают амниотическую оболочку, слегка приподнимают ее и пастеровской пипеткой отсасывают амниотическую жидкость.

При изучении изменений на хорион-аллантоисной оболочке ее разрезают ножницами и через отверстие выливают все содержимое в чашку Петри. Хорион-аллантоисная оболочка остается внутри скорлупы и ее извлекают пинцетом в чашку Петри с физиологическим раствором. Здесь ее промывают, расправляют и изучают на темном фоне характер очаговых поражений.

Для получения амниотической оболочки амниотический мешок, в который заключен эмбрион, разрезают и освобождают от эмбриона, просматривают на наличие поражений.

Для получения желточной оболочки разрезают хорион-аллантоис, отсасывают аллантоисную и амниотическую жидкости, извлекают пинцетом плод, отделяют его за пупочный канатик, захватывают желточный мешок и помещают в чашку Петри. Контролируют на стерильность, просматривают на наличие поражений. Желток в случае необходимости его извлечения можно отсосать шприцем без выведения наружу желточного мешка.

Наличие вируса в аллантоисной и амниотической жидкостях зараженного эмбриона определяют в реакции гемагглютинации. Жидкости эмбрионов с положительным результатом гемагглютинации после проверки на стерильность соединяют и титруют в развернутой реакции гемагглютинации.

При наличии небольшого количества вируса или невозможности выявить его в исследуемом материале проводят последовательные пассажи на куриных эмбрионах. Если после трех последующих пассажей на эмбрионах в исследуемом материале вирус не обнаруживают, результат считают отрицательным.

Использование культур клеток. Культивирование клеток вне организма требует выполнения ряда условий. Одним из них является строгое соблюдение стерильности при работе, так как используемые питательные среды служат отличным питательным субстратом так-

же для бактерий и грибов. Клетки тканей обладают весьма высокой чувствительностью к солям тяжелых металлов. Поэтому необходимо придавать исключительное значение качеству различных ингредиентов, входящих в состав солевых растворов и питательных сред, а также способам обработки посуды и резиновых пробок, применяемых при культивировании клеток.

Одним из обязательных условий успешной работы с клетками является высокое качество дистиллированной воды (проверяется два раза в неделю). Для работы с клетками используют бидистиллированную или деионизированную воду. Лучшими дистилляторами являются приборы из стекла или легированной стали: из такой аппаратуры не вымываются ионы тяжелых металлов, являющихся токсичными для клеток. Деонизированную воду получают на специальных установках, где очистка воды от солей осуществляется при ее последовательном прохождении через колонки с анионитом и катионитом.

При культивировании клеток особенно большие требования предъявляют к подготовке и стерилизации посуды и пробок. Во многих случаях именно неправильные их мойка и стерилизация служат причиной не прикрепления клеток к стеклу или быстрой дегенерации клеточного монослоя.

Для роста и размножения клеток вне организма необходим сложный комплекс физико-химических факторов: определенная температура, концентрация водородных ионов, неорганические соединения, углеводы, аминокислоты, белки, витамины, кислород и углекислота, поэтому для культивирования вирусов в культурах клеток используют сложные по составу питательные среды. По характеру компонентов, входящих в их состав, эти среды делят на две группы.

1. Среды, представляющие собой смеси солевых растворов (Хенкса, Эрла и др.) и естественных компонентов (сыворотка крови животных и человека, гидролизат альбумина). Количество каждого из этих компонентов в разных прописях сред различно.

2. Синтетические и полусинтетические среды, состоящие из солевых растворов (Эрла, Хенкса и др.) с добавлением аминокислот, витаминов, коэнзимов и нуклеотидов (среды Игла, 199 и др.). В синтетических средах клетки могут существовать в жизнеспособном состоянии непродолжительное время (до 7 дней). Для более длительного поддержания их в жизнеспособном состоянии, а также для создания лучших условий роста и размножения клеток к синтетическим средам добавляют сыворотку крови животных (коров, телят и др.).

Для выделения вирусов могут быть использованы разные методы культивирования клеток вне организма. Однако в настоящее время наибольшее практическое применение получили однослойные культуры первично-трипсинизированных и перевиваемых линий клеток. Однослойные культуры клеток выращивают в стеклянных плоскостенных сосудах-матрацах вместимостью 1 л, 250 и 100 мл или в обычных бактериологических пробирках, обработанных соответствующим способом.

При использовании первично-трипсинизированных культур клеток сущность метода заключается в разрушении межклеточных связей в тканях протеолитическими ферментами и разобщении клеток для выращивания монослоя на поверхности стекла. Источником получения клеток могут служить ткани и органы эмбрионов человека и животных, забитых животных и птиц, а также извлеченные у человека при операции. Используют нормальные и злокачественные перерожденные ткани, эпителиальные, фибробластического типа и смешанные. Способность к размножению клеток, извлеченных из организма, тесно связана со степенью дифференциации ткани. Чем меньше дифференцирована ткань, тем более интенсивной способностью пролиферации обладают ее клетки in vitro. Поэтому клетки эмбриональных и опухолевых тканей значительно легче культивировать вне организма, чем нормальные клетки взрослых животных.

Ежедневно культуры просматривают под малым увеличением микроскопа для определения характера их роста. Если клетки не пролиферируют, выглядят округлыми, зернистыми, темными и отслаиваются от стекла, значит, посуда плохо обработана или токсичны ингредиенты питательной среды.

Наряду с первично-трипсинизированными тканями для культивирования вирусов широко используют культуры перевиваемых клеток, т.е. культуры клеток, способных к размножению вне организма неопределенно длительное время. Наиболее часто применяют культуры клеток, полученные из нормальных и раковых тканей человека. Широкую известность приобрела линия клеток HeLa, полученная из опухоли шейки матки, Нер-2 — из карциномы гортани, КВ — из ткани рака полости рта. Готовят такие культуры клеток и из нормальных тканей животных — почки обезьяны, кролика и эмбриона свиньи (табл. 10.1).

Для пересева перевиваемых клеток питательную среду отсасывают пипеткой и выливают. Сформировавшийся тонкий слой клеток разрушают раствором трипсина, и освобожденные таким образом клетки переносят в новый сосуд со свежим питательным раствором, где вновь образуется монослой клеток.

Индикатором наличия вируса в зараженных культурах клеток могут служить:

а) развитие специфической дегенерации клеток;

б) обнаружение внутриклеточных включений;

в) обнаружение специфического антигена методом иммунофлюоресценции;

г) положительная реакция гемадсорбции;

д) положительная реакция гемагглютинации;

е) образование бляшек.

Таблица 10.1

Перечень наиболее употребляемых культур перевиваемых клеток

Ткань	Название штамма клеток	Ткань	Название штамма клеток
Нормальные:		Злокачественные:	
амнион человека,	—	шейка матки человека,	HeLa
почка человека,	ППЧ	гортань человека,	Нер-2
почка обезьяны,	ППО	полость рта человека,	КВ
сердце обезьяны	СОЦ	костный мозг человека	Д-6
циномольгус,			
почки морской свинки,	ПМС		
почки свиньи,	СПЭВ		
почка сирийского хомяка,	ВНК-21		
почка кролика	РК		

Для выявления специфической дегенерации в зараженных культурах клетки ежедневно просматривают под малым увеличением микроскопа. Многие вирусы при размножении в клетках вызывают их дегенерацию, т.е. оказывают цитопатогенное действие (ЦПД) (рис. 10.6).

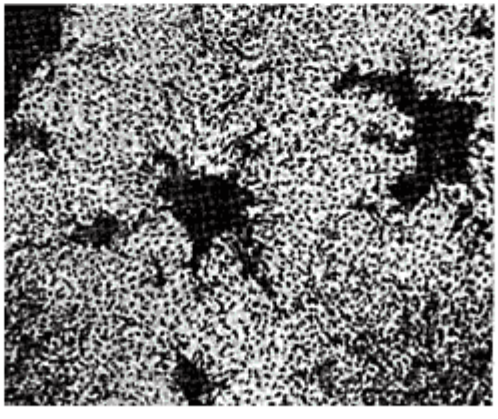

Рис. 10.6. Цитопатогенное действие вируса

Время развития и характер цитопатических изменений в инфицированных культурах клеток определяются свойствами и дозой инокулированного вируса, а также свойствами и условиями культивирования клеток. Одни вирусы вызывают ЦПД в пределах первой недели после заражения (вирусы оспы, полиомиелита, Коксаки В и др.), другие — спустя 1—2 нед. после заражения (аденовирусы, парагриппозные вирусы, ECHO и др.).

Вирусы вызывают цитопатические изменения трех основных типов: образование многоядерных гигантских клеток и симпластов, являющихся результатом слияния цитоплазмы многих клеток; круглоклеточную дегенерацию, возникающую вследствие утраты межклеточных связей и округления клеток; развитие очагов клеточной пролиферации, состоящих из нескольких слоев клеток.

