С.А. ПАВЛОВИЧ

МИКРОБИОЛОГИЯ С ВИРУСОЛОГИЕЙ И ИММУНОЛОГИЕЙ

Допущено
Министерством образования Республики Беларусь
в качестве учебного пособия для студентов учреждений
высшего образования по медицинским специальностям

3-е издание, исправленное

Минск
«Вышэйшая школа»

УДК [578/579+612.017.1](075.8)
ББК 52я73
П12

Рецензенты: академик Российской академии медицинских наук, профессор *А.А. Воробьев*; д-р мед. наук, профессор *М.И. Римжа*; канд. мед. наук, доцент *И.А. Крылов*; НИИ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь (д-р мед. наук *Т.В. Амвросьева*, д-р мед. наук *А.С. Владыко*, д-р мед. наук *Н.Н. Полещук*, д-р биол. наук *Л.В. Скрипова*, канд. биол. наук *Т.С. Ермакова*)

Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или любой ее части не может быть осуществлено без разрешения издательства.

Павлович, С. А.

П12 Микробиология с вирусологией и иммунологией : учеб. пособие / С. А. Павлович. – 3-е изд., испр. – Минск : Выш. шк., 2013. – 799 с. : ил.
ISBN 978-985-06-2237-2.

Состоит из двух частей – общей и специальной. В первой изложены систематика и номенклатура микроорганизмов; морфология и ультраструктура прокариот, эукариот и вирусов; культивирование, метаболизм и энергетический обмен бактерий; генетика микроорганизмов; механизмы антимикробного действия антибиотиков, функционирования иммунной системы в норме и патологии; иммунотерапия, вакцинопрофилактика и все современные реакции иммунитета, использующиеся в оценке иммунного статуса человека и диагностике инфекционных болезней.

Во второй части описаны биологические особенности наиболее значимых возбудителей бактериальных и вирусных инфекций, протозойных инвазий и микозов, современные методы их лабораторной диагностики. Завершается она темой «Санитарная микробиология».

Для студентов медицинских вузов и биологических факультетов университетов, биологов, иммунологов, микробиологов, эпидемиологов и инфекционистов.

УДК [578/579+612.017.1](075.8)
ББК 52я73

ISBN 978-985-06-2237-2

© Павлович С.А., 2005
© Павлович С.А., 2013, с изменениями
© Оформление. УП «Издательство “Вышэйшая школа”», 2013

ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемое учебное пособие составлено в соответствии с программами по микробиологии, вирусологии и иммунологии для студентов биологических и медицинских специальностей высших учебных заведений. В отличие от традиционных российских учебников, которыми пользуются вузы Республики Беларусь, оно включает полный объем лабораторного практикума, который обычно издается отдельно как приложение к учебникам и более чем на треть повторяет их содержание. Использование нашего пособия-практикума исключает дублирование и, главное, позволит студенту освоить практические навыки, базирующиеся на всесторонней связи с теорией.

Учебное пособие состоит из двух частей – общей и специальной.

В общей части изложены систематика и номенклатура микроорганизмов, морфология и ультраструктура прокариот, эукариот и вирусов, их экология, физиология и генетика, темы «Антибиотики», «Инфекция» и раздел «Иммунитет», в котором представлены общие механизмы функционирования иммунной системы, иммунопатология, экологическая иммунология, иммунотерапия, вакцинопрофилактика и все современные реакции иммунитета, использующиеся в оценке иммунного статуса человека и диагностике инфекционных болезней.

В специальной части пособия описаны биологические особенности наиболее значимых возбудителей бактериальных и вирусных инфекций, протозойных инвазий и микозов, современные методы их лабораторной диагностики. Завершается она эпидемиологически значимыми в патологии человека темами «Прионовые, медленные ви-

русные и внутрибольничные инфекции» и «Санитарная микробиология». Каждая тема иллюстрирована рисунками.

Для лучшего усвоения предмета важнейшие главы учебного пособия завершаются графами логических структур. Они, подобно резюме, позволяют, с одной стороны, кратко обобщать материал. С другой стороны, заменяя рутинные вопросы для так называемого самоконтроля, графы, как показал опыт 19-летнего использования нашего учебного пособия «Медицинская микробиология в графах», не только облегчают запоминание материала, но, что самое важное, приучают студентов на основе логического мышления вычленять главные учебные элементы, творчески определять их значимость и категорийность. Полезны они также преподавателям: при чтении лекции исключаются досадные упущения, а на занятиях и коллоквиумах легко оценивается уровень знаний обучающихся.

К достоинствам книги, на наш взгляд, можно отнести также логическую последовательность в изложении учебного материала, исчерпывающую краткость и ясность в раскрытии молекулярных механизмов, сложных тезисов, формулировок и иностранных терминов, которыми изобилуют современная микробиология, вирусология и иммунология.

Автор приносит глубокую благодарность рецензентам за ценные замечания и предложения, учтенные при подготовке учебника к изданию. Особую признательность выражает доценту ГрГУ им. Я. Купалы К.А. Мандрику, с которым совместно написан подраздел «Метаболизм микроорганизмов и энергетический обмен».

РАЗДЕЛ I
ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

МИКРОБИОЛОГИЯ КАК НАУКА И ЭТАПЫ ЕЕ РАЗВИТИЯ

Микробиология (*mikros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – учение) – наука о микроорганизмах, их строении и жизнедеятельности, наследственности и изменчивости, значении в природе и народном хозяйстве. Микроорганизмы могут иметь клеточное и неклеточное строение. Размеры отдельных особей микробов, имеющих клеточное строение, составляют 0,2–20 мкм (чаще 0,5–10 мкм), что позволяет легко обнаружить их под иммерсионным микроскопом. Неклеточные организмы, или вирусы (*virus* – яд), во много раз меньше. Диаметр самых больших из них, например вируса натуральной оспы, не превышает 300 нм, а у самых мелких составляет 10–15 нм. Для выявления вирусов используются электронные микроскопы.

Разделы микробиологии. По целевой направленности и решению практических задач различают общую, техническую (промышленную), медицинскую, ветеринарную, санитарную, радиационную и космическую микробиологию. При этом *общая* микробиология изучает систематику, структурную организацию, химический состав, ферментные системы, культивирование и генетику микроорганизмов; *техническая* – использование микроорганизмов в производстве антибиотиков, ферментов, витаминов, стероидов, аминокислот и прочих биологически активных веществ, молочных и других продуктов, чая, кофе, какао, обработке каучука, хлопка, шелка, дублении кож и др.;

медицинская и *ветеринарная* – закономерности жизнедеятельности патогенных для человека и животных микроорганизмов, механизмы инфекции и иммунитета, методы специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний; *санитарная* – микробную обсемененность окружающей среды, в частности выживаемость на различных объектах санитарно-показательных и патогенных микробов, их влияние на здоровье человека и естественные процессы; *радиационная* и *космическая* – влияние ионизирующих излучений и космических частиц на микроорганизмы.

Связь микробиологии с фундаментальными и общественными науками. Микробиология тесно связана с биологией, биохимией, биофизикой, а медицинская и ветеринарная – со смежными дисциплинами, прежде всего с инфекционной патологией у людей и животных, эпидемиологией, гигиеной. Так как закономерности возникновения и распространения инфекционных болезней в человеческом обществе не могут быть правильно поняты без учета социальных условий жизни, то медицинская микробиология к тому же должна опираться на общественные науки, в частности на статистику, политическую экономию, историю, на основе которых разрабатываются профилактические мероприятия.

Краткие сведения по истории микробиологии, вирусологии и иммунологии

Заразные болезни были известны людям уже в античном мире. В те далекие времена их называли «прилипчивыми» и, как свидетельствуют древние источники, больных проказой изгоняли или заключали в особые «дворы прокаженных». Более трех тысячелетий тому назад в Китае, а позже в других странах, начала применяться *вариоляция,* т. е. искусственная прививка против человеческой «черной оспы». Древние евреи, индусы и китайцы, а затем греки и римляне в борьбе с заразными болезнями широко практиковали изоляцию больных и гигиенические мероприятия. Так, в Древнем Риме расход воды на одного человека в 10 раз превышал норму, принятую сейчас в Европе.

Первые представления о том, что возбудителями заразных болезней могут являться мельчайшие организмы, которым итальянский ученый Т. Седильо в конце XIX в. дал название «микробы», начали формироваться в трудах крупнейших ученых-философов и произведениях поэтов и писателей Древней Греции и Рима. В частности, Тит Лукреций Кар в оде «О природе вещей» (I в. н. э.), касаясь заразных болезней, предполагал, что каждая из них зарождается «семенами», а спартанский философ Фукидид возбудителей инфекций называл *contagium animatum* или живым контагием – термином, который в прилагательном падеже «контагиозность» до сих пор применяется в медицине как синоним слова «заразность». Однако дальше умозаключений античные прорицатели пойти не смогли ввиду относительно низкого уровня техники того времени.

Условия для быстрого накопления современных знаний по этиологии инфекционных болезней появились лишь в эпоху Возрождения и промышленной революции, давших толчок развитию физики, химии, естествознания и медицины, из которой выделилась эпидемиология как самостоятельная отрасль, призванная изучать эпидемии. Глубже стали изучаться природа инфекционных болезней, причины их возникновения и распространения. Огромный вклад в это направление внес итальянский эпидемиолог Джироламо Фракасторо (1483–1553). С его именем связывают всеобщее признание живого болезнетворного начала (*contagium vivum*) в возникновении инфекционных болезней и выделении их в отдельную группу из многочисленных соматических заболеваний. Благодаря активной деятельности эпидемиологов XVII–XVIII вв. в Европе повсеместно стала снижаться заболеваемость натуральной оспой, проказой и чумой. Следует отметить, что полное Собрание законов Российской империи, изданное в 1728 г., содержало многочисленные разделы, касавшиеся противоэпидемических мероприятий. Примечательно, что в нем признавался заразный характер эпидемических болезней, а причиной их считался «яд», который «так прилипчив... что... может заразить и вред наносить». К концу столетия в России появился «Устав о карантинах», где регламентировались меры против заноса из Европы чумы, сыпного тифа и других эпидемических болезней. Его разработали русские врачи-эпидемиологи, среди

которых история медицины навеки запечатлела деятельность почетного члена многих западноевропейских академий Данилы Самойловича (1744–1805), организатора карантинной и противоэпидемической службы на Черноморском побережье, лично участвовавшего в борьбе с эпидемией чумы в Москве в 1771–1772 гг., участника военных походов под предводительством Григория Потемкина и взятия Очакова.

Вторая половина XIX в. ознаменовалась появлением микробиологии, вирусологии и тесно связанной с ними инфекционной иммунологии. В их недрах абстрактные рассуждения гениальных мыслителей о существовании в природе *contagium vivum* получили неоспоримые экспериментальные доказательства.

Этапы развития медицинской микробиологии. В становлении микробиологии как науки выделяют два этапа – описательный (морфологический) и физиологический.

Морфологический период берет начало от первых наблюдений голландского естествоиспытателя Антония ван Левенгука (1632–1723), который, изготовив микроскоп, увеличивающий объекты до 200 раз, сумел увидеть и описать все основные формы бактерий и простейших. В 1695 г. был издан труд «Тайны природы, открытые Антонием Левенгуком при помощи микроскопов».

После исследований Левенгука были сделаны попытки доказать роль микробов в происхождении инфекционных заболеваний. В 1840 г. в печати появилась статья Генле «О миазмах и контагиях», где автор обосновал этиологическое значение микробов в происхождении инфекционных заболеваний. Эта концепция, впоследствии названная триадой Генле – Коха, гласит: 1) предполагаемый возбудитель должен обнаруживаться при определенной болезни и не встречаться при других заболеваниях и у здоровых людей; 2) патогенный микроб должен быть выделен из организма больного в чистом виде; 3) должна быть доказана способность микроба вызывать специфические заболевания у экспериментальных животных.

В период описательной микробиологии были установлены возбудители трихомоноза (А. Донне, 1836), фавуса (И. Шенляйн, 1839), стригущего лишая (Д. Груби, 1843), сибирской язвы (А. Поллендер, 1849; К. Давен, 1850), балантидиаза (П. Мальмстен, 1856), лямблиоза (Д.Ф. Лямбль, 1859).

Разрозненные факты описательного периода микробиологии были обобщены и приумножены основателем научной микробиологии Луи Пастером (1822–1895), с именем которого связано развитие второго, физиологического периода микробиологии и эпохальные открытия сущности брожения (1857), невозможности самопроизвольного зарождения (1860), природы порчи пива и вина (1865), болезней шелковичных червей (1868), микробной обусловленности и заразности инфекционных болезней (1881), методов изготовления вакцин и способов предохранения от куриной холеры, сибирской язвы и бешенства (1882–1885).

Большую роль в истории развития микробиологии сыграли труды Роберта Коха (1843–1910), который разработал метод выделения чистых культур микроорганизмов на плотных питательных средах, в частности ввел в практику агар-агар, желатин, свернутую сыворотку, кусочки овощей, предложил методы окраски бактерий анилиновыми красителями, усовершенствовал микроскоп, использовал микрофотографию. Благодаря усовершенствованию техники и методики микробиологических исследований Кох установил природу сибирской язвы, туберкулеза, холеры, а его ученики и последователи к концу XIX в. открыли почти все возбудители бактериальных инфекций (К. Эберт и Г. Гаффки – брюшнотифозную палочку; Г. Шоттмюллер – палочку паратифа В; Т. Эшерих – кишечную палочку; Э. Клебс и Ф. Леффлер – возбудителя дифтерии; Ф. Леффлер и Х. Шютц – возбудителя сапа; Ш. Китазато – столбнячную палочку).

Этапы развития вирусологии. Основоположником современной вирусологии является русский ученый, профессор ботаники Д.И. Ивановский (1864–1920), установивший в 1892 г., что мозаичная болезнь табака (МБТ) вызывается инфекционным агентом, фильтрующимся через фарфоровые свечи Шамберлана с такими мелкими порами, которые задерживали известные в то время микроорганизмы. Более того, он гениально предположил, что мельчайший агент фильтрата листьев МБТ имеет корпускулярную структуру, а не является *contagium vivum fluidum* (жидким живым началом), как утверждал в 1899 г. повторивший исследование Ивановского знаменитый голландский микробиолог Мартин Бейеринк.

В клетках листьев, пораженных МБТ, Ивановский сумел в световом микроскопе увидеть также кристаллы, представляющие собой скопления вируса табачной мозаики, которые в 1935 г. получил в чистом виде выдающийся американский ученый-биохимик, первый лауреат Нобелевской премии по вирусологии Уэнделл Стенли. Позже, говоря о становлении вирусологии, он скажет: «В науке о вирусах имя Ивановского следует рассматривать почти в таком же свете, как имена Пастера и Коха в бактериологии».

В истории развития вирусологии можно выделить три периода. Первый из них начался с исследований Д.И. Ивановского. Используя его методику обнаружения вирусов, Ф. Леффлер и П. Фрош в 1898 г. доказали, что ящур коров, как и возбудитель МБТ, является фильтрующимся вирусом. Это первое открытие вирусной природы широко распространенной и очень опасной зоонозной болезни парнокопытных позволило признать, что описанные в 1892–1906 гг. внеклеточные элементарные тельца Э. Пашена и цитоплазматические включения Г. Гуарниери в эпителиальных клетках содержимого везикул и пустул (пузырьков) при натуральной оспе человека – тоже вирусы. Такие же включения-колонии вирусов обнаружили в 1898–1903 гг. В. Бабеш и А. Негри в цитоплазме нейронов мозга погибших от бешенства животных.

Большее число открытий новых вирусов пришлось на первое десятилетие XX в. Так, в 1901 г. У. Рид установил вирусную природу тропической желтой лихорадки. Семь лет спустя было доказано, что вирусными болезнями являются также полиомиелит (К. Ландштейнер и Э. Поппер), денге (П. Ашбери и Ч. Крейч) и лейкоз кур (В. Эллерманн и О. Банг), который в то время считали простым «системным разрастанием кроветворной ткани». Через три года в 1911 г. Пейтон Раус, использовав все тот же метод фильтрации вытяжки тканей саркомы кур, привел неопровержимые доказательства наличия в ней онкогенного ультравируса, способного вызывать аналогичную опухоль у здоровых птиц. К сожалению, это великое открытие было отмечено Нобелевской премией только спустя 55 лет. Меньше, но тоже немало времени понадобилось ждать Б.Э. Арагао и Э. Пашену (1911–1917), чтобы наконец была признана вирусная природа ветряной оспы, в кожных высыпаниях при которой закономерно выявляются элемен-

тарные тельца Арагао, всецело сходные с отмеченными выше тельцами его неутомимого соавтора, посвятившего вирусологии всю свою жизнь. Одновременно с ними Т. Андерсон и Дж. Гольдберг (1911) установили вирусную этиологию кори. Революционное открытие в 1917 г. сделал канадский ученый Ф. д'Эрелль, обнаружив фильтрующийся ультравирус, лизирующий дизентерийные бактерии, которые он назвал бактериофагом («пожирателем бактерий»). Стало очевидным, что среди вирусов имеются не только вредоносные, но и полезные для человека и животных вирусы-фаги.

Вторая волна открытий вирусов антропонозных болезней последовала за установлением в 1933 г. вирусной природы гриппа (У. Смит, К. Эндрюс и П. Лейдлоу). К началу Второй мировой войны к вирусным болезням были причислены эпидемический паротит (К. Джонсон и Э. Гудпасчур, 1934), японский летне-осенний комариный энцефалит (М. Хаяши и А.С. Смородинцев, 1934–1938), дальневосточный клещевой весенне-летний энцефалит (Л.А. Зильбер, М.П. Чумаков, В.Д. Соловьев и др., 1937), краснуха (Дж. Хиро, С. Тасака, 1938). Переломным в бурном развитии вирусологии первого периода явился 1940 г., когда Э. Гудпасчур предложил для выделения вирусов из материалов использовать куриные эмбрионы.