При размножении некоторых вирусов в культурах клеток образуются внутриклеточные включения в цитоплазме или ядре пораженных клеток. Культуры клеток для выявления включений выращивают на стеклянных пластинках в пробирках, заражают вирусом и через определенные сроки инкубации готовят препараты, окрашивая их обычными красителями.

Для выявления специфического антигена в зараженных культурах клеток препараты готовят так же, как для выявления включений, используя МФА.

В основе метода бляшек лежит образование в монослое зараженных вирусом клеток под агаровым покрытием обесцвеченных участков, состоящих из дегенерированных (погибших) клеток. Эти участки, получившие называние бляшек, представляют собой колонии вируса, образующиеся, как правило, из одной вирусной частицы.

При отсутствии цитопатических изменений, внутриклеточных включений, бляшкообразования, отрицательных реакций гемадсорбции и гемагглютинации в культурах клеток, зараженных исследуемым материалом, проводят два последующих пассажа. При отсутствии указанных изменений в конечном пассаже результат выделения вируса считают отрицательным.

Для обнаружения вирусов в инфекционном материале могут быть использованы следующие методы.

Микроскопические:

а) вирусоскопия;

б) обнаружение внутриклеточных включений.

Иммунологические:

а) иммунная электронная микроскопия;

б) иммунофлюоресценция;

в) гемагглютинация;

г) гемадсорбция.

Идентификация вирусов осуществляется с помощью иммунологических методов, включающих следующие реакции:

а) торможения гемагглютинации;

б) задержки гемадсорбции;

в) связывания комплемента;

г) нейтрализации;

д) преципитации в геле агара.

Микроскопические методы. С помощью светового микроскопа могут быть обнаружены только крупные вирусы, размеры которых превышают 150 нм. Распознавание вирусов, имеющих меньшие размеры, возможно лишь в электронном микроскопе. Для выявления крупных вирусов может применяться световая, фазово-контрастная и люминесцентная микроскопия.

При вирусных инфекциях в зараженных клетках развиваются своеобразные включения. Одни инфекции сопровождаются образованием включений в цитоплазме пораженных клеток (бешенство, оспенная вакцина), другие — в цитоплазме и ядре (корь, натуральная и ветряная оспа, аденовирусные заболевания). Включения имеют различную природу, структуру, форму и размеры от 0,25 до 25 мкм. Согласно современным данным, при одних инфекциях включения являются местом размножения вируса и представляют собой его скопления, окруженные веществами клетки, при других — продукт дегенерации клетки.

Включения могут быть выявлены в окрашенных отпечатках органов и тканей, соскобах клеток, гистологических срезах из пораженной ткани и препаратах культур клеток, инфицированных вирусом. Окраску чаще производят по методу Романовского — Гимзы. Для окраски этим методом препараты фиксируют в смеси Дюбоска — Бразиля — Буэна, состоящей из пикриновой кислоты, формалина, спирта, уксусной кислоты. Внутриклеточные включения при большинстве вирусных инфекций являются оксифильными и красятся по методу Романовского — Гимзы в розовый или сиреневый цвет.

Иммунологические методы диагностики вирусных инфекций. В последние годы эти методы стали ведущими в лабораторной диагностике вирусных инфекций. Это во многом объясняется экономическими причинами, поскольку классические методы вирусологического анализа довольно дороги. Кроме того длительность исследований с помощью вирусологических методов (недели), даже если они оказываются вполне эффективными, делают их ретроспективными.

Иммунологические методы используют как для обнаружения вирусных антигенов в различных биосубстратах и объектах внешней среды, так и для серодиагностики — выявления в сыворотках крови больных людей и лабораторных животных антител к вирусным антигенам. Помимо этого иммунологические методы исследования незаменимы при идентификации вирионов.

Взаимодействуя с организмом, вирусы вызывают образование антител, которые, адсорбируясь на вирионах, препятствуют проникновению вирионов в клетки и развитию цитопатического действия (ЦПД); нейтрализуют смертельное действие вирусов при репродукции их в куриных эмбрионах и организме животных; инактивируют вирионные гемагглютинины и нейраминидазы, предотвращая реакцию гемагглютинации (РГА) и реакцию гемадсорбции (РГадс) на пораженных вирусом клетках. Эти вируснейтрализующие антитела вызывают также агглютинацию и преципитацию вирусных частиц, а образующиеся при этом иммунные комплексы связывают комплемент. Поэтому для идентификации вирионов используются классическая реакция нейтрализации (РН) на культурах клеток, куриных эмбрионах и животных и ее модификации: реакция торможения гемагглютинации (РТГА); реакция торможения гемадсорбции (РТГадс). Те же реакции используются в серодиагностике вирусных инфекций для обнаружения в сыворотке больных вируснейтрализующих антител по известному вирусному антигену (диагностикуму).

Метод иммуноэлектронной микроскопии (ИЭМ). Электронная микроскопия в настоящее время играет важную роль в изучении вирусов. Именно данные электронной микроскопии служат основой современной классификации вирусов.

Новый этап в развитии электронно-микроскопического изучения вирусов — применение техники иммуноэлектронной микроскопии. С помощью этого метода стали возможными не только прямое обнаружение вирусов, но и их идентификация, а также быстрое серотипирование вирусных штаммов и титрование антител к ним. Большое значение ИЭМ приобрела для определения локализации вирусных антигенов внутри клеток макроорганизма.

Несомненным преимуществом ИЭМ является ее высокая чувствительность по сравнению с обычными электронно-микроскопическими методами.

При контакте антигена вируса или вирусного компонента с гомологичной антисывороткой формируется комплекс антитело — антиген. Данный феномен является основой методики, употребляемой для обнаружения и идентификации вирусных антигенов или антител

к ним. Именно эти комплексы антигенов с антителами после негативного контрастирования можно наблюдать в электронном микроскопе. В клинической диагностике антигенный материал не требует тщательной очистки. Так, в случае выявления вируса гриппа можно исследовать неочищенную аллантоисную жидкость. В настоящее время считается, что практически любой вид клинического материала пригоден для ИЭМ. В диагностических целях можно применять обычную нефракционированную сыворотку, а также сыворотки реконвалесцентов. Необходимо отметить, что на конечные результаты большое влияние оказывает соотношение количеств антигена и антител. При избытке антигена наблюдают изобилие частиц; агломераты в данном случае будут немногочисленны. При избытке антител вирусные частицы окружены их толстым слоем, выявить мелкие структурные детали вириона практически невозможно; агрегаты также немногочисленны. При оптимальном соотношении количеств антигена и антител агрегаты укрупняются при хорошем изображении деталей вирионов. Из вышеизложенных соображений желательно использовать иммунную сыворотку в нескольких разведениях.

На опорную сетку наносят пленку-подложку, приготовленную из палладия. При использовании низких концентраций палладия и для улучшения адсорбционных свойств подложки ее укрепляют с помощью угля. Для этого на готовую сухую пленку-подложку на электронно-микроскопической сетке напыляют уголь в вакууме. Толщина пленки-подложки и укрепляющего слоя углерода оказывает существенное влияние на контраст и изображение мелких деталей объекта. Конкретную толщину пленок-подложек и слоя угля каждый исследователь определяет индивидуально, исходя из того, что углерод более электронно прозрачен, нежели палладий.

Вирусы и антитела к ним имеют малую электронную плотность. Поэтому биологические объекты невозможно выявлять с помощью электронного микроскопа без предварительной обработки. Для визуализации вирусов используется техника негативного контрастирования (или негативной окраски). Для негативного контрастирования вирусов и комплексов вирус — антитело применяют различные соли тяжелых металлов. Контрастирующие вещества (атомы тяжелых металлов) проникают в гидрофильные участки объектов и замещают в них воду. В результате электронная плотность объекта возрастает, становится возможным его наблюдение в электронном микроскопе.

Прямой метод ИЭМ нашел наибольшее применение в практике. Вирусную суспензию смешивают с неразведенной антисывороткой. После энергичного перемешивая смесь инкубируют в течение 1 ч при

37 °С, затем в течение ночи при 4 °С. На следующий день смесь центрифугируют для осаждения иммунных комплексов. Осадок ресуспендируют в капле дистиллированной воды и подвергают негативному контрастированию.

При оценке результатов ИЭМ продукты взаимодействия между антигеном и антителом в электронном микроскопе могут иметь различный вид (отдельная вирусная частица, покрытая антителами полностью или частично; агломераты вирусных частиц). Агломераты могут занимать различную площадь, иметь различный внешний вид, содержать различное количество частиц. Поэтому наряду с опытными необходимо исследовать контрольные препараты (с буферным раствором или гетерологичной антисывороткой).

Критерий оценки результатов, полученных с помощью ИЭМ, — наличие или отсутствие в препаратах скоплений вирусных частиц, агрегированных иммунной сывороткой. Наличие агломератов антигена и антител специфической антисыворотки — признак положительной реакции. Тем не менее следует учитывать возможность неспецифической агрегации частиц антигена под влиянием высокоскоростного центрифугирования. По этой причине многие авторы рекомендуют учитывать результаты по условной шкале от 0 до 4+. Она основана на оценке степени покрытия агрегированных частиц антителами сыворотки.

Методы гемагглютинации и гемадсорбции. Многие вирусы обладают способностью агглютинировать эритроциты строго определенных видов млекопитающих и птиц. Так, вирусы гриппа и эпидемического паротита агглютинируют эритроциты кур, морских свинок, человека; вирус клещевого энцефалита — эритроциты барана; вирусы японского энцефалита — эритроциты однодневных цыплят и гусей; аденовирусы — эритроциты крыс, мышей, обезьян. В качестве исследуемого материала в реакции гемагглютинации (РГА) используют аллантоисную, амниотическую жидкости, суспензию хорион-аллантоисных оболочек куриных эмбрионов, взвеси и экстракты из культур клеток или органов животных, зараженных вирусами. Реакцию гемагглютинации можно ставить капельным методом на стекле и в развернутом ряду в пробирках или лунках пластин из полистирола. Первый метод является ориентировочным.

Являясь группоспецифической, РГА не дает возможности определить видовую принадлежность вирусов. Их идентифицируют с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Для ее постановки используют заведомо известные иммунные противовирусные сыворотки. К каждому их разведению добавляют равное количество вируссодержащей жидкости. Контролем является взвесь вируса.

Смесь выдерживают в термостате, затем добавляют взвесь эритроцитов. Спустя несколько минут определяют титр вируснейтрализующей сыворотки, т.е. максимальное ее разведение, вызвавшее задержку агглютинации эритроцитов.

В серологической диагностике вирусных болезней РТГА рекомендуется ставить с парными сыворотками, одну из которых получают в начале заболевания, а другую — спустя 1—2 недели и более. Четырехкратное нарастание титра антител во второй сыворотке подтверждает предполагаемый диагноз.

Реакцию гемадсорбции (РГадс) применяют для индикации в зараженных культурах клеток вируса, обладающего гемагглютинирующей активностью. Сущность реакции заключается в том, что на поверхности клеток, зараженных вирусами, адсорбируются эритроциты, чувствительные к гемагглютинирующему действию вирусов. Например, на клетках, зараженных вирусом натуральной оспы, адсорбируются эритроциты кур; вирусом кори — эритроциты обезьян; аденовирусами — обезьян и крыс и др.

Реакция нейтрализации (РН). Репродуцируясь в культурах клеток, вирусы вызывают разного рода ЦПД, выражающееся в округлении, сморщивании, уменьшении или, наоборот, увеличении размеров клеток, слиянии их и образовании симпластов, деструкции цитоплазмы и ядра. Наконец, в монослое клеток, зараженных вирусами, в результате разрушения ими отдельных участков клеточного пласта могут появляться «стерильные пятна», или бляшки, представляющие собой клон вирусной частицы, что дает возможность не только изолировать вирус, но и определить его титр.

Идентифицировать вирус по характеру бляшек очень трудно, и поэтому прибегают к постановке РН выделенного вируса заведомо известными вируснейтрализующими сыворотками. С этой целью полученный от больного вирус накапливают в культуре клеток и различные его разведения смешивают с неразведенной противовирусной сывороткой.

Смесью вирусов и сывороток можно заражать куриные эмбрионы или чувствительных животных. В таких случаях нейтрализующую активность антител чаще всего определяют по нейтрализации вирусных гемагглютининов в жидкостях эмбриона и устранению смертельного действия вируса на эмбрионы и животных. Одновременно вычисляют индекс нейтрализации, выражающий максимальное количество смертельных доз вируса, которое нейтрализуется данной сывороткой, по сравнению с результатами контрольного опыта, принимаемыми за единицу.

Подобным образом с помощью РН идентифицируются вирусы, выделенные из материала больных, при заражении им куриных эмбри-

онов и животных. Для этого к вируснейтрализующим сывороткам прибавляют вируссодержащие жидкости эмбрионов и взвеси пораженных органов животных. После определенного времени инкубации смесями инфицируют культуры клеток, куриные эмбрионы и животных.

В серодиагностике вирусных инфекций определяют динамику нарастания титра вируснейтрализующих антител по известному вирусу. При этом ставят РН с парными сыворотками, взятыми от больных в начале и в конце болезни. Диагностическим явится 4-кратное возрастание титра иммуноглобулинов во второй из них.

РН основана на способности специфических антител достаточно прочно соединяться с вирусной частицей. В результате взаимодействия между вирусом и антителом происходит нейтрализация инфекционной активности вируса вследствие блокады антигенных детерминант, ответственных за соединение вирусной частицы с чувствительными клетками. В результате вирус утрачивает способность размножаться в чувствительной к нему биологической системе in vitro или in vivo.

Результаты РН становятся очевидными после того, как смесь вируса и гомологичных ему антител после определенной по времени экспозиции будет внесена в чувствительную биологическую систему (тканевая культура клеток, куриный эмбрион, организм восприимчивого животного), где вирус может размножаться и вызывать поддающиеся учету изменения, которые будут подавлены частично или полностью в присутствии антител.

В РН участвуют три компонента:

1) вирус;

2) сыворотка, содержащая антитела;

3) биологический объект (лабораторные животные, развивающиеся куриные эмбрионы, тканевые культуры), выбор которого зависит от вида вируса, с которым предполагается проводить исследования.

РН используют либо для идентификации выделенного возбудителя, либо для обнаружения и титрования антител в сыворотках. В первом случае пользуются сыворотками специально иммунизированных лабораторных животных или переболевших людей. Во втором случае используют сыворотки, взятые в начальной стадии болезни и в период реконвалесценции.

Вируснейтрализующие антитела в сыворотках переболевших людей в отличие от антигемагглютининов или комплементсвязывающих антител сохраняются многие годы, а при некоторых вирусных инфекциях (например, при кори) даже пожизненно. Это позволяет в ряде случаев использовать пул сывороток многих реконвалесцентов в качестве референс-препарата, который после разлива в ампулы и лиофи-

лизации пригоден для диагностической работы в течение длительного времени.

При идентификации выделенных возбудителей пользуются заранее приготовленными гипериммунными сыворотками различных животных: кроликов, белых крыс и мышей, морских свинок, обезьян, баранов, лошадей и т.д. Активность гипериммунных сывороток для РН зависит от способа иммунизации животных.

Перед постановкой каждого нейтрализационного опыта вирус предварительно титруют, определяя конечное разведение, вызывающее повреждение культуры ткани либо инфицирование лабораторных животных (или куриных эмбрионов). Титр вируса выражают в 50%-ной дозе (ТКИД50 — 50%-ная инфекционная доза для тканевой культуры).

Молекулярно-генетические методы диагностики в вирусологической практике. Методы молекулярной биологии получили свое развитие еще в 50-е гг. XX столетия. Они стали возможными в связи с тем, что в геноме каждого вируса имеются уникальные видоспецифичные нуклеотидные последовательности, обнаружив которые можно идентифицировать любой инфекционный агент. Наибольшее значение данные методы имеют при выявлении микроорганизмов, которые длительно или трудно культивируются обычными методами. В 1970-е годы для выявления инфекционного возбудителя или мутации использовали ДНК-зондовую детекцию, основанную на гибридизации специфических олигонуклеотидных зондов, меченных радиоактивным изотопом (или флюорохромом) с образцом выделенной ДНК. Гибридизационный анализ использует способность нуклеиновых кислот в определенных условиях образовывать специфические комплексы с нуклеиновыми же кислотами, имеющими комплементарные к ним последовательности. Метод детекции инфекционных возбудителей ДНК-гибридизацией оказался крайне трудоемким, длительным и дорогостоящим. Кроме того его чувствительность оказывается недостаточной при идентификации микроорганизмов в таких клинических материалах, как фекалии и моча.

На смену ДНК-гибридизации пришел метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить и многократно копировать с помощью термофильной ДНК-полимеразы определенный фрагмент ДНК. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — это изящный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить и многократно копировать с помощью термофильной ДНК-полимеразы определенный фрагмент ДНК.

Благодаря своим высоким диагностическим качествам ПЦР является общепризнанным дополнением к традиционным методам, ис-

пользующимся в вирусологии: размножению вируса в культуре клеток, иммунологическому выявлению вирусных антигенов, электронной микроскопии. Существенным преимуществом данного метода является возможность выявлять вирусы при латентных инфекциях (цитомегаловирус, вирус герпеса) и вирусы, которые трудно или пока невозможно культивировать (вирус иммунодефицита человека, вирус Эпстайна — Барр, вирус папилломы человека, вирус гепатита В и др.). С методом ПЦР связываются перспективы изучения таких заболеваний, как болезнь Крейтцфельдта — Якоба, Альцгеймера, рассеянный склероз.

10.6. ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ

Вич-инфекция — антропонозная ретровирусная инфекция с медленным развитием, длительным течением и разнообразными клиническими проявлениями, которая завершается развитием синдрома приобретенного иммунодефицита — СПИД и гибелью больного.