Второй, более высокий по своему уровню период развития в вирусологии стал возможным после того, как лауреаты Нобелевской премии Дж. Эндерс, Ф. Роббинс и Т. Уэллер завершили исследование по созданию однослойных культур клеток, а М. Бориес и Н. Руск сконструировали электронный микроскоп, усовершенствование которого позволило в 50–60-е гг. XX в. У. Роу с сотрудниками получить в чистой культуре аденовирусы, Г. Далдорфу и Г. Сиклсу – коксакивирусы, Дж. Эндерсу и Дж. Мельнику – экховирусы, Р. Чаноку – вирусы парагриппа, Дж. Моррису – респираторно-синцитиальный вирус, а С. Стюарту и Б. Эдди – вирус полиомы, вызывающий множественные опухоли у мышей.

Начало третьего этапа в вирусологии связывают с исследованиями лауреатов Нобелевской премии Х.М. Темина и Д. Балтимора, которые, выделив в 1970 г. из ретровирусов обратную транскриптазу, положили начало становлению генной инженерии. Поиски вирусной природы болезней человека и животных в этом периоде завершились

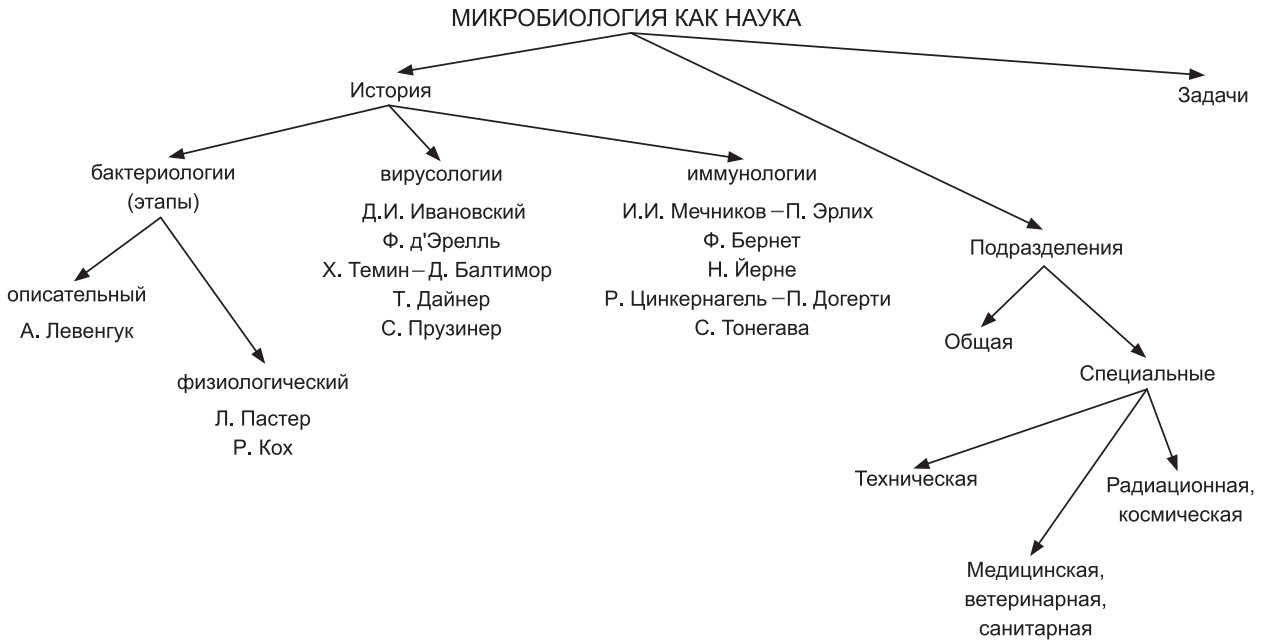
выделением вирусов гепатита В (Д. Дейна, 1970) и гепатита А (С. Файнстоу и соавторы, 1974), вироидов, вызывающих заболевания у растений (Т.О. Дайнер, 1972), близких к ним по свойствам прионов (С. Прузинер, 1982) и вируса иммунодефицита человека (Л. Монтанье, 1983; Р. Галло, 1984).

Этапы развития иммунологии. Основоположниками иммунологии, зародившейся в недрах микробиологии, являются лауреаты Нобелевской премии И.И. Мечников (1845–1916) и П. Эрлих (1854–1915), разработавшие клеточную и гуморальную теории иммунитета, которые в 50–70-х гг. XX в. получили всестороннее обоснование в исследованиях Ф. Бернета и Н. Йерне, создавших современную клонально-селекционную теорию. Согласно этой теории, в процессе длительной эволюции в организме человека и животных сформировалась гетерогенная популяция лимфоидных клеток, способных распознавать «свое» и «чужое» в борьбе с «чужим» и продуцировать всевозможные антитела. Экспериментальное подтверждение этому дал П. Медавар, открывший иммунологическую природу отторжения аллотрансплантатов. Р. Портер и Дж. Эдельман расшифровали структуру антител, а Ц. Мильштейн и Г. Келер разработали способ получения моноклональных антител на основе созданных ими гибридов. Иммунологическая роль В- и Т-лимфоцитов была установлена, когда доказали, что под влиянием антигенов В-клетки превращаются в плазмоциты, а из недифференцированных Т-клеток возникает несколько их субпопуляций, продуцирующих особые биологически активные вещества (цитокины), обусловливающие взаимодействие иммунокомпетентных клеток в гуморальном и клеточном иммунном ответах. В последние два десятилетия были раскрыты генетические механизмы соматической рекомбинации генов иммуноглобулинов как основы формирования разнообразия антигенраспознающих рецепторов лимфоцитов (С. Тонегава) и роль молекул МНС в презентации антигена (Р. Цинкернагель и П. Догерти). Все эти выдающиеся открытия были удостоены Нобелевских премий.

Русская школа микробиологов. Дореволюционная русская школа микробиологов формировалась в институ-

те Л. Пастера. Среди овеянных немеркнущей славой имен отметим старейшину отечественной микробиологии Н. Ф. Гамалея (1859–1949), совместно с И.И. Мечниковым создавшим в 1895 г. первую в России бактериологическую лабораторию, оспопрививательный институт в Петрограде (1918), Центральный институт микробиологии и эпидемиологии в Москве и вирусологические лаборатории в 30-х гг. XX в.; С.А. Виноградского, открывшего нитрифицирующие и азотфиксирующие бактерии; Ф.А. Леша, впервые обнаружившего дизентерийную амебу; П.Ф. Боровского – первооткрывателя возбудителя кожного лейшманиоза; Е.И. Марциновского – основателя отечественной паразитологии; создателей эпидемиологии Д.К. Заболотного и В.К. Высоковича; А.М. Безредки, положившего начало учению о местном иммунитете; бактериологов и иммунологов Г.Н. Габричевского, Л.С. Ценковского, И.Г. Савченко, Л.А. Тарасевича, В.И. Исаева и многих других. Большой вклад в развитие современной микробиологии внесли А.А. Смородинцев, М.П. Чумаков, П.Ф. Здродовский, Л.А. Зильбер, Р.В. Петров.

Задачи и успехи медицинской микробиологии. Главные задачи медицинской микробиологии – профилактика и лечение инфекционных болезней. Выдающиеся открытия в микробиологии позволили за полстолетия повсеместно ликвидировать натуральную оспу, снизить до спорадических (единичных) случаев широко распространенные ранее чуму, туляремию, сыпной и возвратные тифы, анкилостомидоз, мягкий шанкр, малярию, дифтерию, коклюш, полиомиелит, трахому, бешенство, столбняк, корь, лейшманиоз городского типа, тениаринхоз. Большие успехи достигнуты в профилактике клещевого энцефалита, клещевого возвратного тифа, бруцеллеза, аскаридоза, но по-прежнему трудна борьба с заболеваемостью острыми кишечными инфекциями, гриппом, туберкулезом, другими острыми инфекциями дыхательных путей, вирусными гепатитами. Разработаны эффективные меры пресечения экзотических (завозных) и карантинных инфекций, в частности желтой лихорадки. Проводятся интенсивные поиски вакцинопрофилактики и способов лечения СПИДа.


МИКРОБИОЛОГИЯ КАК НАУКА
История
Задачи
бактериологии
(этапы)
вирусологии
иммунологии
Д.И. Ивановский
Ф. д'Эрелль
Х. Темин – Д. Балтимор
Т. Дайнер
С. Прузинер
И.И. Мечников – П. Эрлих
Ф. Бернет
Н. Йерне
Р. Цинкернагель – П. Догерти
С. Тонегава
Подразделения
описательный
А. Левенгук
физиологический
Л. Пастер
Р. Кох
Общая
Специальные
Техническая
Радиационная,
космическая
Медицинская,
ветеринарная,
санитарная

Граф 1

СИСТЕМАТИКА И НОМЕНКЛАТУРА МИКРООРГАНИЗМОВ

Характеристика основных таксонов. Современная систематика, или таксономия (*taxis* – расположение, порядок + *nomos* – закон), микроорганизмов построена по общепринятой в биологии иерархической схеме, объединяющей в единое целое филогенетически родственные соподчиненные группы, или таксономические категории (*taxare* – оценивать), высшими из которых являются царства, подцарства, отделы (типы), последовательно подразделяющиеся на классы, отряды, семейства, трибы (группы), роды и виды.

В данном ряду систематических категорий основным таксоном (номенклатурной единицей) является вид (*species*). Дать ему исчерпывающее определение очень трудно. Приближенно под категорией *вид* подразумевают совокупность происходящей от одного предка скрещивающейся популяции, обладающей общим генофондом, экологическим единством и, если исключить некоторые виды бактерий, – репродуктивной изоляцией, т. е. между особями одного вида происходит свободный обмен генами, а между особями разных видов обмен ими невозможен или затруднен.

В составе популяций различают подвиды, штаммы и клоны. *Подвид* (*subspecies*) – географически или экологически обособленные популяции, в которых все или большинство особей отличаются одним или несколькими признаками от особей других популяций того же вида. *Штамм* (*stamm* – ствол) – культура определенного вида, выделенная из окружающей среды, патологических материалов человека и животных или полученная из музея, а *клон* (*klon* – росток) – генетически однородная культура микробов, происходящая из одной клетки.

В зависимости от штаммовых особенностей морфологии микроба, культуральных, биохимических, серологических (антигенных) свойств, его чувствительности к фагу и антибиотикам, степени патогенности различают несколько инфраподвидовых категорий: морфовары, культивары (биовары), хемовары, серовары, фаговары, резистенсвары, патовары и подвиды, отличающиеся друг от друга двумя-тремя особо важными признаками. Подобно

виду все они отличаются генетической обособленностью и репродуктивной изоляцией.

Кроме того, каждый вид микроорганизмов характеризуется определенной величиной молярного содержания гуанина и цитозина (Г+Ц) в процентах, которая у патогенных бактерий колеблется от 23–27 % (возбудители газовой гангрены) до 62–70 % (микобактерии туберкулеза). Большую роль в определении видовой принадлежности играет метод гибридизации нуклеиновых кислот, сущность которого состоит в том, что при смешении одноцепочечных ДНК родственных штаммов микробов образуется полноценная двухцепочечная гибридная молекула.

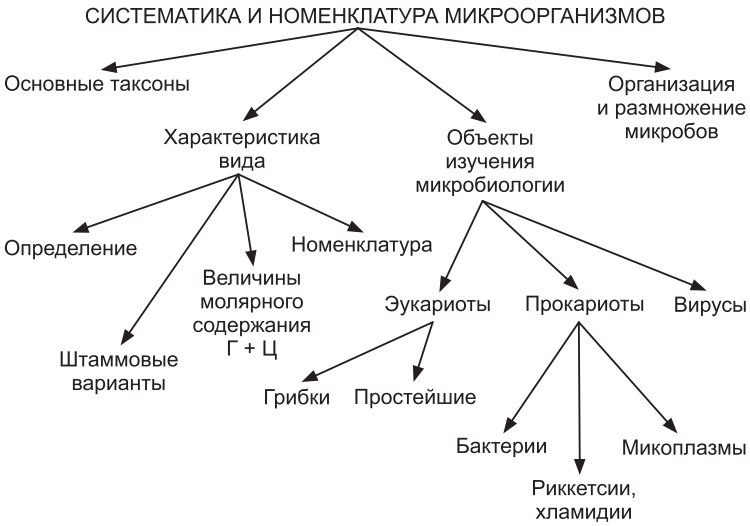
Каждый вид микроорганизмов, исключая вирусы, в соответствии с правилами биноминальной (двойной, бинарной) номенклатуры обозначается двумя латинскими словами, например *Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma pneumoniae, Plasmodium vivax, Candida albicans.* Первое слово, начинающееся с заглавной буквы, указывает на родовую принадлежность вида, второе – конкретно определяет вид. Названия подвидов и биоваров триноминальны: *Klebsiella pneumoniae subspecies ozenae, Vibrio cholerae биовар eltor*. Порядки и семейства пишутся тоже прописными буквами с окончаниями *-ales* (порядок) и *-ceae* (семейство): *Rickettsiales и Rickettsiaceae, Mycoplasmatales* и *Mycoplasmataceae.* Название различным таксономическим категориям дают по имени авторов, впервые описавших типовой штамм, либо по определяющему признаку, свойству, главному критерию вида.

Объекты изучения. Основными объектами изучения микробиологии служат самые низшие эукариоты (паразитические грибки и простейшие), прокариоты (бактерии, риккетсии, хламидии и микоплазмы), а также вирусы.

Общая организация и размножение микробов. *Эукариоты*, т. е. клетки с подлинными ядрами (*karyon*), подобны клеткам растений и животных. Они имеют поверхностную мембрану и внутриклеточную систему элементарных мембран, составляющих эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи. В цитоплазме эукариот содержатся оформленное ядро (ядра), митохондрии, рибосомы и ряд других органелл. Клеточная стенка эукариот имеет разный характер строения и степень выраженности, которые нередко зависят от стадии или фазы развития. Размножаются простые эукариоты половым и бесполым путем.

Прокариоты – клетки, не имеющие отграниченного ядра (*pro* – предшественники ядерных), внутриклеточных систем элементарных мембран и митохондрий, а некоторые – лишены также клеточной стенки. Размножаются амитотически: простым поперечным делением или почкованием.

Вирусы – микроорганизмы неклеточной структуры, являющиеся генетическими паразитами, репродукция которых внутри клеток происходит с помощью энергообменных систем клетки-хозяина.



Граф 2

Классификация царства прокариот по определителю Берги

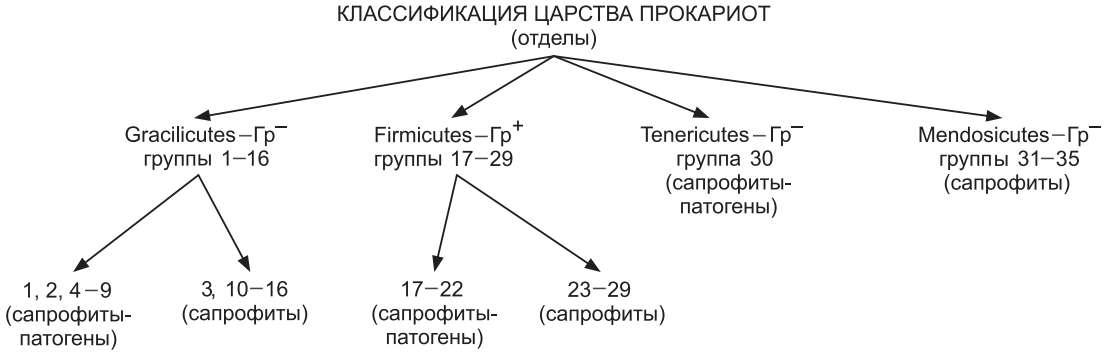
Виды прокариот идентифицируют (распознают) по определителю Д. Берги (*Bergeys Manual of Determinative Bacteriology-9*), изданному в 1994 г., в котором по структуре клеточной оболочки и отношению к окраске по методу Грама выделено четыре основных отдела (главных так-

сона): 1 – *Gracilicutes* (тонкостенные, окрашивающиеся грамотрицательно в розовый цвет), 2 – *Firmicutes* (толстостенные, окрашивающиеся грамположительно в фиолетовый цвет), 3 – *Tenericutes* (лишенные оболочек) и 4 – *Mendosicutes* (с дефектными оболочками), как правило, окрашивающиеся грамотрицательно.

Отделы определителя Берги, в свою очередь, подразделяются на группы. Так, грацилокуты включают 1–16-ю группы, фирмикуты – 17–29-ю, тенерикуты представлены одной 30-й, а мендозикуты – 31–39-й группами. В составе этих групп выделено более 200 родов прокариот, распределенных по семействам, подгруппам, изредка – порядкам (*Rickettsiales*) и классам (*Mollicutes*).

При этом детальному описанию видов предшествует обобщенная характеристика наиболее ярких признаков и отличий, используемых в их идентификации, как-то: 1) отношение к кислороду – аэробы – анаэробы, оксигенные – аноксигенные; 2) отношение к источникам энергии и питательных веществ – хемотрофы – фотоаутотрофы, хемоорганотрофы – фотоорганотрофы, диссимилирующие сульфат или сероредуцирующие бактерии; 3) особенности морфологии – спирохеты, палочки и кокки, эндоспорообразующие – неспорообразующие, подвижные – неподвижные палочки, почкующиеся, образующие – необразующие плоды и пр.

Подавляющее большинство прокариот – сапрофитические неболезнетворные виды, в частности это все виды 5 групп мендозикут. Патогенные для человека и животных виды встречаются в составе 13 групп среди различных родов и семейств: *Leptospira, Borrelia, Treponema* (гр. 1); *Campylobacter, Helicobacter, Spirillum* (гр. 2); *Bordetella, Brucella, Francisella, Legionella, Moraxella, Neisseria, Pseudomonas* (гр. 4); *Escherichia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Salmonella, Shigella, Yersinia, Vibrio, Haemophillus, Pasteurella* (гр. 5); *Bacteroides, Fusobacterium* (гр. 6); *Veilonella* (гр. 8); сем. *Rickettsiaceae, Bartonellaceae* и *Chlamydiaceae* (гр. 9); *Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus* (гр. 17); *Bacillus, Clostridium* (гр. 18); *Erysipelotrix, Listeria* (гр. 19); *Actinomyces, Corynebacterium* (гр. 20); *Mycobacterium* (гр. 21); *Nocardia* (гр. 22); *Mycoplasma, Ureaplasma* (гр. 30).


КЛАССИФИКАЦИЯ ЦАРСТВА ПРОКАРИОТ
(отделы)
Gracilicutes – Гр⁻
группы 1–16
Firmicutes – Гр⁺
группы 17–29
Tenericutes – Гр⁻
группа 30
(сапрофиты-
патогены)
Mendosicutes – Гр⁻
группы 31–35
(сапрофиты)
1, 2, 4 – 9
(сапрофиты-
патогены)
3, 10–16
(сапрофиты)
17–22
(сапрофиты-
патогены)
23–29
(сапрофиты)

Граф 3

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроскопы и способы микроскопирования

В микробиологических исследованиях применяются: 1) оптические и электронные микроскопы; 2) методы оптической и электронной микроскопии.

Оптический микроскоп. Наиболее важной оптической частью микроскопа являются объективы, которые по способу использования и степени увеличения делятся на сухие и иммерсионные.

Сухие объективы с относительно большим фокусным расстоянием и слабым увеличением применяются для изучения микроорганизмов, имеющих крупные размеры (более 10–20 мкм), иммерсионные (*immersio* – погружение) с фокусным расстоянием 1,5–3 мм – при исследовании более мелких микробов.

При микроскопии иммерсионным объективом (ИО) ×90 обязательным условием является его погружение в кедровое, персиковое или, при их отсутствии, в вазелиновое масло, показатели преломления света у которых близки предметному стеклу, на котором делают препараты (мазки). В этом случае падающий на препарат пучок света не рассеивается и, не меняя своего направления, попадает в иммерсионный объектив (рис. 1). Разрешающая способ-

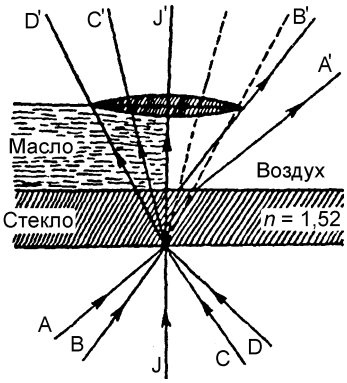


Рис. 1. Ход лучей (обозначен буквами) при прохождении через иммерсионное масло и воздух

ность иммерсионного микроскопа находится в пределах 0,2 мкм при максимальном увеличении объекта, которое может достигать 1350.

При использовании иммерсионного объектива вначале центрируют оптическую часть микроскопа. Если тубус микроскопа раздвижной, то его устанавливают на длину 160 мм, затем поднимают конденсор до уровня предметного столика, открывают диафрагму, устанавливают объектив ×8 и при помощи плоского зеркала освещают поле зрения. На предметное стекло с окрашенным препаратом наносят каплю масла, в которую под контролем глаза осторожно погружают объектив, затем, поднимая тубус, смотрят в окуляр и вначале макро-, а потом микровинтом устанавливают четкое изображение объекта. Закончив работу, поднимают тубус, снимают препарат, с фронтальной линзы объектива салфеткой удаляют масло и, отведя объектив в сторону, опускают к предметному столику.

Микроскопия в темном поле зрения. Производится при боковом освещении и обычно применяется при изучении подвижности бактерий или обнаружении патогенных спирохет, поперечник которых может быть намного меньше 0,2 мкм. Чтобы получить яркое боковое освещение, обычный конденсор заменяют специальным параболоид-конденсором, в котором центральная часть нижней линзы затемнена, а боковая поверхность – зеркальная. Этот конденсор задерживает центральную часть параллельного пучка лучей, образуя темное поле зрения. Краевые лучи проходят через кольцевую щель, попадают на боковую зеркальную поверхность конденсора, отражаются от нее и концентрируются в его фокусе. Если на пути луча нет каких-либо частиц, то он преломляется, падая на боковую зеркальную поверхность, отражается от нее и выходит из конденсора. Когда луч встречает на своем пути микробы, то свет отражается от них и падает в объектив – клетки ярко светятся.

Источником искусственного света служит осветитель ОИ-7 или лампа 100–150 Вт в металлическом футляре. Так как для бокового освещения необходим параллельный пучок света, то применяется только плоское зеркало микроскопа.

Обычно исследование в темном поле зрения проводится под сухой системой (объектив ×40). При этом небольшую

каплю материала помещают на предметное стекло и накрывают покровным, не допуская образования пузырьков воздуха. На верхнюю линзу конденсора наносят иммерсионное масло, которое должно заполнить пространство между ним и предметным стеклом. При микроскопии иммерсионной системой используют специальный объектив с диафрагмой, задерживающий лучи, беспрепятственно проходящие через гомогенную среду.

Фазово-контрастная и аноптральная микроскопия. Основаны на том, что оптическая длина пути света в любом веществе зависит от показателя преломления. Это свойство используют с целью увеличения контрастности изображения прозрачных объектов, какими являются микробы, т. е. для изучения деталей их внутреннего строения. Световые волны, проходя через оптически более плотные участки объекта, отстают по фазе от световых волн, не проходящих через них. При этом интенсивность света не меняется, а только изменяется фаза колебания, не улавливаемая глазом и фотопластинкой. Для повышения контрастности изображения фазовые колебания при помощи специальной оптической системы превращаются в амплитудные, хорошо улавливаемые глазом. Препараты в световом поле зрения становятся более контрастными – положительный контраст, при отрицательном фазовом контрасте на темном фоне виден светлый объект. Вокруг изображений нередко возникает ореол.

Большей четкости изображения малоконтрастных живых микробов (некоторых вирусов) достигают в аноптральном микроскопе. Здесь одной из важнейших деталей является линза объектива, расположенная вблизи его «выходного» зрачка, на которую нанесен слой копоти или меди, поглощающий не менее 10 % света. Благодаря этому фон поля зрения приобретает коричневый цвет, микроскопируемые объекты имеют различные оттенки – от белого до золотисто-коричневого.

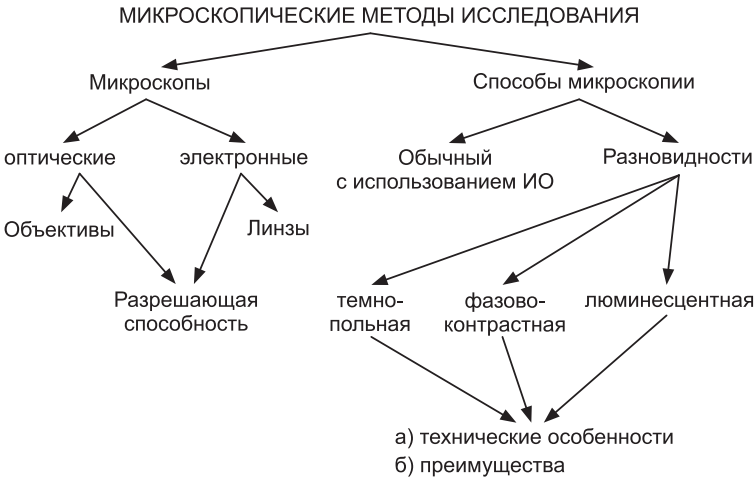
Люминесцентная микроскопия. Основана на способности некоторых клеток и красителей светиться при попадании на них ультрафиолетовых и других коротковолновых лучей света. Люминесцентные микроскопы представляют собой обычные световые микроскопы, снабженные ярким источником света и набором светофильтров, которые выделяют коротковолновую часть спектра, возбужда-

ющую люминесценцию. Между зеркалом микроскопа и источником света устанавливается сине-фиолетовый светофильтр (УФС-3, ФС-1 и пр.). На окуляр надевают желтый светофильтр (ЖС-3 или ЖС-18).

Различают собственную (первичную) и наведенную (вторичную) флюоресценции. Так как большая часть микробов не обладает собственной флюоресценцией, то они обрабатываются красителями, способными флюоресцировать (вторичная люминесценция).

Люминесцентная микроскопия отличается целым рядом преимуществ: дает цветное изображение и значительную контрастность; позволяет обнаружить живые и погибшие микроорганизмы; прозрачные и непрозрачные объекты; установить локализацию бактерий, вирусов и их антигенов в пораженных клетках организма.

Электронный микроскоп. В электронном микроскопе вместо света используется поток электронов в безвоздушной среде, на пути которых находится анод. Источником электронов является электронная пушка (вольфрамовая проволока, разогреваемая до 2500–2900 °С). Оптические линзы заменены электромагнитами. Между вольфрамовой нитью и анодом возникает электрическое поле в 30 000–50 000 В, что сообщает электронам большую скорость, и они, проходя через отверстие анода, попадают в первую электромагнитную линзу (конденсор). Электронные лучи по выходе из конденсора собираются в плоскости исследуемого объекта. Они отклоняются под разными углами за счет различной толщины и плотности препарата и попадают в объективную электромагнитную линзу, снабженную диафрагмой. Электроны, мало отклонившиеся при встрече с объектом, проходят через диафрагму; отклонившиеся под большим углом – задерживаются, благодаря чему обеспечивается контрастность изображения. Линза объектива дает промежуточное увеличение изображения, которое наблюдается через смотровое окно. Проекционная линза может увеличивать изображение во много раз. Это изображение принимается на флюоресцирующий экран и фотографируется. В зависимости от целей исследования используют мощность от 20 до 100 000 Вт. Разрешающая способность электронных микроскопов равна 3–4 ангстрема (10 Å = 1 нм). Для биологических объектов разрешение обычно составляет 1–2 нм.



Граф 4

Методики изготовления мазков-препаратов из материала (культур) и приготовление красителей

Мазки-препараты готовят из патологического материала (например, из гноя, мокроты, фекалий), колоний или налета чистых культур бактерий и грибков, выросших на питательных средах в чашках Петри или пробирках. Делают мазки на предметных стеклах, как правило, бактериальной петлей (диаметр 3 × 2 мм) из нихромовой проволоки, конец которой укрепляют зажимом в специальном петледержателе или впаивают в стеклянную палочку (рис. 2). Кроме того, для изготовления мазков необходимы газовая горелка или спиртовка, ванночка с подставкой (мостик) для стекол, промывалка с водой, флакон с физиологическим раствором, красители, фильтровальная бумага, банки с дезинфицирующим раствором для обезвреживания отработанных препаратов, пипеток, материалов и рабочего стола.

Этапы приготовления мазка. 1. Исследуемые материалы и культуры микробов берут бактериальной петлей, которую стерилизуют в пламени горелки. При ее введении в

пробирки и колбы стерилизуют не только петлю, но также верхнюю часть петледержателя. При этом пробирку с культурой берут большим и указательным пальцами левой руки, а бактериальную петлю держат правой, как писчую ручку. Пробку из ваты зажимают мизинцем правой руки и извлекают ее из пробирки. Края горлышка пробирки стерилизуют в пламени горелки и почти одновременно обжигают петлю, которую быстро вводят внутрь пробирки, охлаждают и прикасаются к налету на скошенном питательном агаре или же погружают ее в бульонную культуру. Затем петлю извлекают, быстро обжигают край пробирки, закрывают пробкой, проведенной через пламя, и ставят в штатив.

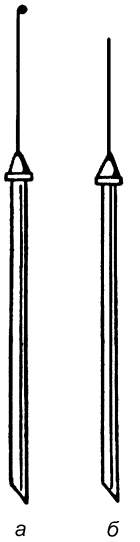


Рис. 2. Бактериальная петля (*а*) и бактериальная игла (*б*)

2. Налет чистой культуры микробов или колонию эмульгируют в капле воды на предметном стекле и круговыми движениями петли равномерно распределяют на площади диаметром 1,0–1,5 см. Точно такого же размера готовят мазок из бульонной культуры, гноя, мокроты, других материалов, которые, естественно, не взвешиваются в воде. Хорошо приготовленные тонкие мазки имеют округлую форму, быстро высыхают при комнатной температуре, более толстые – высушивают в термостате или при подогревании над пламенем горелки, не допуская свертывания белка бактерий и нарушения их структуры.

3. Высушенные мазки фиксируют 5–6 с в пламени спиртовки для того, чтобы убить микробы, которые в таком состоянии лучше воспринимают красители, закрепить их на предметном стекле и предотвратить смыв при ополаскивании мазка во время окраски.

Для приготовления мазков из гноя и мокроты пользуются двумя предметными стеклами. На середину одного из них наносят небольшое количество материала, который покрывают вторым стеклом так, чтобы осталась сво-

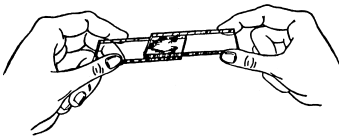


Рис. 3. Приготовление мазка из гноя и мокроты

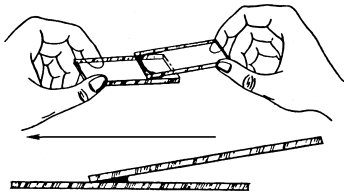


Рис. 4. Техника приготовления мазка из крови (стрелка показывает направление движения шлифованного стекла)

бодной треть первого и второго стекол. Раздвигая стекла в стороны (рис. 3), получают два больших мазка одинаковой толщины.

Мазки из крови готовят следующим образом. Стерильной иглой для инъекций делают укол предварительно продезинфицированного безымянного пальца левой руки. Первую каплю крови удаляют ватой, а вторую наносят на край хорошо обезжиренного предметного стекла. Мазки делают узким шлифованным стеклом, установленным под углом 45° (рис. 4), продвигая его вдоль предметного стекла влево, не доходя до края (мазок имеет желтоватый цвет и просвечивается).

Препараты-отпечатки из внутренних органов трупов, мяса, колбасных изделий получают, прикасаясь предметным стеклом к поверхности разрезов, выполненных стерильным скальпелем.

Приготовленные таким образом препараты из гноя, мокроты, крови, органов и тканей, деформирующихся при высокой температуре, обрабатывают: метиловым спиртом – 5 мин; этиловым спиртом – 10–15 мин; смесью Никифорова (равные объемы этилового спирта и эфира) – 10–15 мин; ацетоном – 5 мин; парами осмиевой кислоты и формалина – 10–20 с.

4. Фиксированные мазки окрашивают кислыми, щелочными и нейтральными анилиновыми красителями.

Наиболее широкое применение при *простом* (однократном) *методе* окраски мазков нашли водный фуксин Пфейффера и метиленовый синий Леффлера, везувин и генцианвиолет.

Водный фуксин готовится из концентрированного фенолового фуксина Циля (основной фуксин – 1 г; спирт 96 %-ный – 10 мл; фенол кристаллический – 5 г; глицерин – несколько капель; вода дистиллированная – 100 мл), разводя его дистиллированной водой в соотношении 1:10. При этом насыщенный кристаллами фенола фуксин Циля растирают в ступке до гомогенной массы, добавляя малыми порциями спирт. Затем, не прекращая помешивания, постепенно доливают 9 частей дистиллированной воды. Через 48 ч выдерживания при комнатной температуре, раствор фильтруют, и фуксин Пфейффера готов к употреблению.

Метиленовый синий Леффлера готовят путем прибавления к 30 мл насыщенного раствора метиленового синего (10 г метиленового синего в 100 мл 96 %-ного этилового спирта) 1 мл 1 %-ного натрия гидроксида или калия гидроксида и 100 мл дистиллированной воды; *везувин* – растворяя 2 г порошка в смеси 60 мл 96 %-ного спирта и 40 мл дистиллированной воды при нагревании до кипения, с последующей фильтрацией.

Для изготовления *генцианвиолет*а берут 1 г красителя и растворяют его в феноловом растворе – 100 мл дистиллированной воды + 2 г кристаллического фенола + 10 мл 96 %-ного этанола.

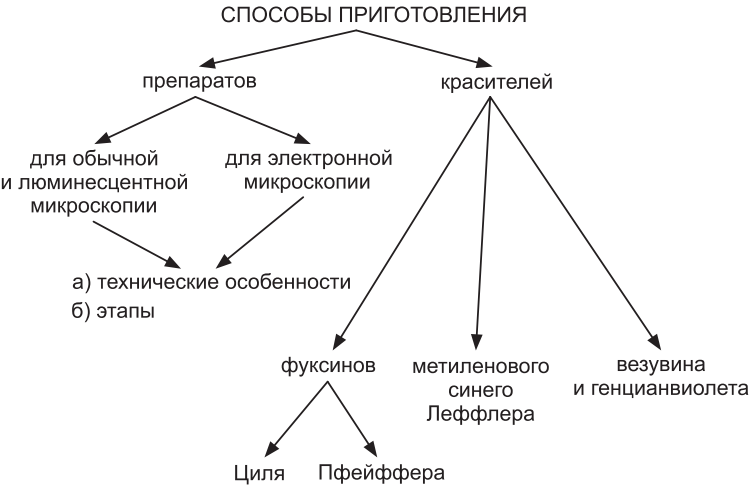
После окрашивания красители сливают, препарат промывают водой и высушивают между листами фильтровальной бумаги. На сухой мазок наносят каплю масла и микроскопируют с использованием иммерсионного объектива оптического микроскопа.

При *сложных методах* окраски мазков применяют два-три различных по цвету красителя, что позволяет дифференцировать микробы и выявлять некоторые нюансы в деталях их строения. К таким методам относят окраску по Граму, Цилю – Нельсену, Нейссеру, Бурри – Гинсу, Романовскому – Гимзе и некоторые другие.