Вирус передается через прямой контакт слизистых оболочек (при наличии на них микроповреждений) или крови с содержащими ВИЧ кровью, спермой, влагалищными выделениями и грудным молоком.

ВИЧ не передается через: укусы комаров и большинства насекомых, воздух, рукопожатие (при отсутствии открытых повреждений кожи), поцелуй (любой, но при отсутствии кровоточащих повреждений и трещин на губах и в полости рта), посуду, одежду, пользование ванной, туалетом, плавательным бассейном и т.п.

Вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ), или Human Immunodeficiency Virus (HIV), представляют собой РНК-содержащие вирусы, относящиеся к семейству *Retroviridae*. Они обладают ферментом ревертазой (обратной транскриптазой), необходимой для синтеза ДНК на матрице вирусной РНК. После этого новообразованная ДНК встраивается в геном клетки-хозяина. ВИЧ является Т-лимфотропным вирусом, который можно отнести к подсемейству *Lentivirinae*. В это же подсемейство входят вирусы группы Висна и Мэди, вызывающие медленные вирусные инфекции у овец. В настоящее время известны два типа ВИЧ, имеющих антигенные различия, ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Последний является эндемичным для стран Западной и Центральной Африки.

ВИЧ был впервые выделен в 1983 г. французским вирусологом Л. Монтенье. Полная вирусная частица представляет собой ядро (кор), в котором находятся двойная вирусная РНК, ревертаза, интеграза и протеаза. Ядро окружено двумя оболочками — наружной и внутренней (рис. 10.7).

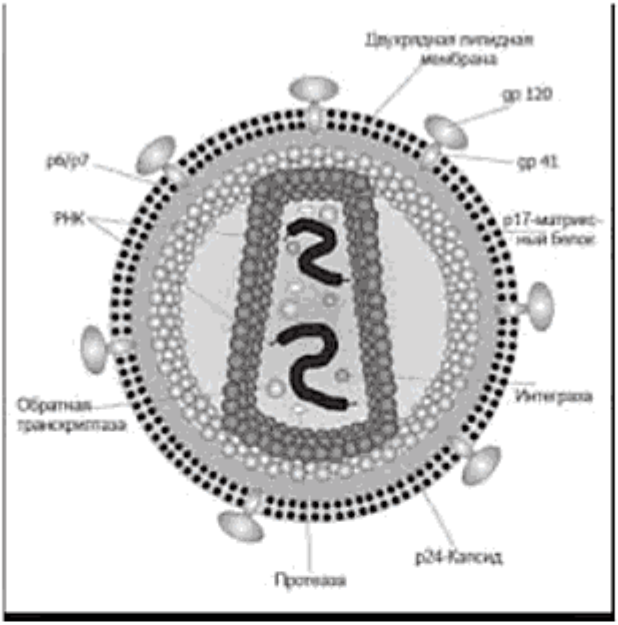

Рис. 10.7. Строение ВИЧ

Наружная фосфолипидная оболочка включает следующие основные структурные белки-гликопротеины: gp 160, gp 120, gp 41. Внутренняя оболочка вируса, покрывающая ядро, представлена следующими белками: p 17, p 24, p 55.

Геном ВИЧ содержит около 10 000 нуклеотидов, формирующих около десятка генов, которые с обеих сторон полинуклеотидной цепи ограничены длинными концевыми повторами (Long Terminal Repeat — LTR). Структурные гены, обозначаемые как «gag, pol, env», кодируют белки, непосредственно входящие в структуру вириона. Ген env кодирует синтез наружной оболочки, gag — внутренней и pol — обратной транскриптазы.

Регуляторные гены. Ген tat необходим для репликации вируса как на этапах транскрипции, так и на этапах трансляции. Ген rev кодирует синтез белка, обладающего способностью ускорять процесс трансляции. Ген nef кодирует синтез белка — эндогенного ингибитора репликации вируса. Ген vif — вирусный инфекционный фактор. Функции генов vpx, vpr (у ВИЧ-2) пока окончательно не выяснены.

Вирусы иммунодефицита человека обладают исключительно высокой генетической изменчивостью, значительно превышающей изменчивость других РНК-геномных вирусов. Это связано с тем, что

во время репликации их генома накапливаются ошибки, приводящие к мутациям в РНК. В процессе только одного цикла репродукции возникает около 10 мутаций. Появившиеся варианты с измененным генотипом могут существенно отличаться по антигенным свойствам, тканевому тропизму, вирулентности и др., что позволяет им уклоняться от иммунологического надзора и создает условия для длительного выживания ВИЧ в организме.

Общая продолжительность заболевания составляет в среднем 10 лет. В течение всего этого времени наблюдается постоянное снижение количества лимфоцитов в крови пациента, что в итоге становится причиной смерти.

Период иммунологического окна (период сероконверсии — до появления детектируемых антител к ВИЧ) — от 2 недель до 1 года (у людей с ослабленным иммунитетом — от 2 недель до 6 месяцев). В этот период антитела к ВИЧ не могут быть определены серологическими методами. Поэтому существует опасность заражения ВИЧ от инфицированного донора крови.

Наиболее распространенным на сегодняшний день методом диагностики ВИЧ является серологический. Для выявления антител к ВИЧ в сыворотке крови обычно используют ИФА. С помощью этого метода можно также выявлять антигены вируса в крови и лимфоцитах в более ранние сроки, чем появляются антитела. Однако это удается не всегда. Антитела к ВИЧ появляются не сразу, а спустя 2—3 месяца после заражения. В финальной стадии ВИЧ-инфекции (стадии СПИДа) титр антител снижается вплоть до полного исчезновения. Метод ИФА является скрининговым, т.е. отборочным, но при использовании иммуноферментных тест-систем 3-го и 4-го поколения может считаться подтверждающим тестом. В случае положительного результата анализ в лаборатории должен проводиться повторно с той же сывороткой и при получении хотя бы еще одного положительного результата сыворотка направляется для постановки подтверждающего теста.

Для подтверждения специфического результата, полученного в ИФА, используют метод иммуноблотинга (экспертный метод), при котором выявляются антитела к определенным белкам вируса. При обнаружении антител к одному из гликопротеинов gp 160, gp 120, gp 41 результат исследования расценивается как положительный. В случае обнаружения антител к другим белкам вируса результат анализа считается сомнительным и такого человека следует обследовать еще раз. Отсутствие антител к каким-либо белкам ВИЧ означает, что ИФА была ложноположительной.

Довольно часто антитела к ВИЧ находятся в составе иммунных комплексов антиген — антитело. Для разрушения этих комплексов и извлечения антител к ВИЧ используют методы ультразвуковой дезинтеграции и термоактивации.

Хорошо зарекомендовали себя молекулярно-генетические методы диагностики ВИЧ-инфекции, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР). Качественное определение провирусной ДНК ВИЧ в мононуклеарных клетках периферической крови дает возможность обнаружить ВИЧ через 2—3 недели после заражения. Количественное определение РНК ВИЧ в плазме крови (тест вирусной нагрузки) может быть использован у лиц с уже подтвержденным диагнозом ВИЧ-инфекции с целью оценки клинического статуса и определения необходимости начала специфической терапии.

Лечение ВИЧ-инфекции является комплексным и включает антиретровирусную терапию, иммунокорригирующую терапию, лечение оппортунистических инфекций и опухолей соответствующими антибиотиками, химиопрепаратами, облучением.

Антиретровирусная терапия ВИЧ осуществляется химиопрепаратами, нарушающими репродукцию вируса. Для лечения ВИЧ-инфекции используются следующие группы препаратов.

Ингибиторы обратной транскриптазы — нуклеозидные и нуклеотидные аналоги. Эти препараты встраиваются в нить ДНК, блокируя ее синтез. Тем самым нарушается процесс обратной транскрипции, а следовательно, и репродукция ВИЧ.

Различают нуклеозидные аналоги тимидина — (Азидотимидин (АЗТ), Ставудин (зерит); Фосфазид и аналоги других нуклеозидов: Диданозин (Видекс) — производное аденина; Ламивудин (Эпивир) — производные цитозина; Абакавир (Зиаген) — производное гуанина. Используется также комбинированный препарат — Комбивир (Зидовудин + Ламивудин).

Ингибиторы обратной транскриптазы — ненуклеозидные аналоги. Препараты непосредственно соединяются с активным центром обратной транскриптазы и блокируют ее: Невирапин (Вирамун); Ифавиренц (Стокрин).

К этим препаратам быстро формируется лекарственная устойчивость ВИЧ, поэтому их применяют в комбинации с антивирусными препаратами из других групп.