Мазок для люминесцентной микроскопии готовят обычным образом, фиксируют в ацетоне 5–10 мин и наносят на него флюорохром на 20–30 мин. В качестве флюорохромов используют аурамин (обрабатывают микобактерии туберкулеза), акридин желтый (гонококки), корифосфин (коринебактерии дифтерии), флюоресцеинизотиоцианат (для мечения антител). Сделанный препарат 15–20 мин промывают проточной водой, покрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Для *электронной микроскопии* вместо предметных стекол применяются очень тонкие пленки-подложки, незначительно поглощающие электроны. Они крепятся на

опорные сетки. Материалом для приготовления пленок служит коллодий, оксид алюминия и кварц. Исследуемый материал, тщательно очищенный от различных примесей, наносят на пленку, на которой после испарения жидкости остается тончайший слой. Высушенный препарат устанавливают для микроскопирования. Контрастирование препаратов осуществляется с помощью электроноплотных (задерживающих электроны) веществ: напыление тяжелыми металлами, обработка препаратов фосфорно-вольфрамовой кислотой и уранилацетатом.



Граф 5

МОРФОЛОГИЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРА ПРОКАРИОТ

Эубактерии

Эубактерии (*eu* – истинные, *bacterium* – палочка) – одноклеточные бесхлорофильные организмы размером от 0,2 до 10 мкм, характеризующиеся всеми свойствами прокариот.

Структура и состав. Бактерии имеют очень низкую степень дифференциации и состоят из неструктурированного

ядра, цитоплазмы, цитоплазматической мембраны, клеточной стенки. Некоторые бактерии имеют жгутики, ворсинки, капсулы и способность к образованию эндоспор.

Функцию ядра у бактерий выполняет циркулярно-замкнутая и сильно скрученная компактно уложенная молекула ДНК. Такое неотграниченное мембраной ядро называют *нуклеоидом,* а в генетике – *геномом* или хромосомой. Обычно в покоящихся бактериях содержится один нуклеоид, который может быть обнаружен в виде ярко-малинового тельца неправильных очертаний на розовом фоне цитоплазмы при окраске мазка 1 %-ным водным раствором основного фуксина (1–2 мин) после его фиксации парами 2 %-ной осмиевой кислоты (2–3 мин), гидролиза в 1 н растворе соляной кислоты при температуре 60 °С (2–3 мин) с последующим помещением на 1,5 мин в 1 %-ный раствор формалина; а также с помощью микрохимической реакции Робиноу и Фейльгена на ДНК (или выявлено при электронно-микроскопических исследованиях ультратонких срезов бактерий).

Цитоплазма бактерий – это коллоидальная смесь полисахаридов, липидов, белков и других соединений. У многих видов бактерий в ней содержатся эквивалентные (идентичные) нуклеоиду небольшие и тоже циркулярно замкнутые молекулы ДНК, или плазмиды, детерминирующие образование ферментов, которые расщепляют многие антибиотики и сульфаниламиды. В цитоплазме находятся также рибосомы и запасные внутриклеточные вещества, например отложения поли-β-оксибутирата у возбудителей кишечных инфекций и зерна волютина (полифосфаты) на концах коринебактерий дифтерии. При окраске щелочным метиленовым синим по Леффлеру (3–5 мин) гранулы волютина у дифтерийных коринебактерий приобретают темно-синий цвет, а палочка – голубой. По Нейссеру они окрашиваются в сине-черный, а бактерия – в желтый цвет. При этом окраску мазка производят: 1) 1 мин уксусно-кислым метиленовым синим (метиленовый синий – 0,1 г, спирт – 2 мл, ледяная уксусная кислота – 5 мл, дистиллированная вода – 100 мл); 2) сливают краситель и мазок промывают водой; 3) на 20–30 с наносят раствор Люголя (300 мл дистиллированной воды + 2 г калия йодида + 1 г кристаллического йода); 4) 1–3 мин окрашивают везувином.

Цитоплазматическая мембрана бактерий – это обособленная от клеточной стенки и цитоплазмы полупроницаемая структура толщиной 5–10 нм, состоящая из двойного слоя фосфолипидов, пронизанных белковыми молекулами. Она служит осмотическим барьером и главным местом метаболической активности бактерий. С нею связаны пермеазы, которые осуществляют транспорт питательных веществ, и ферменты синтеза различных классов макромолекул, в том числе основного компонента клеточной стенки – пептидогликана. При впячивании цитоплазматической мембраны внутрь клетки образуются мезосомы, выполняющие функцию генераторов энергии, участвующие в репликации ДНК и построении поперечной перегородки при делении бактерий.

Клеточная стенка – это внешняя структура бактерий, отделенная от цитоплазматической мембраны очень узким ободком периплазматического пространства. У одних видов бактерий она имеет однородную структуру толщиной от 20 до 80 нм, а у других – состоит из двух более тонких слоев, в которых различают внутренний (ригидный) слой (2–3 нм) и наружный (6–18 нм). У всех бактерий клеточная стенка несет в основном формообразующую и защитную функции. Прочность ее обусловливает пептидогликан, состоящий из параллельно чередующихся полисахаридных (гликановых) цепей, поперечно скрепленных пептидными связями.

У бактерий с однослойной клеточной стенкой количество пептидогликана составляет 50–80 % от ее веса, у бактерий с двухслойной – не более 10 % (и только в ригидном слое). Остальная масса оболочки у первых представлена полисахаридами и тейхоевыми кислотами, а у вторых – белками, липополисахаридами и липопротеидами.

Количественное содержание пептидогликана, обусловливающее толщину стенки, определяет характер окраски бактерий и других прокариот по Граму. Те из них, которые содержат в клеточной стенке большое его количество, окрашиваются по Граму в сине-фиолетовый цвет (грамположительные фирмикуты), все другие, содержащие в оболочке 5–20 % пептидогликана, – в розовый (грамотрицательные грацилокуты).

При действии лизоцима, пенициллина и некоторых других веществ, разрушающих пептидогликан или нару-

шающих его синтез, бактерии вначале превращаются в сферопласты (мендосикуты), а далее, полностью утрачивая клеточную стенку, – в бесформенные протопласты (тенерикуты), быстро подвергающиеся плазмолизу. Дефектные по клеточной стенке грамотрицательные бактерии, образующиеся в организме, обладающие жизнеспособностью и патогенностью, называют в честь института Листера, где были открыты, L-формами.

Техника окраски по Граму:

1) фиксированный мазок 1–2 мин окрашивают раствором генцианвиолета (по методу Синева его покрывают пропитанной тем же красителем полоской фильтровальной бумаги, которую смачивают 2–3 каплями воды);

2) слив генцианвиолет (сняв полоску бумаги Синева), мазок 1 мин обрабатывают раствором Люголя и, не промывая водой, сливают (снимают) его;

3) обесцвечивают спиртом в течение 0,5 мин, промывают водой;

4) окрашивают 1–2 мин фуксином Пфейффера;

5) мазок ополаскивают водой и высушивают.

Для выявления грамположительных кислото- и спиртоустойчивых микобактерий туберкулеза и лепры, которые из-за большого количества в клеточных оболочках жировосковых веществ, миколовой кислоты и других оксикислот непроницаемы для разведенных растворов красителей, используется *окраска по методу Циля – Нельсена*. Окрашивание по этому методу достигается при помощи концентрированного фенолового фуксина Циля с подогреванием над пламенем горелки до закипания и отхождения паров. Окрашенные с применением термокислотной обработки микобактерии не обесцвечиваются слабыми растворами минеральных кислот и этилового спирта.

Техника окраски по Цилю – Нельсену:

1) фиксированный мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги, на которую наносят фуксин Циля, и несколько раз подогревают над пламенем горелки до появления паров, подливая краситель; далее бумагу снимают и промывают водой;

2) препарат обесцвечивают 5 %-ным (0,5 %-ным – при выявлении микобактерий лепры) раствором серной кислоты и промывают водой;

3) на мазок наливают водно-спиртовой раствор метиленового синего, спустя 3–5 мин промывают водой и высушивают – кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в интенсивно-красный цвет, остальные виды микробов, обесцвечивающиеся в процессе обработки препарата кислотой, – в светло-синий цвет.

При необходимости дифференциации возбудителей лепры от микобактерий туберкулеза используют *окраску мазков по методу Семеновича – Марциновского:*

1) фиксированный препарат окрашивают в течение 2 мин разведенным 1:3 феноловым фуксином Циля и промывают водой;

2) в течение 3–5 мин обрабатывают щелочным раствором метиленового синего, промывают, высушивают и микроскопируют. Микобактерии лепры окрашиваются в красный цвет, а микобактерии туберкулеза остаются невидимыми вследствие того, что такая концентрация фуксина без термокислотного протравливания в их оболочку не проникает.

Капсула – ослизненный слой клеточной стенки, состоящий из полисахаридов (стрептококк пневмонии) или полипептидов (бацилла сибирской язвы). Способность к образованию микрокапсулы имеется у большинства бактерий, но четко выраженную макрокапсулу формируют только пневмококк, клебсиеллы пневмонии, озены, риносклеромы и возбудитель сибирской язвы. В организме человека и животных капсула защищает патогенные бактерии от фагоцитоза и гуморальных (*humor* – влага) сывороточных микробоцидных веществ. На искусственных питательных средах капсула обычно утрачивается, исключение составляет группа клебсиелл.

Для обнаружения капсул бактерий, плохо воспринимающих красители, используют специальные методы окраски Бурри – Гинса и Книги.

Окраска капсул по методу Бурри – Гинса:

1) в каплю туши, разведенной 10 раз водой, вносят исследуемые бактерии и равномерно распределяют их петлей по предметному стеклу;

2) мазок высушивают и фиксируют (наносят 2–3 капли спирта и сжигают его на стекле);

3) окрашивают в течение 3–5 мин фуксином Пфейффера, промывают водой, высушивают. На темном фоне пре-

парата капсулы видны в виде светлых ореолов вокруг красных бактерий (рис. 5).

Окраска капсул по методу Книги:

1) на обезжиренное предметное стекло наносят каплю неразведенной нативной сыворотки, добавляют каплю суточной бульонной культуры бактерий и тщательно их перемешивают;

2) ребром шлифованного предметного стекла делают тонкий мазок;

3) после высушивания его в течение 5 мин фиксируют метиловым спиртом;

4) окрашивают 1 мин 1 %-ным феноловым раствором генцианового фиолетового, разведенным 1:10, и промывают водой. По сравнению с интенсивно окрашенными в фиолетовый цвет бактериями капсулы-ореолы вокруг них имеют едва видимый фиолетовый оттенок.

Жгутики – органы движения бактерий, представляющие собой вращающиеся полужесткие спирально изогнутые нити из белка флагеллина, который обладает способностью сокращаться. Они отходят от базальных телец, вмонтированных в цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку бактерий. Как правило, длина жгутиков превосходит длину бактерий и колеблется от 5 до 10 мкм. Увидеть отдельные жгутики в оптическом микроскопе невозможно потому, что их поперечник не больше 10–30 нм.

По типу расположения и числу жгутиков бактерии подразделяют на четыре группы (рис. 6): 1) монотрихи, имеющие один жгутик на полюсе клетки; 2) лофотрихи –

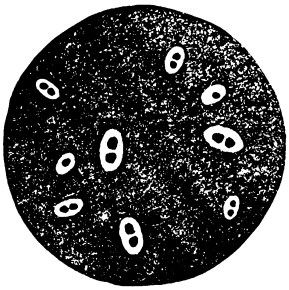


Рис. 5. Капсулы бактерий

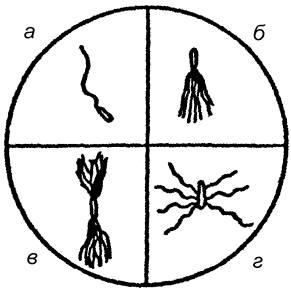


Рис. 6. Жгутики бактерий:
а – монотрихи; *б* – лофотрихи;
в – амфитрихи; *г* – перитрихи

с пучком жгутиков на одном из концов палочки; 3) амфитрихи – с двумя пучками жгутиков на полюсах; 4) перитрихи – со множеством жгутиков вокруг бактерий. Жгутикование характерно для кишечных бактерий, клостридий столбняка и ботулизма (перитрихи), холерного вибриона (монотрих), возбудителей содоку (амфитрихи), щелочеобразователя (лофотрихи).

Под иммерсионным микроскопом жгутики становятся видимыми лишь после специальных методов их протравливания и импрегнации солями серебра или ртути; пучки их у бактерий-мультитрихов сравнительно легко обнаруживаются на полюсах в фазово-контрастном микроскопе.

О наличии жгутиков чаще всего судят по направленному характеру движения бактерий в раздавленной и висячей каплях при опущенном конденсоре и частично прикрытой диафрагме микроскопа. Для этого: 1) на середину предметного стекла наносят каплю суточной бульонной культуры бактерий и осторожно накрывают ее покровным стеклом так, чтобы жидкость не растекалась за его края и в нее не попадали пузырьки воздуха (раздавленная капля), или 2) ту же каплю бактерий наносят на середину покровного стекла и накладывают на него специальное предметное стекло с лункой, смазанное вокруг нее вазелином так, чтобы капля находилась в центре углубления (рис. 7). Препарат осторожно переворачивают, и капля свисает в герметически закрытой полости (висячая капля).

Раздавленную и висячую капли микроскопируют при опущенном конденсоре, регулируя поступление света вогнутым зеркалом. Вначале пользуются малым увеличением (объектив ×8), а затем сухим объективом ×40 или иммерсионным ×90. Лучшие результаты дает микроскопия в темном поле или в фазовом контрасте.

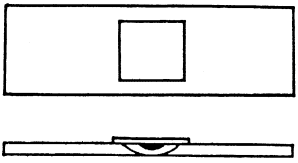


Рис. 7. Раздавленная и висячая капли

Фимбрии и пили (ворсинки) – субмикроскопические нитевидные образования белковой природы (3–20 нм × 0,3–10 мкм). Среди них выделяют фимбрии трех типов: многочисленные фимбрии общего типа, ответственные за адгезию (прилипание к поражаемой клетке); фимбрии, ответственные за пи-

тание; единичные половые F-пили клеток-доноров, обусловливающие трансмиссивную передачу генов (конъюгацию) и являющиеся рецепторами для бактериальных РНК-вирусов (фагов).

Эндоспора – особая форма существования или стадия развития отдельных видов бактерий в неблагоприятных условиях. У патогенных бактерий процесс спорообразования происходит вне организма, например в конце развития культуры на искусственных питательных средах, когда в них накапливаются вредные продукты метаболизма, или в окружающей среде, куда они попадают с выделениями человека и животных.

Формирование эндоспоры начинается с деления нуклеоида, уплотнения и обособления определенного участка цитоплазмы вегетативной клетки, а заканчивается образованием внутри бактерии круглого или овального тельца, покрытого плотной многослойной оболочкой, которая пропитана большим количеством липидов, кальция, дипиколиновой кислоты. После полного созревания споры материнская бактерия лизируется, но если сохраняется, то внутри нее спора четко контурируется, напоминая блестящее зерно. Среди патогенных бактерий споры формируют только крупные палочки. По отношению к их длине у разных видов бактерий споры располагаются в центре, субтерминально или терминально. При этом если размер споры не превышает поперечника палочки, то последняя имеет правильную цилиндрическую форму и называется бациллой (*bacillus* – палка), а если она больше, то бактерии вздуваются и становятся веретенообразными – клостридиями (*closter* – веретено). Патогенной бациллой является возбудитель сибирской язвы. Спора у нее круглая, находится в центре палочки. Клостридии газовой гангрены имеют типичную форму веретена, клостридии ботулизма с эллипсовидной спорой напоминают теннисные ракетки, а клостридии столбняка с круглой спорой – барабанную палочку (рис. 8).

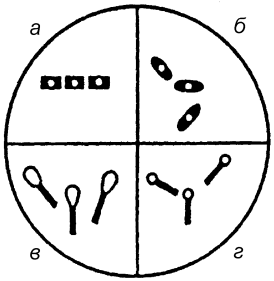


Рис. 8. Споры бактерий:
а – бациллы; *б* – клостридии газовой гангрены; *в* – ботулизма; *г* – столбняка

Эндоспоры бактерий выдерживают длительное кипячение, действие горячего воздуха (140–150 °С) и химических дезинфицирующих веществ, многие годы сохраняются в почве, на растительности и предметах. Попадая в организм человека и животных, споры патогенных бактерий прорастают в материнские клетки за несколько часов.

Водным фуксином, водно-спиртовым метиленовым синим и по Граму эндоспоры не окрашиваются, так как их плотная многослойная оболочка непроницаема для обычных красителей. В мазках из патологических материалов, культур бацилл и клостридий, окрашенных простыми красителями, споры выглядят в виде бесцветных телец внутри окрашенных в соответствующий цвет вегетативных клеток или вне их. Окрашивать их можно по методу Циля – Нельсена, используя для обесцвечивания мазков после обработки их фуксином Циля не 5 %-ную, а 1 %-ную серную кислоту. При этом эндоспоры, как и микобактерии туберкулеза, окрашиваются в розовый цвет и хорошо контурируются на синем фоне бацилл и клостридий. Чаще для окрашивания спор используют специальные методы по Пешкову или Шефферу – Фультону.

Окраска спор по Пешкову. На фиксированный мазок наливают метиленовый синий Леффлера. Нагревают препарат в средней части пламени, кипятят 15–20 с, не допуская высыхания. Остывший препарат промывают водой, докрашивают 30 с 0,5 %-ным раствором нейтрального красного, затем снова промывают водой и высушивают. Споры окрашиваются в голубовато-синий цвет, тело бацилл и клостридий – в розовый.

Окраска спор по Шефферу – Фультону. Фиксированный мазок окрашивают 5 %-ным водным раствором малахитового зеленого, 3–4 раза нагревая его до появления паров, промывают водой и докрашивают 0,5 %-ным водным раствором сафранина. Споры окрашиваются в зеленый цвет, тело бактерий – в красный.

Морфологические и тинкториальные особенности бактерий. Описание бактерий проводится по определенной схеме. Прежде всего отмечается форма, размер и характер их расположения в мазке, а затем основные струк-

турные особенности вида – жгутикование, образование капсул и спор, наличие включений и, наконец, способность окрашиваться.

По внешнему виду различают шаровидные, палочковидные, извитые и нитевидные формы бактерий, а по тинкториальным свойствам – грамположительные и грамотрицательные.

Шаровидные бактерии называются кокками (*coccus, kokkos* – зерно). Средний диаметр патогенных кокков – около 1 мкм. В зависимости от их расположения в мазке, что определяется характером деления клеток, патогенные кокки подразделяют на диплококки (*diploos* – парные), стрептококки (*streptos* – цепочечные), стафилококки (*staphyle* – гроздевидные). Диплококки и стрептококки делятся в одной плоскости, но остаются соединенными цитоплазматическими мостиками. Стафилококки делятся в двух плоскостях и образуют скопления клеток, напоминающие грозди (рис. 9). Непатогенные кокки располагаются беспорядочно (микрококки), тетрадами и пакетами по 8–16 особей, вследствие чего их называют сарцинами (*sarcio* – связываю). При этом тетракокки и сарцины делятся в двух-трех плоскостях.

Патогенные кокки могут быть правильно круглыми (стафилококки), овальными (стрептококки), бобовидными (диплококки). Непатогенные микрококки, тетракокки и сарцины имеют округлую форму.

Спор и жгутиков патогенные кокки не образуют. Капсулы имеют только некоторые стрептококки, в частности пневмококк. Стафилококки и стрептококки – грамположительные, а диплококки – грамотрицательные.

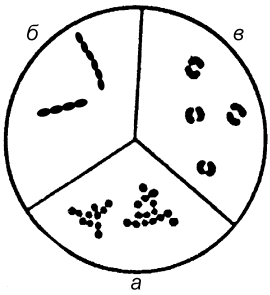


Рис. 9. Шаровидные бактерии: *а* – стафилококки; *б* – стрептококки; *в* – гонококки и менингококки

Палочковидные формы бактерий тоже весьма разнообразны (рис. 10). Среди них встречаются прямые, изогнутые и даже ветвистые формы (микобактерии туберкулеза). Большинство патогенных палочковидных бактерий имеют ово-

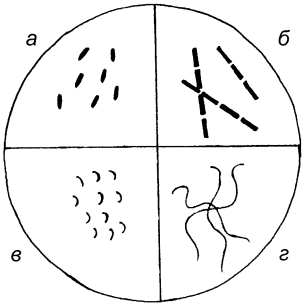


Рис. 10. Палочковидные бактерии: *а* – прямые с закругленными концами; *б* – с обрубленными концами; *в* – изогнутые; *г* – нитевидные

идную форму. Исключение составляют цилиндрические бациллы сибирской язвы, веретенообразные клостридии, булавовидные коринебактерии (*coryna* – булава) и заостренные микобактерии туберкулеза.

Длина наименьших коккобактерий колеблется от 0,2 до 1,5 мкм, а самых больших – бацилл и клостридий – от 5 до 10 мкм.

Обычно палочковидные бактерии имеют однообразное гомогенное строение, однако встречаются зернистые варианты (микобактерии туберкулеза).

Располагаются палочки, как правило, беспорядочно, попарно в длину (капсульные клебсиеллы), параллельно (микобактерии) или под углом, образуя фигуры в виде X или V (коринебактерии дифтерии), а некоторые – цепями (возбудители сибирской язвы).

Многие виды патогенных палочковидных бактерий имеют жгутики и капсулы. Споры образуют бациллы и клостридии. Коккобактерии – истинные палочки длиной 3 мкм и шириной 0,3–0,4 мкм – окрашиваются грамотрицательно. Бациллы, клостридии, коринебактерии, микобактерии, размеры которых больше средних палочек, грамположительны.

Извитыми бактериями являются вибрионы, спириллы и спирохеты. Вибрионы (*vibrio* – извиваюсь) – изогнутые в виде запятой палочки (3–4 × 0,3 мкм) с полярным жгутиком; спириллы (*spira* – завиток) – спирально извитые палочки размером 2–4 × 0,4–0,5 мкм с одним-тремя витками и биполярным, политрихиальным жгутикованием. Спор и капсул не образуют.

В мазке вибрионы располагаются в виде паутинки, а спириллы – беспорядочно; окрашиваются грамотрицательно.

Примечание: в скобках бактериологи, предложившие методы окраски

Граф 6

Спирохеты

Таксономия. Род *Spirochaeta* (*speira* – изгиб, виток, *chaite* – волосы) – спирально извитые, очень тонкие, обладающие активной подвижностью бактерии, включенные в семейства *Spirochaetaceae* и *Leptospiraceae* порядка *Spirochaetales*.

Ультраструктура. Спирохеты состоят из цитоплазматического цилиндра, в котором содержатся нуклеоид, рибосомы, мезосомы. В отличие от других бактерий в их цитоплазме имеется одна или несколько перекрывающих друг друга осевых фибрилл, берущих начало от полярных (субтерминальных) прикрепительных дисков и тянущихся к противоположному концу спирохеты. Выходя за пределы клетки, осевые фибриллы могут имитировать жгутики. Тело спирохеты покрыто тонкой эластичной внешней оболочкой, тесно прилегающей к цитоплазматической мембране. Размножаются спирохеты поперечным делением.

Морфология. Спирохеты различаются по количеству и форме завитков, длине и толщине нити, а также по тинкториальным свойствам. В результате сократительной способности фибрилл, состоящих из флагеллина, спирохеты обладают поступательным, сгибательным и вращательным движением. Защитных приспособлений не образуют, в мазке располагаются беспорядочно; грамотрицательны. Подвижность спирохет изучают с помощью фазово-контрастной и темнопольной микроскопии в раздавленной капле.

Структурные особенности возбудителей спирохетозов. Патогенные для человека спирохеты относятся к трем родам: *Treponema* (*trepo* – вращаю, *nemo* – нить), *Leptospira* (*leptos* – тонкий), *Borrelia* (в честь А. Борреля). Каждый род и вид спирохет имеет характерные морфологические особенности (рис. 11). Так, *Treponema pallidum* (бледная) вызывает сифилис. По форме она штопорообразная, с 8–14 туго закрученными и одинаковыми по амплитуде завитками. Размеры бледной трепонемы колеблются от 5 до 20 мкм в длину

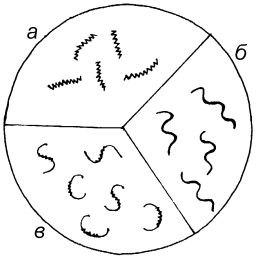
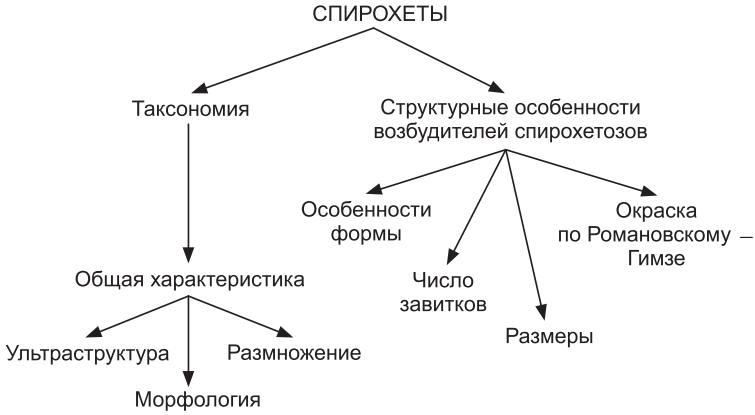


Рис. 11. Спирохеты:
а – трепонемы; *б* – боррелии; *в* – лептоспиры

и 0,2–0,3 мкм в ширину. По Романовскому – Гимзе окрашиваются в бледно-розовый цвет.

Leptospira interrogans (*interrogate* – неопределенный) вызывает лептоспироз. Имеет сигмовидную или С-образную форму, около двух десятков мелких завитков, нередко с крючками на концах, длиной 6–20 мкм и настолько малой шириной (в среднем 0,1 мкм), что их предпочтительнее изучать в темнопольном микроскопе. По Романовскому – Гимзе окрашивается в розовый цвет.

Borrelia recurrentis вызывает возвратный тиф (рекурренс). Боррелии – неправильно изогнутые спирохеты, с двумя-тремя и более завитками неравномерной высоты, длиной 5–50 мкм и шириной 0,2–0,5 мкм. Легко выявляются в иммерсионном микроскопе. Хорошо окрашиваются многими анилиновыми красителями, в частности по Романовскому – Гимзе – в сине-фиолетовый цвет.



Граф 7

Актиномицеты

Таксономия. Род *Actinomyces* (*actis* – луч, *mykes* – гриб) – это сборная группа бактерий семейств *Actinomycetaceae* и *Streptomycetaceae* порядка *Actinomycetales*.

Морфология. Актиномицеты имеют вид палочек, небольших разветвленных нитей (сем. *Actinomycetaceae*) или длинных тонких несептированных ветвящихся гиф

(сем. *Streptomycetaceae*). На конце некоторых актиномицетов образуется одна или несколько экзоспор, которые являются органами плодоношения. Спороносцы актиномицетов – прямые, волнистые и спиральные; споры – круглые, овальные и цилиндрические с гладкой, волосистой, бородавчатой или шиповидной поверхностью. Размеры актиномицетов колеблются от 5,0–7,0 до 100 мкм и более в длину и 0,5–2,0 мкм в ширину. Жгутиков, капсул и эндоспор не образуют. Легко окрашиваются многими анилиновыми красителями, грамположительны.

Способы размножения. Размножаются простым поперечным делением, путем прорастания гиф и спор, почкованием.

Роль актиномицетов в природе и медицине. Актиномицеты широко распространены в природе. Большинство из них обитает в верхнем слое хорошо унавоженной почвы, где они участвуют в разложении сложных веществ, в том числе клетчатки и неорганических полимеров. Многие почвенные актиномицеты, образующие истинный мицелий (стрептомицеты), продуцируют антибиотики, которые используются для лечения инфекционных заболеваний. Актиномицеты-симбионты организма, обитающие в ротовой полости, дыхательных путях, кишечнике и на коже человека, могут оказывать ингибирующее действие на патогенные бактерии, микоплазмы и грибы, т. е. являются фактором антиинфекционной защиты.

Патогенные виды. Для человека патогенны очень немногие виды актиномицетов, главным образом представители родов *Actinomyces* и *Nocardia*, впервые описанные Э. Нокаром. Заболевание, вызванное истинными актиномицетами, называется актиномикозом, а нокардиями – нокардиозом. Возбудителями актиномикоза чаще всего являются *A. bovis* (*bovis* – бык), поражающий крупный рогатый скот, и *A. israelii*, выделенный Д. Израэлем. Как правило, они имеют вид булавовидных раздвоенных бацилл, реже – коротких нитей с истинным ветвлением (рис. 12, *а, б*). Нередко при актиномикозе в гнойном содержимом распада-

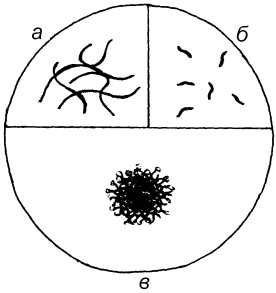
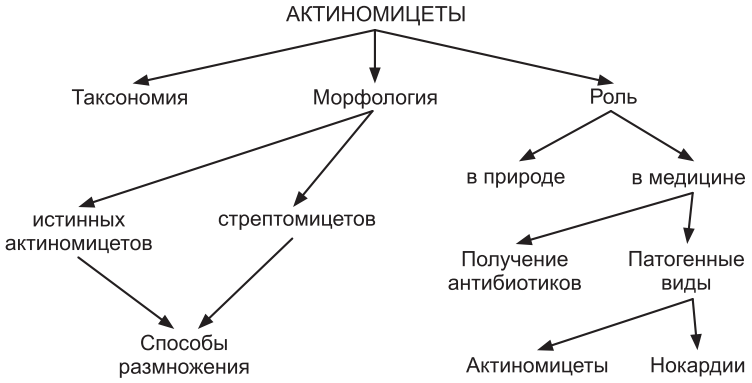


Рис. 12. Актиномицеты: *а* – *Act. bovis*; *б* – *Act. israelii*; *в* – друза

ющихся гранулем обнаруживаются серовато-желтые зерна-песчинки, или друзы (рис. 12, *в*). Центральная часть друзы бесструктурна и пропитана солями кальция, периферия состоит из колбовидно вздутых нитей. По Граму центр друзы окрашивается положительно, а окружающий его венчик колб – отрицательно.

Нокардиоз в природных условиях вызывается *N. asteroides* (*aster* – звезда). Этот возбудитель имеет мицелиальную форму с преобладанием в культуре нитевидно ветвящихся гиф, часть из которых распадается на палочки и кокки. Нокардии грамположительны, обладают слабой кислотоустойчивостью.



Граф 8

Риккетсии

История открытия. Риккетсии – многочисленная группа бактерий-паразитов, названная именем их первооткрывателя, американского ученого Г. Риккетса, который, установив природу пятнистой лихорадки Скалистых гор Северной Америки, в 1910 г. погиб в результате внутрилабораторного заражения. Окончательные доказательства этиологической роли риккетсий в возникновении болезней у человека были получены в 1916 г. Г.Х. Роха-Лимой, а затем Г.Р. Коксом, разработавшим способ культивирования риккетсий в желточном мешке куриных эмбрионов.

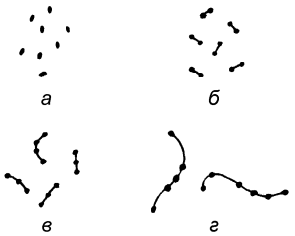


Рис. 13. Риккетсии: *а* – кокковидные; *б* – бактериальные; *в* – бациллярные; *г* – нитевидные

Большинство риккетсий – безвредные симбионты-мутуалисты, но некоторые виды вызывают заболевания у человека.

Патогенные риккетсии относятся к родам *Rickettsia, Rochalimaea, Coxiella* семейства *Rickettsiaceae* порядка *Rickettsiales*.

Род *Rickettsia* делят на три группы, в состав которых входит восемь видов риккетсий, вызывающих у человека лихорадочные заболевания (риккетсиозы), сопровождающиеся кожными высыпаниями (в частности, эпидемический сыпной тиф). Род *Rochalimaea* включает возбудителя траншейной волынской (пятидневной) лихорадки, *Coxiella* – возбудителя Ку-лихорадки (*query* – неясный).

Морфология. Риккетсии – плеоморфные и разнообразные по величине микроорганизмы (рис. 13). Чаще всего имеют форму коккобактерий размером 0,8–2 мкм в длину и 0,3–0,6 мкм в ширину. При этом они могут располагаться в цитоплазме и ядре клеток или только в цитоплазме или же в ядре.

Размножение. Риккетсии размножаются бинарно, путем поэтапного отшнуровывания или одновременной фрагментации палочек.

Основные способы окраски. По Граму риккетсии окрашиваются отрицательно. Для их дифференциации чаще применяется предложенная П.Ф. Здродовским облегченная модификация способа Циля – Нельсена: окраска водным карболфуксином (5 мин) с последующей обработкой мазка в 0,5 %-ной лимонной кислоте (1–3 с) и докрашиванием 1 %-ным раствором метиленового синего (10 с). Обладая относительной кислотоустойчивостью, риккетсии окрашиваются в рубиново-красный цвет и легко обнаруживаются на фоне голубой цитоплазмы или синего ядра клеток. По Романовскому – Гимзе риккетсии окрашиваются в сиреневый цвет; при внеклеточном расположении – часто имеют вид биполярных палочек или гантелек. Спор, капсул и жгутиков не образуют.

В целях идентификации применяется реакция иммунофлюоресценции, позволяющая по характерному свечению в люминесцентном микроскопе обнаружить и установить природу внутриклеточных коккобактерий, цито-

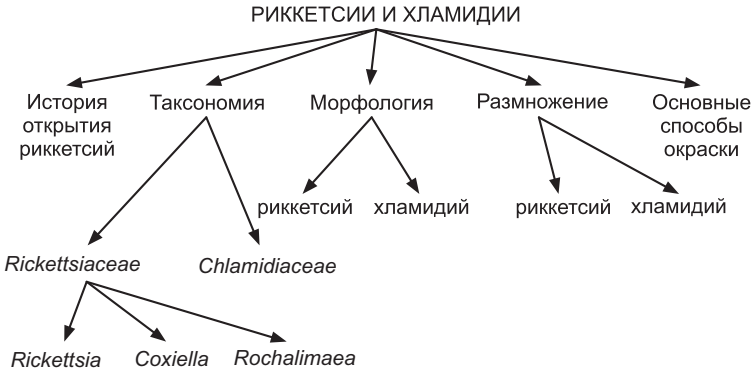
плазматических включений и даже некорпускулярных антигенов различных видов риккетсий.

Хламидии

Таксономия. Род *Chlamydia* (*chlamydos* – мантия) одноименного семейства *Chlamydiaceae* включает три патогенных вида, поражающих органы зрения и мочеполовую систему (*C. trachomatis*) и вызывающих пневмонии (*C. psittaci*, *C. pneumoniae*).

Морфология. Внеклеточные хламидии, или элементарные тельца с трехслойной клеточной стенкой, имеют сферическую форму и диаметр 0,2–0,5 мкм, а внутриклеточная репродукционная форма, или ретикулярное тельце сетчатой структуры с тонкой клеточной стенкой, – палочкообразную, длиной 1 мкм.

Размножение. Хламидии – внутриклеточные паразиты, неспособные синтезировать высокоэнергетические соединения и обеспечивать собственные потребности в энергии. Цикл их развития сложный. Начинается он с прикрепления и проникновения в эпителиальную клетку элементарного тельца, которое затем поэтапно превращается в инициальное и ретикулярное. Бинарно делясь, ретикулярные тельца образуют в цитоплазме инфицированной клетки включения, где и происходит их созревание. Обнаруживают их в мазках из материалов и соскобов тканей. По Романовскому – Гимзе хламидийные тельца и включения окрашиваются в пурпурный, сиреневый и фиолетовый цвета.