Ингибиторы протеазы ВИЧ. Препараты обладают высокой токсичностью, требуют трехкратного приема в сутки совместно с пищей, соблюдения диеты. Это самые дорогостоящие препараты. Все это

ограничивает их применение: Санквинавир (Фортоваза); Индинавир (Криксиван); Нельфинавир (Вирасепт); Ритонавир (Норвир)

Наибольшую опасность распространения ВИЧ представляет кровь. Необходимо тщательно избегать случайных повреждений кожных покровов острыми инструментами. Все манипуляции с больными, а также работу с биологическими материалами от больного медицинские работники проводят в средствах защиты — резиновых перчатках и масках. Необходимо также соблюдать все меры предосторожности, предусмотренные при работе с больными вирусным гепатитом В. Если все же произошел контакт слизистой оболочки или поврежденной кожи медицинского работника с биологической жидкостью, потенциально содержащей ВИЧ, следует незамедлительно (желательно в первые три часа) начать курс постконтактной профилактики антиретровирусными препаратами по специальной схеме, что позволит в несколько раз снизить вероятность инфицирования.

Перед тем как покинуть помещение, где проводилась работа с потенциально инфицированным материалом, необходимо снять перчатки и индивидуальную одежду и тщательно вымыть руки. При лечении больных с ВИЧ-инфекцией необходимо применять инструментарий и шприцы только одноразового использования. При загрязнении предметов обихода, постельных принадлежностей, окружающей среды выделениями больного необходимо проводить обработку дезинфицирующими средствами (0,2%-ный раствор гипохлорита натрия, этиловый спирт).

К сожалению, до сих пор надежной и безопасной вакцины против ВИЧ-инфекции не создано.

Учебно-методические материалы

Практическое занятие на тему **«Методы диагностики вирусных инфекций»**.

Вопросы и задания для предварительного изучения

1. Каковы особенности культивирования вирусов?
2. Вирусы являются веществом или существом?
3. Перечислите классификацию вирусов.
4. Что представляют собой культуры живых клеток?
5. Каковы особенности строения куриного эмбриона?
6. Перечислите методы серологической диагностики вирусных инфекций.

ограничивает их применение: Санквинавир (Фортоваза); Индинавир (Криксиван); Нельфинавир (Вирасепт); Ритонавир (Норвир)

Наибольшую опасность распространения ВИЧ представляет кровь. Необходимо тщательно избегать случайных повреждений кожных покровов острыми инструментами. Все манипуляции с больными, а также работу с биологическими материалами от больного медицинские работники проводят в средствах защиты — резиновых перчатках и масках. Необходимо также соблюдать все меры предосторожности, предусмотренные при работе с больными вирусным гепатитом В. Если все же произошел контакт слизистой оболочки или поврежденной кожи медицинского работника с биологической жидкостью, потенциально содержащей ВИЧ, следует незамедлительно (желательно в первые три часа) начать курс постконтактной профилактики антиретровирусными препаратами по специальной схеме, что позволит в несколько раз снизить вероятность инфицирования.

Перед тем как покинуть помещение, где проводилась работа с потенциально инфицированным материалом, необходимо снять перчатки и индивидуальную одежду и тщательно вымыть руки. При лечении больных с ВИЧ-инфекцией необходимо применять инструментарий и шприцы только одноразового использования. При загрязнении предметов обихода, постельных принадлежностей, окружающей среды выделениями больного необходимо проводить обработку дезинфицирующими средствами (0,2%-ный раствор гипохлорита натрия, этиловый спирт).

К сожалению, до сих пор надежной и безопасной вакцины против ВИЧ-инфекции не создано.

Учебно-методические материалы

Практическое занятие на тему **«Методы диагностики вирусных инфекций»**.

Вопросы и задания для предварительного изучения

1. Каковы особенности культивирования вирусов?
2. Вирусы являются веществом или существом?
3. Перечислите классификацию вирусов.
4. Что представляют собой культуры живых клеток?
5. Каковы особенности строения куриного эмбриона?
6. Перечислите методы серологической диагностики вирусных инфекций.

Глава 11

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ, СБОР, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

11.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМИНА «КЛИНИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»

Клиническая микробиология — раздел медицинской микробиологии, изучающий взаимоотношения, складывающиеся между человеческим организмом и микробами в норме, при патологии, в динамике воспалительного процесса с учетом проводимого лечения до полного выздоровления.

Задачи клинической микробиологии близки к задачам медицинской микробиологии. Специфика определяется тем, что клиническая микробиология исследует одну группу микробов — условно патогенных, одну группу заболеваний — оппортунистические инфекции и одну антропогенную экосистему — больничные учреждения.

Поэтому задачи клинической микробиологии следующие:

- изучение биологии и роли условно-патогенных микробов в этиологии и патогенезе гнойно-воспалительных заболеваний человека;
- разработка и использование методов микробиологической диагностики, специфической терапии и профилактики заболеваний, вызванных микробами, встречающихся в неинфекционных стационарах;
- исследование микробиологических аспектов проблем инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, дисбактериоза, лекарственной устойчивости микробов;

• микробиологическое обоснование и контроль за антимикробными мероприятиями в больничных стационарах.

11.2. ОТБОР МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ (ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП)

Для предохранения от инфицирования медицинского персонала и пациентов при сборе проб биоматериалов и доставке его в лабораторию необходимо:

• не загрязнять наружную поверхность посуды при сборе и доставке проб;

• не загрязнять сопроводительные документы (направления);

• свести к минимуму непосредственный контакт пробы биоматериала с руками медицинского работника, собирающего и доставляющего его в лабораторию;

• использовать стерильные одноразовые или разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке контейнеры (емкости) для сбора, хранения и доставки проб;

• транспортировать пробы в переносках или укладках с раздельными гнездами;

• соблюдать асептические условия для предотвращения инфицирования пациента в процессе выполнения инвазивных мероприятий;

• собирать пробы в стерильную одноразовую или стеклянную посуду (не загрязненную биоматериалом, не испорченную трещинами, отколотыми краями и другими дефектами).

Пробы биоматериала необходимо собирать следующим образом:

• до начала антибактериальной терапии, при отсутствии такой возможности — непосредственно перед повторным введением (приемом) препаратов;

• в количестве (вес, объем), необходимом для выполнения анализа, так как недостаточное для исследования количество биоматериала приводит к получению ложных результатов;

• с минимальным загрязнением материала нормальной микрофлорой, так как ее наличие приводит к ошибочной трактовке результатов, полученных, например, при исследовании мокроты, проб из носа, глотки (зева), гениталий и др.

При сборе пробы следят за тем, чтобы в лаборатории при вскрытии емкости с биоматериалом не образовывался аэрозоль: пробы крови и других жидкостей организма аккуратно без образования пены

переносят из шприца в сухую и (или) наполненную средой (антикоагулянтом) посуду.

В направлении на исследование указывают: фамилию, имя, отчество больного; год рождения; отделение, в котором он находится; номер истории болезни (амбулаторной карты); диагноз; материал, посылаемый на исследование, и задачи исследования; дату и время взятия материала (часы); антибактериальные (иммунные) препараты, если проба сдается на фоне антибиотико- и (или) иммунотерапии; фамилию, имя, отчество лечащего врача (консультанта), направляющего пробу на исследование. При направлении биоматериалов, полученных при вскрытии, указывают также отделение, в котором умер больной.

Перед сбором пробы, особенно при применении инвазивных методов, учитывается вероятность риска для пациента и пользы, а также значимость именно данного вида биоматериала для целей объективизации клинического диагноза и оценки проводимых или планируемых лечебных мероприятий.

Все собранные пробы отправляют в микробиологическую лабораторию немедленно после получения, за исключением случаев использования емкостей с транспортировочными средами, разрешенными к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке.

Это необходимо для:

- сохранения жизнеспособности возбудителей и возможности выделения микроорганизмов, требующих особых условий культивирования (*Haemophylus* и др.);
- предотвращения избыточного роста быстрорастущих и активных микроорганизмов;
- поддержания соотношения исходных концентраций изолятов при наличии в пробе микробных ассоциаций;
- сокращения времени контакта пробы с некоторыми антисептиками, используемыми местно, которые могут обладать антибактериальной активностью;
- объективизации клинического диагноза инфекционно-воспалительного заболевания и оценки результатов терапии.

Особенности отбора проб из клинического материала и используемая для этого посуда представлены в табл. 11.1.

Для проб на анаэробы и для фекальной флоры используют специальные емкости с транспортировочной средой, пробирки со средами для выделения кампилобактерий и хеликобактера, разрешенные к применению в установленном порядке. Такие среды создают анабиотическую атмосферу для микроорганизмов, что способствует сниже-

нию их метаболизма, сдерживанию роста, препятствует их высыханию и накоплению продуктов жизнедеятельности.

Каждую пробу, собранную в жидкую среду, тщательно перемешивают со средой.

Если кровь культивируют в бульоне, тогда после получения пробу хранят в термостате при температуре 35—37 °С.

Пробы ликвора хранят при комнатной температуре (18—20 °С), а при проведении в лаборатории вирусологических исследований — в термостате при 35—37 °С.