Граф 9

Микоплазмы

История открытия. Микоплазмы выделены французскими учеными Э. Нокаром и Э. Ру из плевральной жидкости больных плевропневмонией коров еще в 1898 г. Однако только через несколько десятилетий установили, что они вызывают заболевания и у человека. Первоначально их называли плевропневмониеподобными организмами или сокращенно PPLO. Термин *Mycoplasma* (лепная фигура) введен Д. Новаком в 1929 г.

Филогения. Истоки возникновения микоплазм загадочны. Согласно гипотезе регрессивной эволюции, микоплазмы произошли от бактерий, возможно, в результате мутаций L-форм бактерий. По гипотезе прогрессивной эволюции, микоплазмы – прародители бактерий. Поскольку достоверных данных о генетическом родстве микоплазм и бактерий нет, то, вероятно, более правы те ученые, которые исходят из самостоятельного систематического положения микоплазм.

Таксономия. Микоплазмы отнесены к классу *Mollicutes* (*mollis* – мягкий, *cutis* – кожа), пор. *Mycoplasmatales*, в котором различают: 1) сем. *Mycoplasmataceae* и соответствующие ему роды *Mycoplasma* (35 видов) и *Ureaplasma urealyticum* (*urea* – мочевина, *lyticus* – расщепляющий), которые нуждаются в стеринах; 2) сем. *Acholeplasmataceae* и род *Acholeplasma* (5 видов), не требующие холестерина.

Распространение. В природе обнаруживаются в почве, воде, на гниющих субстратах. Большинство из них – сапрофиты, но многие виды паразитируют в организме насекомых и растений, поражают млекопитающих и птиц.

Строение и химический состав. Микоплазмы имеют строение прокариот, но у них отсутствует клеточная стенка. Они покрыты лишь трехслойной эластичной мембраной, состоящей из липопротеиновых соединений, фосфолипидов с включением стеринов. Подобно бактериям, микоплазмы содержат большой процент белка (30–60 %) и значительное количество ДНК и РНК (4 и 8 % к сухой массе). Количество углеводов у разных видов варьирует. Нуклеотидный состав микоплазм отличается низким содержанием Г + Ц (23–40 %).

Морфология. Микоплазмы не имеют ригидной оболочки, поэтому они очень полиморфны. В мазках из культур

обнаруживаются различные микроструктуры (рис. 14): гранулы в виде крошечных кокков и элементарных телец, крупные шары, кольца, палочки, нити, ветвящиеся или мицелиальные формы, меняющиеся в конфигурации аморфные массы и пр. Размеры микоплазм варьируют от 125–250 нм у гранулярных форм до 0,4–150 мкм – у нитевидных структур. Жгутиков, капсул и спор не образуют. По Граму окрашиваются отрицательно.

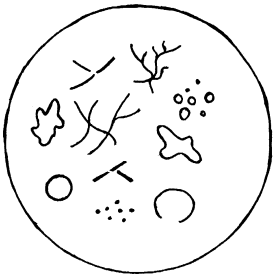
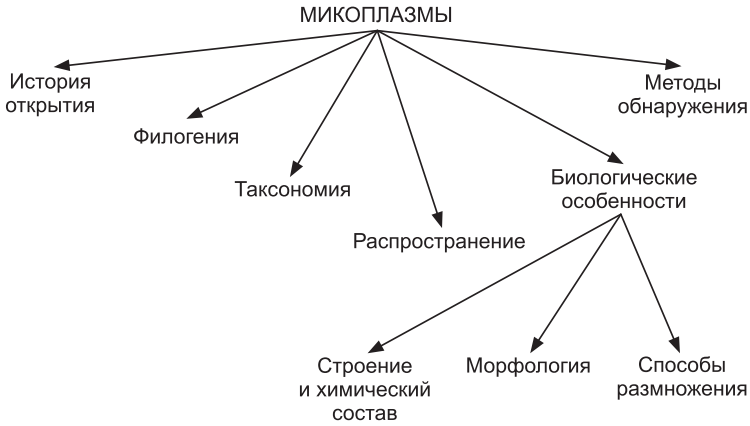


Рис. 14. Микоплазмы

Размножение. Основной репродуцирующей единицей считается элементарное тельце. Из него вырастают 4–5 ветвящихся нитей, которые впоследствии превращаются в цепочки, состоящие из мелких зерен. Размножение заканчивается дезинтеграцией цепочек на элементарные тельца. Имеются данные о размножении микоплазм путем бинарного деления и почкования.

Методы микроскопии. В световом микроскопе обнаруживаются лишь самые большие формы микоплазм. В живом состоянии их изучают в темном поле и фазово-контрастном микроскопе, ультраструктурные элементы выявляют при помощи электронной микроскопии.



Граф 10

МОРФОЛОГИЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРА ЭУКАРИОТ

Грибы

Грибы (*Fungi, Mycetes*) – нефотосинтезирующие одно- или многоклеточные бесхлорофилльные эукариоты с различным числом хромосом в ядрах. Оболочка их состоит из полисахаридов – целлюлозы и хитина. В ее состав входят также белки, липиды, фосфаты и другие органические вещества. Поверхность клеточных оболочек может быть гладкой, шиповидной, бугристой, бесцветной или окрашенной в различные цвета. Цитоплазма – гомогенная или вакуолизирована. В ней может содержаться гликоген, волютин, капельки масла, пигменты, кристаллы щавелевой и лимонной кислот. По способу питания грибы мало чем отличаются от низших растений, а по наличию хитина в оболочке, стеролов в мембране, гликогена в цитоплазме и характеру азотистого обмена (образованию мочевины) близки к клеткам животного происхождения.

Тип грибов насчитывает свыше 10 тыс. видов. Большинство из них – сапрофиты. Почвенные грибы участвуют в разложении (минерализации) органических веществ, в частности, образуют гумус, разрушают лесные подстилки. Грибы-ксилофиты вегетируют на растениях. Некоторые из них, развиваясь на злаковых, могут вызвать микотоксикозы, другие – острые пищевые отравления. Значительное число грибов полезно. Более 150 видов – съедобны, продуцируют антибиотики, ферменты, витамины, стероидные препараты, лимонную, щавелевую кислоты. Около полутысячи – патогенны для человека и животных. Их принято называть паразитическими грибками, а вызываемые ими болезни – микозами.

Таксономия. Грибы отнесены к царству *Fungi*. В нем различают два отдела: *Myxomycota* (грибы-слизевики) и *Eumycota* (истинные грибы). В основу их классификации положен тип полового процесса, число жгутиков у подвижных стадий, характер образования плодовых тел и их форма, морфологические особенности и др.

В соответствии с этим истинные грибы, вызывающие микозы у человека, подразделяют на низшие и высшие, совершенные (*Fungi perfecti*) и несовершенные (*Fungi imperfecti*).

В составе низших грибов выделяют классы *Chytridiomycetes, Oomycetes, Zygomycetes.* Характеризуются они примитивным (неклеточным) мицелием и наличием полового процесса, жгутиковых подвижных зооспор – у хитридиевых и оомицет – и безжгутиковых спорангиоспор и конидий – у зигомицет.

К высшим грибам относятся классы *Ascomycetes* (*ascos* – сумка) и *Basidiomycetes* (*basidion* – вырост). Отличаются они хорошо развитым члененным мицелием. Органом плодоношения у аскомицетов являются сумки, содержащие четыре или восемь гаплоидных половых аскоспор (эндоспор), а у базидиомицетов – открытые дубинкообразные выросты с базидиоспорами, т. е. они, как и низшие грибы, размножаются половым путем. Правда, у аскомицетов часто имеется также конидиальная вегетативная стадия размножения.

Виды грибов, у которых половая стадия размножения отсутствует или не выявлена, включены в сборную группу *Deuteromycetes* (*deuteros* – второй). По морфологическим признакам большинство их сходно с аскомицетами. Размножаются дейтеромицеты фрагментацией (простым делением), почкованием, эндоспорами или небазидиальными экзоспорами.

Общая организация грибов. По морфологии грибы и паразитические грибки подразделяются на гифомицеты и бластомицеты.

Гифомицеты (*hyphe* – ткань) сходны с водорослями. Отдельные клетки (гифы) длиной до 500 мкм и более, шириной 0,5–4 мкм имеют форму нитей, обладают дифференцированным ядром (ядрами). Переплетение гиф образует мицелий (нитчатую ткань), в котором различают две части – субстратный мицелий (грибница), через который происходит всасывание питательных веществ, и возвышающийся над ним воздушный мицелий с разнообразными репродуктивными органами. При этом у одних грибов мицелий цельный, а у других – септированный (разде-

ленный перегородками), но, прежде всего, отличающийся плодовыми телами и несущими их вегетативными гифами, посредством которых они размножаются бесполым путем. Так, плодовые тела в воздушном мицелии одноклеточной, сильно разветвленной мукоровой плесени *Mycor mucedo*, относящейся к зигомицетам, представлены спорангиями (*angoion* – сосуд), наполненными эндоспорами, а у многоклеточных леечных плесеней *Aspergillus* и кистевиков *Penicillium* – мелкими экзоспорами-конидиями (*konia* – пыль), отходящими у первых в

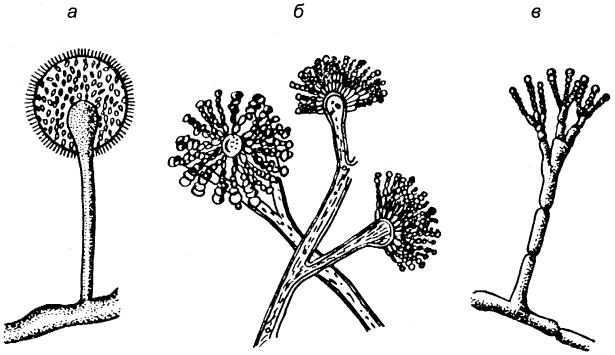


Рис. 15. Грибы:
а – Mucor; *б – Aspergillus*; *в – Penicillium*

виде струек воды от булавовидно утолщенных гиф, а у вторых – в виде кисточек от концевых разветвлений гиф. При этом вытянутые образования, от которых отделяются четки-споры, называются стеригмами; несущие спорангии цельные нити – спорангиеносцами; а септированные и цельные нити, поддерживающие конидии, – конидиеносцами (рис. 15). Конидии, формирующиеся на конце коротких плодоносящих веточек-стебельков, называют стебельчатыми или педицилятными; на вегетативных гифах – сидячими, сессильными или алейриями; экзоспоры, образующиеся внутри мицелия путем разделения гиф на равные короткие сегменты (*arthron*) бочковидной

формы, – артроспорами, а если они круглые и толстостенные – хламидоспорами (*chlamydos* – плащ).

Бластомицеты (*blastos* – росток) – одноклеточные почкующиеся, овальной, круглой, реже палочковидной, формы истинные дрожжи и дрожжеподобные организмы с двухконтурной оболочкой диаметром 3–7 мкм (рис. 16). Истинные – винные, пекарские, пивные, кормовые дрожжи – образуют аски. Дрожжеподобные организмы, или кандида, асков не формируют, размножаются бесполым путем (почкованием, делением) и, кроме того, отличаются от истинных дрожжей диморфизмом,

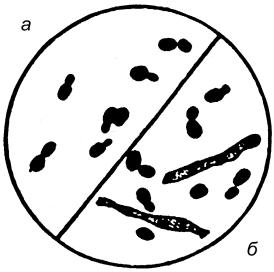
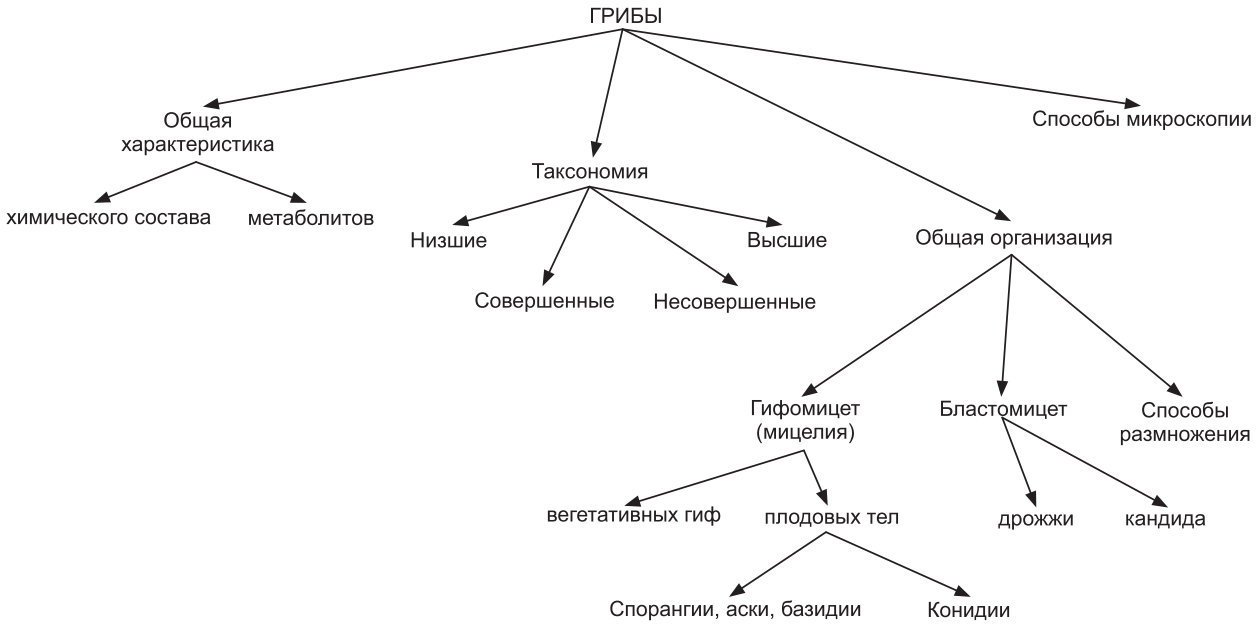


Рис. 16. Морфология дрожжей (*а*) и дрожжеподобных организмов (*б*)

т. е. наряду с почкующимися клетками в патологических материалах и культурах постоянно встречается псевдомицелий, напоминающий короткие деформированные гифы, что связано с нарушением синхронного процесса роста и деления.

Способы микроскопии. Морфологическую структуру гифомицетов изучают в раздавленной капле, для чего препаровальными иглами отделяют небольшой участок мицелия с плодоносящими гифами и, поместив его в каплю воды, расправляют, накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Сначала просматривают препарат объективом ×8, а после обнаружения плодоносящих гиф устанавливают объектив ×40. Морфологию бластомицет изучают в мазках, окрашенных по Граму, под иммерсионным объективом.


ГРИБЫ
Общая характеристика
химического состава
метаболитов
Таксономия
Низшие
Высшие
Совершенные
Несовершенные
Общая организация
Способы микроскопии
Гифомицет (мицелия)
Бластомицет
Способы размножения
вегетативных гиф
плодовых тел
дрожжи
кандида
Спорангии, аски, базидии
Конидии

Граф 11

Простейшие

Таксономия. Простейшие – одноклеточные нефотосинтезирующие эукариоты, близкие по строению клеткам сложноорганизованных животных. Объединены в царство *Animalia* (животные), подцарство *Protozoa* (*protos* – первый, *zoa* – животные) и семь типов – *Apicomplexa, Ascetospora, Ciliophora, Labirinthmorpha, Microspora, Myxozoa, Sarcomastigophora,* каждый из которых подразделяется на подтипы, надклассы, классы, отряды, роды, виды и штаммы. Около 20 видов патогенны для человека. Наиболее часто встречаемые из них – дизентерийная амеба, жиардии, трихомонады, лейшмании, трипаносомы – отнесены к типу *Sarcomastigophora* (саркодово-жгутиковые); плазмодии малярии и токсоплазмы – к типу *Apicomplexa* (образующие скопление клеток), а балантидии – к типу *Ciliophora* (ресничные).

Ультраструктурные и морфологические особенности.

Общая характеристика. Как и грибы, простейшие имеют зернистую цитоплазму, в которой содержится сферическое или овальное дифференцированное ядро (у жиардий – два набора по два ядра), рибосомы, митохондрии, аппарат Гольджи, различные включения, вакуоли (везикулы, цистерны), фагоцитированные частицы и бактерии.

Форма и размеры. Конфигурация и размеры простейших обусловлены прежде всего плотностью их оболочки. У жгутиковых, ресничных и токсоплазм оболочка ригидна, в результате чего они имеют строго определенную форму. Так, жиардии и трихомонады – грушевидные, лейшмании и трипаносомы – веретенообразные, балантидии – яйцевидные. Размеры жгутиконосцев составляют 10–40 мкм в длину и 2–8 мкм в ширину, а балантидий – 30–150 × 20–110 мкм.

Паразитирующие внутри клеток особи округляются, уменьшаются в размерах (до 2–6 × 2–3 мкм) и утрачивают жгутики. У амеб и плазмодиев малярии пелликула не обладает достаточной плотностью, поэтому при их движении паразиты приобретают самую причудливую конфигурацию (*amoibe* – изменение, *plasma* – фигурное образование). Размеры активно передвигающейся вегетативной формы амебы достигают 30–80 мкм в направлении максимальной длины псевдоподий, а у слабоподвижных – просветной и предцистной форм – 12–20 мкм.

Эритроцитарные формы стадийного превращения плазмодия сравнительно невелики – от 1–2 мкм (мерозоиты, кольца) до размера диаметра эритроцита (зрелые шизонты). Токсоплазмы имеют двоякую форму – полулунную в клетках и округлую в цистах.

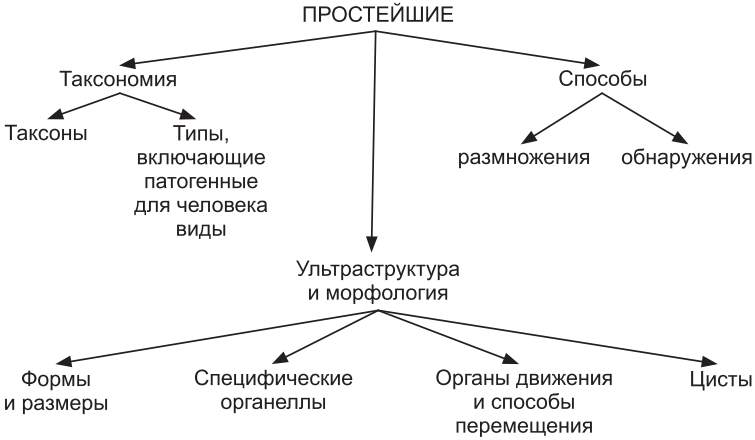
Специфические органеллы. Балантидии содержат микронуклеус и две сократительные вакуоли; дизентерийная амеба – пищеварительные и сократительные вакуоли; жиардии – две эластичные нити (аксостиль); жгутиконосцы – базальные тельца (кинетопласты) и связанные с ними ризопласты, переходящие в жгутики, а трипаносомы и трихомонады, кроме того, ундулирующую мембрану. Жиардии в передней части имеют присасывательный диск, токсоплазмы – специальную органеллу, состоящую из коноида и микротрубочек, а балантидии – подобие ротовой полости, названное цитостомой, анальную пору, или цитопрокт, и фибриллы, несущие опорную функцию.

Органы движения и способы перемещения. Простейшие подтипа *Mastigophora* передвигаются с помощью жгутиков: у трихомонад их четыре-пять, у жиардий – четыре пары, у лейшманий и трипаносом – по одному. Органами движения у балантидий служат многочисленные реснички. Передвижение дизентерийной амебы и плазмодиев малярии осуществляется посредством образования псевдоподий. Токсоплазмы перемещаются с помощью системы микротрубочек, покрывающих тело.

Цисты. В процессе паразитирования ряд патогенных простейших образуют цисты, которые предохраняют возбудителей от гибели или обеспечивают длительное пребывание в организме человека. У амеб, жиардий и балантидий инцистирование происходит в просвете кишечника. При этом паразиты округляются, уменьшаются в размерах, покрываются плотной двухконтурной оболочкой. Зрелая циста амебы меньше просветной формы (8–16 мкм) и отличается от последней главным образом тем, что в ней содержатся четыре ядра. Цисты жиардий тоже с четырьмя ядрами и по размерам такие же, как и у амеб, но овальные. Балантидии образуют круглые или овальные цисты, диаметр которых достигает 30–60 мкм. Цисты токсоплазм формируются в тканях и представляют собой покрытые клеточной оболочкой округлые образования размером 50–200 мкм, сплошь наполненные цистозоитами.

Способ размножения. Жгутиковые размножаются поперечным и продольным делением, цистами, реже – половым путем; балантидии – поперечным делением, цистами, половым путем; дизентерийная амеба – простым делением и цистами; плазмодии малярии и токсоплазмы – половым и бесполым путем.

Микроскопия и способы выявления. Обнаружение в патологических материалах патогенных простейших особых трудностей не представляет. Для этого делают мазки и дополнительно – толстую каплю из крови. В препаратах, окрашенных по Романовскому – Гимзе, цитоплазма паразитов – голубая; ядро, блефаропласт и жгутики – красные. Испражнения исследуют в свежем виде с использованием нагревательного столика, что обеспечивает выявление псевдоподий у дизентерийных амеб и ресничек у балантидий. Для обнаружения амебных цист к фекалиям добавляют концентрированный раствор Люголя, контрастирующий внутриклеточные структуры.



Граф 12

ВИРУСЫ

Основоположником вирусологии является Д.И. Ивановский, открывший в 1892 г. вирус мозаичной болезни табака (ВТМ), который в кристаллическом виде получил лауреат Нобелевской премии У. Стенли в 1935 г.

Формы существования и общая организация вирусов

Выделив ВТМ, У. Стенли принял его за «саморазмножающийся белок», но год спустя английские биохимики Ф. Бодуен и Н. Пири доказали, что в нем содержится 95 % белка и 5 % нуклеиновой кислоты (НК), т. е. по химическому составу он является нуклеопротеидом. Позже выяснилось, что у других вирусов содержание НК может достигать 40 %. При этом оказалось, что они содержат один тип нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) и для них характерны две формы существования: внеклеточная, корпускулярная, покоящаяся и внутриклеточная, репродуцирующаяся, вегетативная.

Внеклеточные вирусы представляют собой корпускулы-частицы сферической, кристаллоидной или нитевидной формы, которые называют *вирусными частицами, элементарными тельцами,* а чаще – *вирионами* (рис. 17). Размеры вирионов колеблются от 15–30 до 200–500 нм.

Структурная организация вирионов очень проста. Они не имеют обычной для клеток цитоплазмы и ядра, митохондрий и рибосом, других органелл, а у многих вирионов отсутствуют даже ферменты. При этом в корпускулярной форме вирус обладает скрытой инфекциозностью. Проявляется она вслед за проникновением в клетку вирионной НК, которая и представляет собой так называемую репродуцирующуюся форму, вступающую в определенные вза-

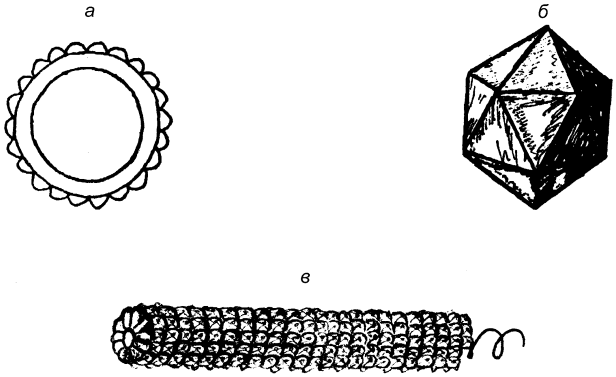


Рис. 17. Формы вирионов:
а – сферическая; *б* – полигональная; *в* – нитевидная

имоотношения с генетическим аппаратом клетки-хозяина. По этому признаку выделяют две большие группы вирусов: 1) инфекционные вирусы с автономной репликацией нуклеиновых кислот и продукцией вирионов (продуктивная инфекция); 2) интеграционные вирусы, способные интегрироваться с геномом клетки и в этих случаях утрачивающие способность вызывать продуктивную инфекцию. Инфекционные вирусы угнетают функцию клеток, деформируют или разрушают их, интеграционные – индуцируют злокачественное перерождение клеток или трансформируют их антигенную структуру. Характер взаимодействия вирионных нуклеиновых кислот с клеткой позволяет называть вирусы генетическими паразитами, а вызываемые ими инфекции – молекулярными.

Различают простые и сложные вирионы (рис. 18). Простые вирионы состоят из НК, окруженной снаружи белковой оболочкой, которую называют капсидом (ящиком, футляром), сложные – имеют дополнительную внешнюю оболочку (суперкапсид, пеплос).

Структура и химический состав простых вирионов. В состав простых вирусов-нуклеокапсидов, типичным представителем которых является ВТМ, входят только капсидные белки, но у некоторых из них содержатся также геномные, или терминальные – ковалентно связанные с концом вирионной НК и участвующие в регуляции вирусного генома.

Капсидные белки просто организованных вирионов обычно состоят из 1–3 вирусспецифических белков. Кроме

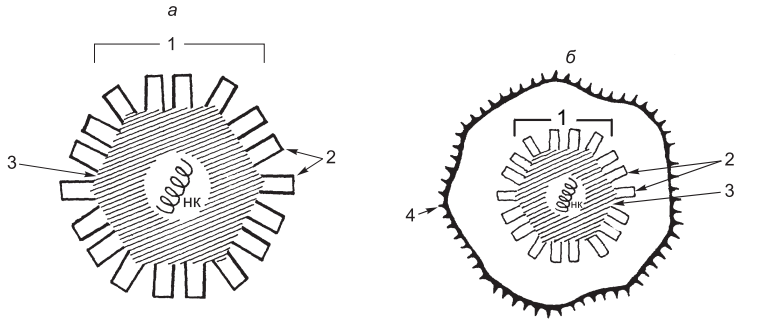


Рис. 18. Основные структуры простых (*а*) и сложных (*б*) вирионов: НК – нуклеиновая кислота; *1* – капсид; *2* – капсомеры; *3* – сердцевина; *4* – внешняя оболочка (суперкапсид)

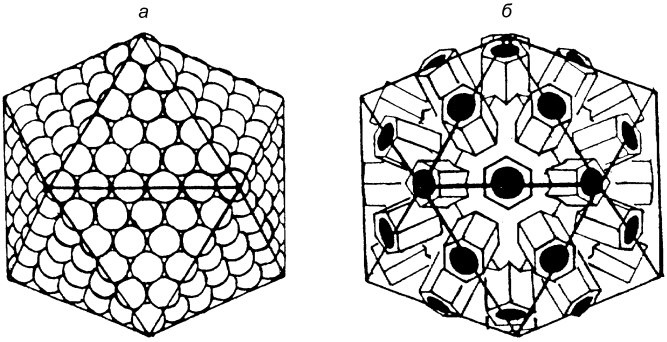


Рис. 19. Форма и схема расположения капсомеров в капсидах вирионов:
а – кубический тип; б – спиралевидный

этого, у некоторых простых вирусов есть также специальные некапсидные белки распознавания чувствительных к ним клеток. При этом каждый из них обладает способностью к самосборке, в начале которой из идентичных полипептидных цепей образуются отдельные структурные элементы (субъединицы), или капсомеры белкового чехла, вслед за чем при их взаимодействии с НК вириона происходит спонтанное формирование капсида. Количество капсомеров в капсиде вирусов варьирует от трех-шести десятков до многих сотен. У одних вирусов капсомеры имеют овальную или округлую форму, у других – пяти- или шестигранную (рис. 19). По характеру расположения капсомеров вирусы делят на три группы: с кубическим (*а*), спиральным (*б*) и смешанным типом симметрии. Большинство патогенных для человека вирусов имеет кубический тип симметрии. Спиральный тип симметрии нередко встречается среди вирусов растений. Смешанный тип симметрии для простых вирусов не типичен.

Структура и химический состав сложных вирионов. Сложно устроенные вирусы в капсиде имеют много разновидностей белков. Кроме капсидных и геномных белков они могут также содержать мембранные белки, прилегающие к капсиду, и ферменты, участвующие в репликации и транскрипции вирусного генома, например, ДНК- и РНК-полимеразы. Формирование капсида и нуклеокапсида у них происходит тоже в процессе самопроизвольной сбор-

ки, но цикл полного образования вирионов носит сложный, многоступенчатый характер.

В суперкапсиде сложных вирусов, представляющем собой липидный бислой, в котором расположены пепломеры, превалируют гликопротеиды. Являясь типичными внутримембранными белками, они у большинства вирусов образуют поверхностные «шипы», длина которых достигает 5–10 нм (см. рис. 18). Чаще всего шипы построены из нескольких молекул идентичного белка, и те вирусы, которые имеют один гликопротеид, естественно, обладают одним типом шипов, при наличии в них двух гликопротеидов – двумя типами. Есть, однако, вирусы, имеющие 2–3 гликопротеида, формирующие один тип шипов.

Суперкапсидные вирусные гликопротеиды выполняют две основные функции: 1) распознают, подобно некапсидным белкам простых вирусов, специфические клеточные рецепторы и взаимодействуют с ними, что дало повод называть их прикрепительными белками; 2) обусловливают проникновение вирусов в клетки, легко сливаясь с клеточными мембранами, вследствие чего их называют белками слияния.

Количество углеводов в гликопротеидах может достигать 10 % от общей массы вириона. Обычными сахарными остатками в них являются сахароза, фруктоза, манноза, галактоза, нейраминовая кислота. Углеводы гликопротеидов обеспечивают сохранение конформации белка и его устойчивость к протеазам.

Содержание липидов в липидном бислое суперкапсида у сложных РНК-содержащих вирионов может составлять от 15 до 35 % их сухого веса. Большая часть из них представлена фосфолипидами (50–60 %) и холестерином (20–30 %). Липиды, как и углеводы, обеспечивают целостность структуры вириона. Обработанные эфиром, дезоксихолатом, детергентами сложные вирионы распадаются и утрачивают инфекциозность.

Липидно-углеводные компоненты имеют клеточное происхождение, включаясь в вирионы из плазматических мембран клеток при отпочковывании от них сложных вирусов на самом последнем этапе размножения. Единственным отличием вирусных липопротеидных оболочек от мембран клеток-хозяев является то, что в них содержатся вирусспецифические суперкапсидные белки, а у некоторых вирионов – небольшое количество молекул протеаз, протеинкиназ и других ферментов, модифицирующих вирусные белки.

Таким образом, по химической структуре все вирусы – нуклеопротеиды, а по организации – простые и сложные нуклеокапсиды.

Структурно-функциональная организация генома вирусов. Независимо от сложности строения вирусов НК в их нуклеокапсидах представлена одной из ее разновидностей – ДНК или РНК – и никогда обеими вместе. Каждая из них – геном. Геном вируса является гаплоидным, т.е. представлен одним набором генов. Частично диплоидны ДНК-содержащие вирусы, в ДНК которых встречаются повторяющиеся нуклеотидные последовательности. Число генов (оперонов) в вирусных геномах колеблется от 3–4 у самых простых вирусов до многих десятков – у сложноустроенных.

Вирусные иРНК в отличие от иРНК про- и эукариот могут направлять синтез не одного, а двух-трех белков, что позволяет им при минимальном содержании генетического материала увеличивать генетическую ниформацию. Достигается это двухкратным считыванием одной и той же иРНК с находящихся в ней разных участков двух-трех инициирующих АУГ-кодонов. Происходит это, естественно, при трансляции белка и в каждом случае определяется, какой АУГ-кодон (первый или последующие) узнает малая рибосомная единица. Образующиеся полипептиды с разных инициирующих кодонов будут друг другу копиями, отличающимися разве только длиной. При сдвиге рамки считывания на один или два нуклеотида и появлении нового генетического кода молекула иРНК может транслироваться с образованием таких полипептидов, у которых нет идентичных аминокислотных последовательностей, вследствие чего их называют *уникальными белками*. Нередким способом увеличения генетической информации у вирусов является трансляция гигантских полипептидов-предшественников с последующим нарезанием их на более мелкие.

Природа и происхождение вирусов. Относительно природы вирусов имеется два диаметрально противоположных суждения. Сторонники лауреата Нобелевской премии А. Львова, открывшего в 50-х гг. XX в. профаг, интегрированный с геномом лизогенных бактерий, утверждают, что вирусы – не организмы, так как не являются, как все существа, «независимыми единицами взаимосвязанных структур и функций». Приверженцы Нобелевского лауреата С. Лурия поддерживают определение вирусов как не менее живых, чем все существа, не просто организмов, а «сверхорганизмов», так как только их «голая» НК активно, словно патогенный микроб, проникает в клетки (инфицирует), реплицируется (размножается) в них и продуцирует вирионы.

Обладая, как все организмы, способностью к воспроизводству, наследственностью, изменчивостью и приспособляемостью к меняющимся условиям среды, вирусы отличаются от них разве только тем, что не имеют клеточного строения и поэтому не растут, а главное, размножаясь в клетках-хозяевах и не имея собственных энергообменных систем, ведут особый паразитарный образ жизни на генетическом уровне.

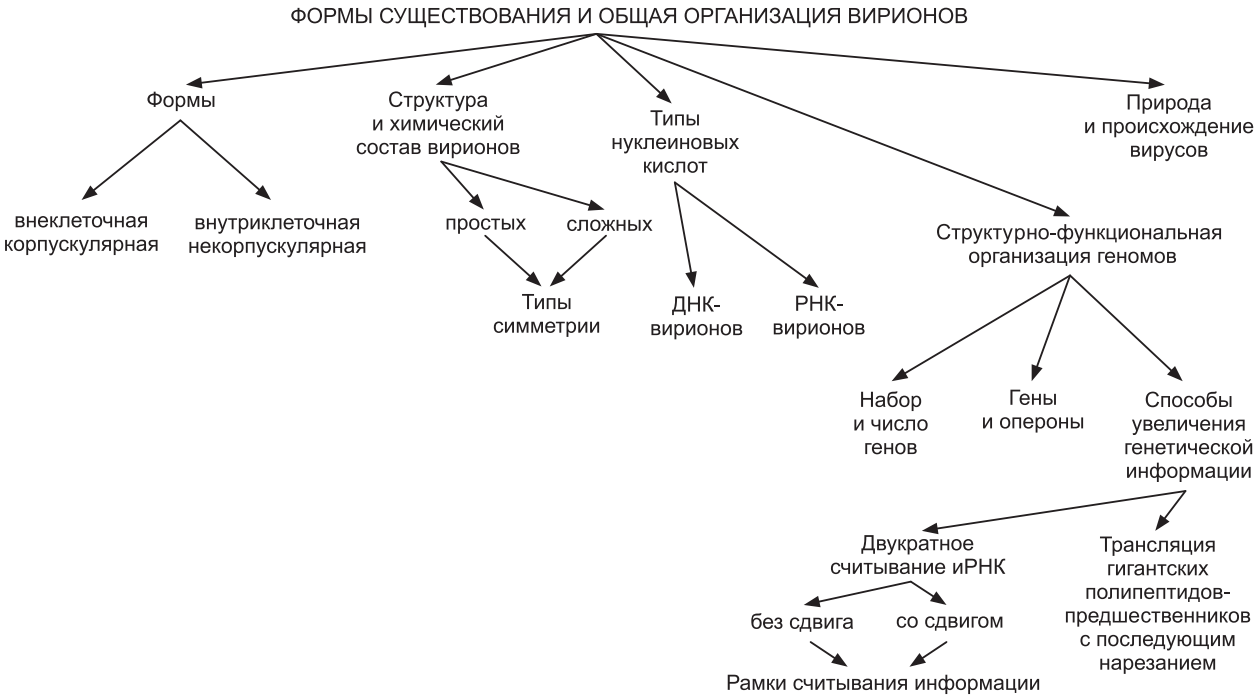
Выдвинуты три гипотезы о происхождении вирусов.