Для транспортирования проб, исследуемых на наличие аэробов и факультативных анаэробов, используют:

- одноразовые стерильные сухие пробирки с вмонтированным зондом-тампоном (тубсеры) или емкости с транспортировочной средой, разрешенные к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке; допускается использование стерильных стеклянных пробирок, укупоренных газопроницаемой пробкой с вмонтированным зондом-тампоном, приготовленных в лаборатории;
- одноразовые стерильные емкости с завинчивающейся крышкой (допускаются стеклянные с газопроницаемой пробкой) — для сбора проб мочи, мокроты, фекалий, бронхо-альвеолярного лаважа, биопсийного (кусочки ткани) материала;
- стерильные одноразовые с завинчивающейся пробкой или стеклянные пробирки — для сбора стерильных жидкостей, бронхо-альвеолярного лаважа, отделяемого из дренажей или соскобов;
- стерильные чашки Петри — для сбора проб волос или для транспортирования соскобов с маркировкой дна чашки;
- специальные стерильные носоглоточные и урогенитальные зонды-тампоны с осью из алюминия (диаметр оси — 0,9 мм) и маленьким тампоном из хлопка или вискозы на кончике (диаметр тампона — 2,5 мм), вмонтированным в пробку, укупоривающую стерильную одноразовую стеклянную пробирку — для проб из носоглотки на *B. pertusis* и из уретры у мужчин.

Для транспортирования проб, исследуемых на наличие анаэробов, используют емкости со специальными транспортировочными средами и пробирки с тиогликолевой средой; пробирки со средами для выделения кампилобактерий и хеликобактера, разрешенные к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке. Пробу, собранную в жидкую среду, тщательно с ней перемешивают. Для получения проб рекомендуются следующие приемы:

- отделяемое дренажей, используемых для активной аспирации полостей, отсасывают стерильным шприцем с плотным поршнем

в объеме 2—4 мл; на заполненный шприц надевают стерильную иглу, закрытую стерильным ватным тампоном, удаляют из шприца избыток воздуха; ватный тампон сбрасывают в дезинфицирующий раствор; конец иглы вкалывают в стерильную резиновую пробку и в таком виде шприц с материалом доставляют в лабораторию;

• содержимое очагов инфекции и полостей, получаемое путем их пунктирования, собирают в объеме 2—4 мл с помощью 2-, 5-, 10-миллилитровых шприцев с плотным поршнем; из шприца удаляют избыток воздуха, закрыв иглу стерильным ватным тампоном, который затем сбрасывают в дезинфицирующий раствор; иглу дезинфицируют протиранием тампоном, смоченным 70%-ным этиловым спиртом; для герметизации конец иглы вкалывают в стерильную резиновую пробку и в таком виде шприц с материалом доставляют в лабораторию.

При сборе большого объема материала (3 мл и более) анаэробные бактерии могут оставаться жизнеспособными в течение 24 ч при комнатной температуре (18—20 °С).

Если отделяемого всего несколько капель, его переносят из шприца в небольшую емкость или в пробирку с транспортировочной средой немедленно после получения (емкости с транспортировочными средами накануне получают в лаборатории).

Кусочки тканей (биопсийный материал) при подозрении на анаэробную инфекцию собирают в стерильные одноразовые емкости с завинчивающейся крышкой (допускается — в стеклянную посуду с притертой крышкой) и доставляют в лабораторию немедленно.

Для транспортирования проб, исследуемых на наличие вирусов, используют специальные емкости с жидкой средой для сохранения вирусов.

Таблица 11.1

Посуда, используемая для доставки проб в лабораторию

Источник и вид клинического материала	Изделия, используемые для доставки пробы
1	2
Кровь	Специальные транспортировочные емкости со средой, с нейтрализаторами антибиотиков и реагентами, разрушающими форменные элементы крови, или без них, разрешенные к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке; двухфазная среда во флаконах
Центральная нервная система	
Ликвор	Стерильные одноразовые пробирки с завинчивающейся пробкой; стерильные стеклянные пробирки с целлюлозной или ватно-марлевой пробкой

Продолжение

1	2
Материал при абсцессах мозга и биопсийный материал при воспалительных процессах в центральной нервной системе	Шприц с иглой, воткнутой в стерильную резиновую пробку; пробирка с тиогликолевой средой, закрытая стерильной резиновой пробкой; транспортировочные емкости со средой для сохранения анаэробов
Нижние дыхательные пути	
Биопсийный материал легких и трахеи; мокрота, естественно откашливаемая и индуцированная; соскоб с бронхов	Стерильная одноразовая емкость с завинчивающейся крышкой (для сбора мокроты); подготовленная в лаборатории стерильная стеклянная емкость
Аспират трахеи, бронхо-альвеолярный лаваж, смывы с бронхов	Стерильная одноразовая емкость для сбора мокроты с завинчивающейся крышкой; плотно закрывающаяся стерильная стеклянная пробирка
Аспират транстрахеальный и легких	Специальные транспортировочные емкости со средой для анаэробов; шприц с иглой, воткнутой в стерильную резиновую пробку; емкость с тиогликолевой средой; стерильная одноразовая пластиковая емкость с завинчивающейся крышкой; плотно закрывающаяся пробирка
Верхние дыхательные пути	
Мазки из носа, зева, носоглотки, наружного уха	Стерильный одноразовый зонд-тампон, вмонтированный в стерильную сухую пробирку (тубсер), или транспортировочная емкость с соответствующей средой; транспортировочный сосуд для вирусов; стерильная стеклянная посуда, смонтированная в лаборатории
Назальный смыв, назофагальный аспират	Стерильная одноразовая емкость с завинчивающейся крышкой; транспортировочный сосуд для вирусов
Жидкость, получаемая при тимпаноцентезе, аспират синуса, получаемые при аспирации иглой	Шприц с иглой, обеззараженной после проведения манипуляции с помощью тампона, смоченного 70%-ным этиловым спиртом, и воткнутой в стерильную резиновую пробку; можно перенести материал из шприца в стерильную одноразовую или стеклянную пробирки или специальный сосуд со средой для транспортирования анаэробов
Ткань, получаемая во время операции носа, глотки, уха	Стерильный одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой; пробирка с тиогликолевой или другой транспортировочной средой, плотно закрытая стерильной резиновой пробкой; плотно закрытая стерильная одноразовая пластиковая или стеклянная пробирка

Продолжение

1	2
Глаза	
Соскобы с конъюнктивы уголка глаза	Мазки на стерильных обезжиренных предметных стеклах; материал, который отбирают в специальный транспортировочный контейнер со средой или засевают в питательную среду
Интраокулярная жидкость	Мазки на стерильных обезжиренных предметных стеклах; материал, который отбирают в специальный транспортировочный контейнер со средой для анаэробов или шприц с предварительно обеззараженной 70%-ным этиловым спиртом иглой, воткнутой в стерильную резиновую пробку
Отделяемое, взятое стерильной стеклянной палочкой или стерильным ватным зондом-тампоном со слизистой оболочки нижней переходной складки, с края век, при язве — с роговицы (после обезболивания), при уголковом конъюнктивите — с уголков век	Стерильная одноразовая или стеклянная пробирка с сахарным бульоном, в которую вмонтирован зонд-тампон, или стерильная стеклянная палочка, используемые для взятия пробы; специальный транспортировочный контейнер со средой для вирусов
Секрет из слезного мешка	Одноразовый стерильный зонд-тампон, вмонтированный в стерильную сухую пробирку (тубсер), или в стеклянную пробирку
Мочеполовая система	
Моча	
Средняя порция свободно истекающей мочи; из канала подвздошной кишки, использованного для создания искусственного мочевого пузыря; из катетера у реанимационных больных. Смыв из мочевого пузыря. Проба, полученная при билатеральной уретральной катетеризации	Стерильная одноразовая емкость для сбора мочи с завинчивающейся крышкой или стерильная одноразовая пробирка с крышкой; или специальная одноразовая пробирка для сбора мочи. При использовании стерильной стеклянной пробирки с целлюлозной или ватно-марлевой пробкой следят за тем, чтобы не замочить пробку материалом (объем пробы 10—20 мл)
Проба, полученная при проведении надлобковой аспирации	Стерильный шприц без иглы, закрытый стерильной резиновой пробкой; стерильный шприц с иглой, предварительно обеззараженной 70%-ным этиловым спиртом и воткнутой в резиновую пробку
Материал из женских половых органов	
Жидкости: амниотическая, фаллопиевых труб, бартолиновая	Специальная транспортировочная емкость со средой для анаэробов; шприц без иглы, закрытый стерильной резиновой пробкой; шприц с иглой, обработанной 70%-ным спиртом и воткнутой в стерильную резиновую пробку (объем пробы 1—2 мл)

Продолжение

1	2
Пробы из цервикального канала, уретры, влагалища	Одноразовый стерильный зонд-тампон, вмонтированный в стерильную сухую пробирку (тубсер) или емкость транспортировочная со специальной средой; зонд-тампон, вмонтированный в целлюлозную или ватно-марлевую пробку стерильной стеклянной пробирки. Предметное стекло с приготовленным мазком для исследования бактериальных инфекций, передаваемых половым путем, и вирусов. Пробирка с транспортировочной средой с активированным углем для сохранения гонококков в течение 48 ч и более
Пробы материала из эндометрия	Стерильная одноразовая емкость с завинчивающейся крышкой или пробирка или емкость транспортировочная со средой для анаэробов; стерильная стеклянная посуда
Материал наружных половых органов	Стерильный шприц без иглы, закрытый стерильной резиновой пробкой; предметное стекло с мазком, закрытым покровным стеклом для определения T. pallidum; зонд-тампон, вмонтированный в стерильную одноразовую (тубсер) или стеклянную пробирку; специальная транспортировочная пробирка со средой с активированным углем для сохранения гонококков и транспортировочные емкости для вирусов и хламидий; мазки на предметных стеклах для обнаружения других возбудителей инфекций, передаваемых половым путем
Материал из мужских половых органов	
Мазки из уретры	Зонд-тампон на алюминиевой оси (уретральный зонд-тампон), вмонтированный в стерильные одноразовую (тубсер) или стеклянную пробирки; специальная транспортировочная пробирка со средой с активированным углем для сохранения гонококков и транспортировочные сосуды для вирусов и хламидий; мазки на предметных стеклах для обнаружения других возбудителей инфекций, передаваемых половым путем
Эякулят, сперма	Стерильная одноразовая емкость с завинчивающейся крышкой; стерильные пробирка или тубсер, одноразовые или стеклянные
Материал придатков яичка при эпидидимите	Специальный транспортировочный контейнер со средой для анаэробов или емкость с тиогликолевой средой; стерильная одноразовая емкость с завинчивающейся крышкой или стерильная стеклянная пробирка с целлюлозной или ватно-марлевой пробкой

Продолжение

1	2
Поражение пениса	Шприц без иглы, закрытый стерильной резиновой пробкой; предметное стекло с мазком на *T. pallidum*, покрытое покровным стеклом; зонд-тампон, вмонтированный в стерильную одноразовую (тубсер) или стеклянную пробирку; транспортировочные контейнеры для вирусов и хламидий; мазки для обнаружения других возбудителей инфекций, передаваемых половым путем
Материал при подозрении на наличие гонореи	
Мазки из ануса, цервикального канала, уретры, влагалища	Зонд-тампон, вмонтированный в стерильную одноразовую (тубсер) или стеклянную пробирку; специальная транспортировочная пробирка со средой с активированным углем для сохранения гонококков в течение 48 ч и более
Желудочно-кишечный тракт	
Полость рта	Зонд-тампон, вмонтированный в стерильную одноразовую (тубсер) или стеклянную пробирку; стерильная одноразовая или стеклянная емкость для сбора смыва из ротовой полости
Желудочный лаваж или промывная жидкость; дуоденальный аспират; проба, получаемая при ректороманоскопии; ректальный биопсийный материал	Стерильная одноразовая емкость с завинчивающейся крышкой; специальный стерильный контейнер для сбора мокроты; стерильная стеклянная емкость; аспират — в стерильном шприце с иглой, предварительно обеззараженной и воткнутой в стерильную резиновую пробку
Ректальный мазок	Одноразовый стерильный зонд-тампон, вмонтированный в стерильную сухую пробирку (тубсер); или стерильная пробирка со специальной транспортировочной средой; зонд-тампон из нержавеющего материала, вмонтированный в целлюлозную или ватно-марлевую пробку стерильной стеклянной пробирки
Фекалии на наличие кишечных инфекций («дизгруппа»), хеликобактера, кампилобактера	Стерильная пробирка с тампоном в физиологическом растворе с глицерином; контейнер транспортировочный со средой для анаэробов в фекальных образцах, со специальными средами с активированным углем и без него для выделения *Campylobacter sp.* и *Helicobacter sp.*; зонд-тампон в сухой стерильной одноразовой пробирке (тубсер); стерильная стеклянная пробирка, смонтированная с зондом-тампоном на металлической проволоке из титана, стали, алюминия. Не допускается использование тампона с деревянной осью

Продолжение

1	2
Фекалии на наличие дисбактериоза по родовому и видовому составу микробов («на флору»)	Специальный транспортировочный контейнер со средой для анаэробов в фекальных образцах, со специальными средами с активированным углем и без него для выделения *Campylobacter sp.* и *Helicobacter sp.*, разрешенные к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке; зонд-тампон в пробирке с физиологическим раствором с глицерином в стерильной одноразовой или стеклянной пробирке; специальный одноразовый стерильный контейнер с завинчивающейся крышкой; стеклянная, смонтированная в лаборатории емкость
Фекалии на наличие дисбактериоза с количественным учетом выделенных и идентифицированных микробов («на дисбактериоз»)	Специальные стерильные одноразовые контейнеры с завинчивающейся крышкой и лопаточкой для сбора материала и отбора пробы для посева, имеющие стандартный вес; смонтированная в лаборатории специальная стерильная стеклянная емкость
Кожа и подкожные ткани	
Язвы, узелки (узелковые утолщения), неглубокие, поверхностные раны (гнойные; ожоги); глубокие раны или абсцессы, кости	Специальные стерильные одноразовые контейнеры с завинчивающейся крышкой; стерильные пробирки с пробками одноразовые или стеклянные объемом 5 мл; емкости со специальными средами для анаэробов
Экссудат подкожной и мягких тканей; аспират мягких тканей	Стерильный шприц без иглы, закрытый стерильной резиновой пробкой; шприц с иглой, предварительно обеззараженной 70%-ным этиловым спиртом и воткнутой в резиновую пробку
Стерильные жидкости организма, за исключением крови, ликвора, мочи (см. выше)	
Жидкости	
Плевральная, перитонеальная, асцитическая, суставная, синовиальная	Стерильная одноразовая емкость с завинчивающейся крышкой; закрытый шприц без иглы или с иглой, предварительно обеззараженной 70%-ным этиловым спиртом и воткнутой в стерильную резиновую пробку
Биоматериал для ПЦР-диагностики	
Кровь; другие жидкости организма	Стерильные одноразовые пробирки с пробкой объемом 1,5 мл с антикоагулянтом. Пробирку переворачивают 3—5 раз для смешивания пробы с антикоагулянтом. Доставка в лабораторию — в штативе из материалов, подлежащих стерилизации в автоклаве

Продолжение

1	2
Биопсийный материал; соскобы; мокрота и другие виды биоматериала	Стерильные сухие одноразовые пробирки типа «Эппендорф» и другие аналогичные. Доставка в лабораторию — в специальном штативе из материалов, подлежащих стерилизации в автоклаве
Пробы среды, окружающей больного	
Воздух	Стерильные чашки Петри одноразовые (d = 90 мм) или стеклянные (d = 100 мм) с плотными питательными средами. Доставка в лабораторию в специальных контейнерах-переносках
Смывы с объектов среды, окружающей больного	Стерильные зонды-тампоны, вмонтированные в прозрачные пробирки с прозрачной бесцветной жидкой средой. Пробы доставляют в лабораторию в штативах из материалов, подлежащих стерилизации в автоклаве
Пробы для определения стерильности	
Кровь и компоненты крови из отделения, занимающегося их заготовкой	Емкости с заготовленным материалом доставляют в лабораторию в специальных контейнерах-переносках
Смывы с медицинского инструментария, шлангов аппаратуры, используемой в реанимационных и анестезиологических отделениях, а также в операционных; рук медицинского персонала; белья	Стерильные зонды-тампоны, вмонтированные в прозрачные пробирки с прозрачной бесцветной жидкой средой. Пробы доставляют в лабораторию в штативах из материалов, подлежащих стерилизации в автоклаве
Хирургический материал: тампоны, салфетки, турунды, ватные тампоны на деревянной оси	Стерильные прозрачные пробирки с пробками, с прозрачной бесцветной жидкой средой с 3—5 стерильными стеклянными бусинками. Пробы доставляют в лабораторию в штативах из материалов, подлежащих стерилизации в автоклаве
Шовный материал: кетгут, хранящийся в операционной в спиртовом растворе йода	Стерильная пробирка (флакон с пробкой) с раствором нейтрализатора (гипосульфит натрия)
Шелк, капрон, мономерные синтетические нити, хранящиеся в операционной в спиртовом растворе	Стерильная пробирка с пробкой со стерильной дистиллированной водой в качестве смывной жидкости. Пробы шовного материала доставляют в лабораторию в штативах, подлежащих стерилизации в автоклаве
Смывы с операционного поля больного	До обработки поля: в прозрачные пробирки, наполненные прозрачной жидкой питательной средой. После обработки поля: стерильная пробирка (флакон с пробкой) с раствором нейтрализатора (гипосульфит натрия). Доставку материала в лабораторию осуществляют в штативах, подлежащих стерилизации в автоклаве

Окончание

1	2
Пробы для определения иммунологических факторов системы антиинфекционной защиты (система антиинфекционной резистентности организма — САИР)	
Кровь и другие жидкости организма для определения гуморальных факторов защиты	Одноразовые шприцы-пробирки (вакутайнеры); стерильные одноразовые пробирки с завинчивающейся пробкой; стерильные стеклянные пробирки со стерильными резиновыми, целлюлозными или ватно-марлевыми пробками. Пробы доставляют в лабораторию в специальном штативе из материалов, подлежащих стерилизации в автоклаве. При использовании стеклянных пробирок с ватно-марлевыми пробками — не замочить их при транспортировании
Кровь и другие жидкости организма для определения клеточных факторов защиты	Стерильные одноразовые пробирки с завинчивающейся пробкой; стерильные стеклянные пробирки, плотно закрытые стерильной резиновой пробкой. Пробирки одноразовые с антикоагулянтом, подлежащие центрифугированию. Доставку в лабораторию осуществляют в специальном штативе из материалов, подлежащих стерилизации в автоклаве
Мазки для определения бактериальных и вирусных антигенов (например, при подозрении на наличие инфекций, передаваемых половым путем)	Стерильное обезжиренное предметное стекло; для T. pallidum — предметное стекло должно быть покрыто покровным стеклом. Доставку в лабораторию осуществляют в одноразовом контейнере или стерильных одноразовых или стеклянных чашках Петри в специальных контейнерах

Пробы гноя, жидкости и тканей следует доставлять в лабораторию в специальных стерильных одноразовых контейнерах с завинчивающимися крышками. Зонды-тампоны — сухими в стерильных одноразовых пробирках (тубсерах) или в емкостях с транспортировочной средой, если материал нельзя доставить в лабораторию немедленно после взятия пробы. Для этих целей можно использовать транспортировочные среды, в том числе в одноразовых пробирках, упакованных вместе со стерильным зондом-тампоном, разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке. Зонды-тампоны выпускают (готовят) с использованием ряда материалов: для самого тампона (ватно-марлевый, хлопковый, вискозный, дакроновый), для оси зонда-тампона (дерево, пластик, нержавеющий металл — титан, сталь, алюминий) и плотными агаризованными средами: с углем и без него для анаэробов.

Многие клинически значимые анаэробы, например, *Clostridium perfringens, Bacteroides fragilis*, достаточно толерантны к наличию кислорода и хорошо сохраняются в большом количестве гноя, пробах жидкостей и тканях организма, а также на зонде-тампоне в специальной транспортировочной или тиогликолевой средах.

Более чувствительные к кислороду (например, фузобактерии) также хорошо сохраняются в пробе биологического материала, и если материал посеять в течение 2—3 ч от момента его сбора, то не требуется особого внимания к способу доставки. Анаэробы, требующие особых условий культивирования, не сохраняют жизнеспособность на зонде-тампоне в транспортировочной емкости со средой, не предназначенной для доставки анаэробов, за исключением емкостей со специальными транспортировочными средами или тиогликолевой.

Вместе с тем эти микроорганизмы растут на 5—7 суток дольше времени, в течение которого большинство практических лабораторий инкубирует чашки, засеянные материалом для выделения и идентификации аэробов и факультативных анаэробов. По этой причине в обычных практических лабораториях представляется нецелесообразным рутинное исследование на наличие анаэробов с использованием специальных транспортировочных анаэробных емкостей со средами, и можно ограничиться пробирками с тиогликолевой средой.

Для сбора и транспортирования проб используют среды, емкости, инструменты и материалы, разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке.

Получение у пациента любой пробы, требующей использования инвазивных методов, рекомендуется производить врачом (исключение — проба крови, которую может собирать процедурная медицинская сестра).

При необходимости сбора материала при помощи зонда-тампона на открытой операционной поверхности или в случае иного инвазивного вмешательства допустимо использование готовых зондов-тампонов с международным уровнем безопасности не ниже Class IIA, разрешенных к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке.

Пробы крови. Пробы для определения наличия в крови биологических агентов (бактериемия, виремия и др.) получают венопункцией периферических вен (чаще вены локтевого сгиба), артерий или из пятки у новорожденных.

Ликвор. В микробиологическую лабораторию на исследование отправляют 4,0—5,5 мл ликвора, полученного при люмбальной пункции

из субарахноидального пространства между позвонками L3—L4, L4—L5 или L5—S1, а также при пунктировании боковых желудочков мозга.

Сбор проб проводят медленным заполнением трех пробирок тремя порциями материала для исследования в лабораториях. Используют стерильные пробирки с плотно закрывающимися крышками (одноразовые с пробкой или стеклянные со стерильной резиновой пробкой).

Из трех пробирок с материалом, полученным при люмбальной пункции, всегда отправляют пробирку с самым мутным содержимым, как правило, это вторая пробирка в процессе сбора пробы.

Биопсийный материал. Получают пробы во время операции, помещают в емкость с анаэробной средой или в стерильную пробирку с тиогликолевой средой, закрытую стерильной резиновой пробкой.

Материал отправляют в лабораторию немедленно.

Большинство проб, получаемых из глаза, собирает врач-офтальмолог. Эти пробы следует сеять на питательные среды у постели больного, или в процедурном кабинете, или в кабинете врача во время приема и засеянный материал передавать в лабораторию для культивирования, выделения, идентификации и определения антибиотикочувствительности возбудителей. Пробы, взятые при использовании инвазивных и других агрессивных методов, собирают параллельно с мазком с конъюнктивы, который в таких случаях служит контролем.

Отделяемое собирают стерильной стеклянной палочкой или стерильным зондом-тампоном: двумя — тремя движениями проводят по слизистой оболочке нижней переходной складки, с края век; при язве — с роговицы (после обезболивания), при «уголковом конъюнктивите» — с уголков век.

Секрет из слезного мешка собирают стерильным зондом-тампоном после осторожного массажа.

Материал, взятый палочкой и (или) зондом-тампоном, помещают в емкость с транспортировочной средой или в стерильную стеклянную пробирку с жидкой средой и доставляют в лабораторию, внимательно следя за тем, чтобы не замочить целлюлозную или ватно-марлевую пробку пробирки.

При использовании зондов-тампонов предпочтительнее пользоваться одноразовыми емкостями с транспортировочной средой или стерильными стеклянными пробирками с ватно-марлевыми пробками, наполненными стерильной средой.

Наиболее корректную информацию о возбудителе воспалительного процесса можно получить при микробиологическом анализе соскобов.

ЛИТЕРАТУРА

Инфекционная безопасность : учеб. пособие для студентов, слушателей и преподавателей среднего и дополнительного профобразования. СПб. : Диля Паблишинг, 2010.

Камышева К.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. Ростов н/Д : Феникс, 2009.

Мальцев В.Н., Пашков Е.П., Хаустова Л.И. Основы микробиологии и иммунологии : курс лекций. М. : Медицина, 2005.

Микробиология, вирусология и иммунология : руководство к лабораторным занятиям ; под ред. проф. В.Б. Сбойчакова и доц. М.М. Карапаца. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012.

Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии : учебник для студентов медицинских училищ ; под ред. А.А. Воробьева и Ю.С. Кривошеина. М. : Мастерство, 2001.

Основы микробиологии и иммунологии : учебник для медицинских училищ и колледжей ; под ред. акад. РАМН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014.

Павлович С.А. Медицинская микробиология : учебник для учащихся медицинских училищ. Минск : Высшая школа, 1997.

Приказ Министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ от 19.01.1995 № 8 «О развитии и совершенствовании деятельности лабораторий микробиологии (бактериологии) лечебно-профилактических учреждений».

Приказ Министерства здравоохранения СССР № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Дата введения: 22.04.1985.

Прозоркина Н.В., Рубашкина Л.А. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии : учеб. пособие для студентов медицинских училищ и колледжей. Ростов н/Д: Феникс, 2002.

ЛИТЕРАТУРА

Инфекционная безопасность : учеб. пособие для студентов, слушателей и преподавателей среднего и дополнительного профобразования. СПб. : Диля Паблишинг, 2010.

Камышева К.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. Ростов н/Д : Феникс, 2009.

Мальцев В.Н., Пашков Е.П., Хаустова Л.И. Основы микробиологии и иммунологии : курс лекций. М. : Медицина, 2005.

Микробиология, вирусология и иммунология : руководство к лабораторным занятиям ; под ред. проф. В.Б. Сбойчакова и доц. М.М. Карапаца. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012.

Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии : учебник для студентов медицинских училищ ; под ред. А.А. Воробьева и Ю.С. Кривошеина. М. : Мастерство, 2001.

Основы микробиологии и иммунологии : учебник для медицинских училищ и колледжей ; под ред. акад. РАМН В.В. Зверева и проф. М.Н. Бойченко. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014.

Павлович С.А. Медицинская микробиология : учебник для учащихся медицинских училищ. Минск : Высшая школа, 1997.

Приказ Министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ от 19.01.1995 № 8 «О развитии и совершенствовании деятельности лабораторий микробиологии (бактериологии) лечебно-профилактических учреждений».

Приказ Министерства здравоохранения СССР № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Дата введения: 22.04.1985.

Прозоркина Н.В., Рубашкина Л.А. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии : учеб. пособие для студентов медицинских училищ и колледжей. Ростов н/Д: Феникс, 2002.