Одна из них предполагает, что вирусы могли явиться первичными формами жизни, возникшими в результате химических реакций с использованием энергии УФ-лучей или электроразрядов и давшими начало клеточной организации жизни. С этой прогрессивной гипотезой увязываются две регрессивные. В частности, А. Львов представляет, что вирусы, которые индуцировали образование клеток в ходе регрессирующей биохимической эволюции, при каком-то акте мутации могли отщепиться от них, возвратив свою первоначальную независимость и способность к репродукции при наличии ферментов-катализаторов.

Другая регрессивная теория предполагает, что вирусы произошли от свободноживущих микробов, нуждавшихся в факторах роста и ставших вследствие этого внутриклеточными паразитами, а затем поэтапно утративших энергообменные системы. Против регрессивной гипотезы происхождения вирусов из паразитарных клеток говорят многие веские аргументы, прежде всего их неклеточная организация, отсутствие в клетках структур, подобных вирусным капсидам, неклеточный способ размножения, отсутствие промежуточных форм превращения клеток-паразитов в вирусы.

Наибольшее число сторонников нашла гипотеза, согласно которой вирусы произошли от содержащих НК структур и органелл клеток, ставших автономными самовоспроизводящимися элементами. Так, ее приверженцы полагают, что источником ДНК-вирусов могли явиться гены митохондрий и хлоропластов, а РНК-вирусов – рибосомы. Загадкой остаются источники получения генного материала одноцепочечных ДНК-вирусов и двухцепочечных РНК-вирусов, которых не имеет ни одна клетка. Кроме того, клеточные организмы также не имеют механизма репликации вирионной РНК. В связи с этим возникли предположения, что геномные РНК вирусов могли появиться из информационных рибонуклеиновых кислот ДНК-содержащих вирусов или клеток.

Таким образом, вопрос о происхождении вирусов остается дискуссионным.


ФОРМЫ СУЩЕСТВОВАНИЯ И ОБЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВИРИОНОВ
Формы
Структура и химический состав вирионов
Типы нуклеиновых кислот
Природа и происхождение вирусов
Структурно-функциональная организация геномов
внеклеточная корпускулярная
внутриклеточная некорпускулярная
простых
сложных
Типы симметрии
ДНК-вирионов
РНК-вирионов
Набор и число генов
Гены и опероны
Способы увеличения генетической информации
Двукратное считывание иРНК
Трансляция гигантских полипептидов-предшественников с последующим нарезанием
без сдвига
со сдвигом
Рамки считывания информации

Граф13

Систематика вирусов

Основополагающим принципом в разработке систематики (таксономии) вирусов явилось то, что их вирионы содержат только один тип НК. По этому признаку в царстве *Vira* выделяют две группы вирусов: ДНК- и РНК-содержащие. Каждую из них, в свою очередь, последовательно подразделяют на семейства, подсемейства, роды и виды вирусов, прибавляя к базовым названиям *viridae* (сем.), *virinae* (подсем.) и *virus* (остальные таксоны). В русской транскрипции все они пишутся и произносятся «вирусы».

Критерии систематики вирусов. Основными критериями подразделения разных групп вирусов на семейства являются особенности НК, касающиеся их структуры (одно-, двухцепочечные, полные – недостроенные, цельные – фрагментированные), конфигурации (линейные – кольцевые) и геномной функции («плюс – минус» нитевые), а также наличие или отсутствие внешней оболочки. Дополнительными к ним признаками, позволяющими в пределах семейства выделить подсемейства, роды и виды, – круг хозяев, антигенная специфичность, размеры и морфология вирионов, тип симметрии и число капсомеров в капсиде, органо-тканевой тропизм вирусов и их цитопатическое действие, способы передачи, распространение, проявление вирусных болезней и некоторые другие.

Семейства, подсемейства, роды и виды ДНК-вирусов

Группа ДНК-содержащих вирусов представлена семью семействами, четыре из них – вирусы позвоночных, а в остальных трех – имеются подсемейства, роды и виды, вызывающие болезни у насекомых.

Вирусы позвоночных

1. *Herpesviridae* (*herpes* – ползучие) – вирусы, вызывающие у человека линейно распространяющиеся на коже и слизистых оболочках везикулы с наличием в них вирионов, в частности на губах (простой герпес), лице, в ротовой полости, зеве (ветряная оспа), по ходу межреберных нервов (опоясывающий герпес), другие более тяжелые инфекционные процессы и злокачественные заболевания, както: цитомегалию, при которой поражаются слюнные же-

лезы с образованием в них гигантских клеток, а при диссеминации вируса – внутренние органы и системы, лимфому Беркитта, саркому Капоши. Семейство герпесвирусов подразделяется на три подсемейства: *Alpha-*, *Beta-* и *Gammaherpesvirinae*. В состав альфагерпесвирусов включают вирусы простого герпеса 1-го, 2-го типов, вирус В герпеса (род *Simplexvirus*) и вирус герпеса 3-го типа, вызывающего ветряную оспу и опоясывающий герпес (род *Varicellavirus*). Бетагерпесвирусы тоже содержат два рода вирусов – *Cytomegallovirus* (вирус герпеса 5-го типа) и *Roseolovirus* (вирусы 6А, 6В, вызывающие В-клеточную лимфому, 7-го и 8-го типов, ассоциируемые с саркомой Капоши). Подсемейство гаммагерпесвирусов включает вирус герпеса 4-го типа, или вирус Эпстайна – Барр, отнесенный к роду *Lymphocryptovirus*.

2. *Adenoviridae* (*adenos* – железа) – вирусы, выделенные из железистой ткани носоглотки и поражающие у человека верхние дыхательные пути, а нередко – и кишечник. Семейство включает два рода: *Mastadenovirus* (*mastos* – грудь) – вирусы млекопитающих и *Aviadenovirus* (*avis* – птица) – птичьи вирусы. Среди мастаденовирусов различают 91 серовар: 41 выделен от человека и 50 – от крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, свиней, собак, мышей. От кур, индеек, уток, гусей и фазанов получено 7 авиаденовирусов.

3. *Papovaviridae* – вирусы **па**пиломы, **по**лиомы и **ва**куолизирующего клетки вируса SV-40 (**s**puma **v**irus) – включает два рода: *Papillomavirus,* вызывающий доброкачественные разрастания кожи и слизистых оболочек (*papilla* – сосочек), и *Polyomavirus* (в том числе SV-40), индуцирующие множественные (*polys* – много) опухоли (*oma*) у животных.

4. *Hepadnaviridae* (*hepatos* – воспаление печени, DNA-ДНК) – вирион гепатита В (частица Дейна) и подобные ему вирусы, вызывающие заболевание у сурков, пекинских уток, земляной и красной белки.

Вирусы позвоночных и беспозвоночных

1. *Poxviridae* (*pox* – пузырек) – как и герпесвирусы – дермотропные вирусы, вызывающие на коже и слизистых оболочках человека и животных разнообразные высыпания, заканчивающиеся образованием не только везикул, но и пустул, наполненных гнойным содержимым и покрытых корками, после отпадения которых остаются глу-

бокие рубцы (натуральная оспа человека). Семейство подразделяется на два подсемейства: *Chordopoxvirinae* (вирусы позвоночных) и *Entomopoxvirinae* (вирусы насекомых). В составе хордопоксвирусов выделяют 8 родов и 10 типов вирусов оспы человека и животных: *Orthopoxvirus* (оспенный и вакцинный вирусы), *Parapoxvirus* (вирус «узелков доярок» и контагиозного пустулезного дерматита, или ОРФ-вирус), *Molluscipoxvirus* (контагиозного моллюска), *Yatapoxvirus* (вирусы обезьян), *Avipoxvirus* (птичий), *Carpipoxvirus* (овечий), *Suipoxvirus* (свиной), *Leporipoxvirus* (вирус миксомы зайцев). Подсемейство энтомопоксвирусов включает три рода вирусов насекомых.

2. *Iridoviridae* (*iridos* – радуга) – отличаются тем, что, кристаллизуясь, отливают всеми цветами радуги. Представлены пятью родами: *Iridovirus* и *Chloriridovirus* (*chloros* – зеленовато-желтый) – вирусы насекомых; *Ranavirus* – вирусы лягушек; безымянные 4-й и 5-й роды включают вирус лимфокистоза рыб (4-й) и вирус африканской чумы свиней (5-й).

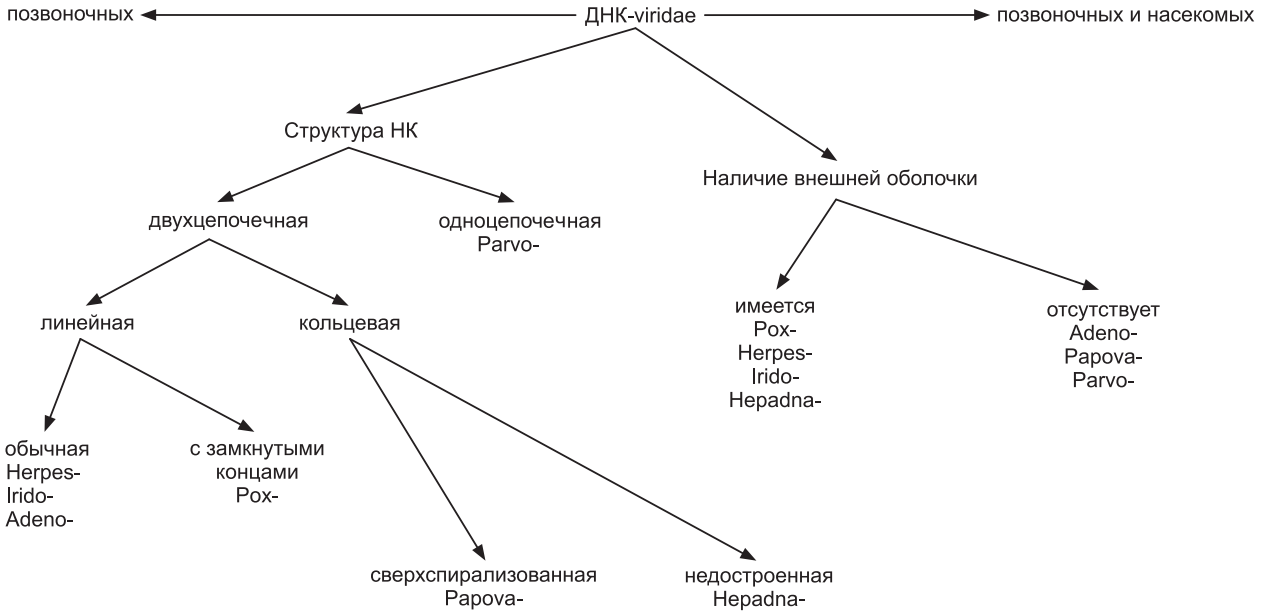
3. *Parvoviridae* (*parvus* – крошечный) включает три рода: *Parvovirus* – вирусы животных и птиц; *Densovirus* (*densus* – плотный) – вирусы насекомых; *Dependovirus* (*dependence* – зависимость) – аденоассоциированные вирусы, точнее, дефектные вирусы, репликация которых возможна лишь с помощью аденовирусов.

Краткая характеристика основных структур и свойств ДНК-вирусов

Структура ДНК. У герпес-, иридо- и аденовирусов ДНК двухцепочечная линейная, и если не считать повторов нуклеотидных последовательностей начальных участков и концевых ее фрагментов, то она точно такая же, как в клетках; у поксвирусов – линейная двухцепочечная, но с замкнутыми концами; у паповавирусов – двухцепочечная кольцевая, иногда со сверхзавитками; у гепаднавирусов – кольцевая двухцепочечная, но в одной нити на четверть недостроенная; у парвовирусов – одноцепочечная линейная.

Наличие внешней оболочки, форма и размеры. Вирионы покс-, герпес-, иридо- и гепаднавирусов имеют внешнюю оболочку, адено-, папова-, парвовирусы – простые типичные нуклеокапсиды. Поксвирионы имеют форму

СИСТЕМАТИКА ДНК-ВИРУСОВ ПО ОСНОВНЫМ КРИТЕРИЯМ МКТВ



Граф 14

параллелепипеда (у парапоксвируса – овальная), герпес-, иридо-, гепаднавирионы – округлую, адено-, папова- и парвовирионы – икосаэдральную. Размеры поксвирусов колеблются в пределах 300–450 × 170–260 нм, диаметр герпес- и иридовирусов превышает 100 нм и может достигать 200, у аденовирусов он меньше 100 (в среднем 90), у папова – около 50, у гепадна – приблизительно 40, а у самого маленького простого парвовируса – на порядок меньше, чем у самых крупных сложных вирусов (18–26 нм).

Репликация, сборка и освобождение вирионов из клеток. Репликация и сборка покс-, герпес- и иридовирусов происходит в цитоплазме, у остальных вирусов – в ядре (HBs-антиген частицы Дейна образуется в цитоплазме).

Сложные вирионы клеток не разрушают и отделяются от них почкованием (герпесвирусы проходят сквозь плазматическую мембрану, сливаясь с нею), адено- и папова-вирусы освобождаются, лизируя их.

Подводя итоги, приводим систематику ДНК-вирусов по основополагающим критериям Международного комитета по таксономии вирусов (МКТВ).

Семейства, роды и виды РНК-вирусов

Группа РНК-содержащих вирусов включает 14 классифицированных семейств – 12 семейств позвоночных и 2 – сборных, в состав которых входят роды и виды позвоночных, насекомых и растений.

Вирусы позвоночных. По органо-тканевому тропизму среди вирусов позвоночных можно выделить 4 группы: энтеро-, пневмо-, вазо- и лимфотропные.

1. К энтеротропным вирусам относят 3 семейства: *Picornaviridae* (*piccolo* – маленький, RNA – РНК), т. е. РНК-вирусы, отличающиеся очень маленькими размерами, *Caliciviridae* (*calix* – чаша), выделенные не так давно из семейства вирусов пикорна после того, как на поверхности их вирионов было обнаружено 32 чашевидных вдавления, и *Astroviridae* (*astron* – звездчатые).

Семейство пикорнавирусов имеет 5 родов: *Entero-*, *Hepato-*, *Rhino-*, *Cardio-* и *Aphthovirus*.

В составе энтеровирусов насчитывают 69 типов: *Poliovirus* (*polios* – серый) 1, 2 и 3-го типов, поражающий серое вещество передних рогов спинного мозга и вызыва-

ющий полиомиелит; *Coxackievirus* А – 24 типа и В – 6 типов (Коксаки – город в США, где они были выделены) и 32 типа *ECHOvirus* (*enteric cytopathogenic human orphans*), являющиеся возбудителями полиомиелитоподобных заболеваний, ангин и миозитов; 4 типа вирусов гастроэнтеритов (66–69).

Род гепатовирусов содержит один вирус гепатита А, недавно выделенный из энтеровирусов, где он фигурировал как уникальный 70-й тип.

Риновирусы (*rhinos* – нос) вызывают риниты (113 типов), кардиовирусы (*kardia* – сердце) – миокардиты, а афтовирусы (*aphta* – язва) – ящур у парнокопытных животных.

В семейство калицивирусов включены вирус гепатита Е и вирус *Норфолк*, вызывающий гастроэнтериты.

В семействе астровирусов известно пока 5 сероваров энтеровирусов, поражающих детей, подростков и юношей.

2. В группу пневмотропных включают 3 семейства вирусов: *Orthomyxo-, Paramyxo-* и *Coronaviridae*. Первые 2 семейства называют миксовирусами, так как они имеют высокое сродство со слизистой оболочкой верхних дыхательных путей (*myxa* – слизь), более выраженное у ортомиксовирусов (*orthos* – настоящее), чем у парамиксовирусов (*para* – подобные).

Семейство ортомиксовирусов включает 3 типа вирусов гриппа двух одноименных родов *Influenzavirus* – А+В и С, а семейство парамиксовирусов – вирусы парагриппа 1-го и 3-го типов (род *Paramyxovirus*), вирусы эпидемического паротита и парагриппов 2-го и 4-го типов (род *Rubulavirus*), вирус кори (род *Morbillivirus*) и респираторно-синцитиальные вирусы (род *Pneumovirus*).

Семейство коронавирусов (*corona* – венец) получило свое название вследствие того, что составляющие его вирионы обрамлены частоколом «булавовидных утолщений». Все они вызывают острые респираторные заболевания.

3. К вазотропной группе вирусов, обладающих сродством с сосудами, отнесены семейства *Togaviridae* (*toga* – мантия), иными словами, вирусы, содержащие внешнюю оболочку; *Flaviviridae* (*flavum* – желтый), типичным представителем которого является вирус желтой лихорадки; *Arenaviridae* (*arena* – песчинки), в сердцевине которых имеются плотные гранулы; *Bunyaviridae,* выделенные в Буньямвера (Уганда), и *Filoviridae* (*phylon* – род, племя).

При этом семейство тогавирусов содержит около 25 видов, в том числе вирусы энцефалитов лошадей, О'ньюнг-ньюнг, Синдбис, а близкое ему по структуре семейство флавивирусов – более 30 видов, в частности вирусы денге, клещевого и японского энцефалитов, омской геморрагической лихорадки и краснухи.

Семейство аренавирусов включает вирус лимфоцитарного хориоменингита и четыре вируса геморрагических лихорадок – Ласса (африканской), Мачупо (боливийской), Хунин (аргентинской) и Гуанарито (венесуэльской).

Семейство буньявирусов подразделяют на 4 рода: *Bunyavirus*, включающий вирусы, выделенные в Буньямвера, и многие другие вирусы экзотических природно-очаговых болезней (всего около 150); *Flebovirus* (*flebotomus* – вид москитов-переносчиков), в состав которого входят вирусы москитной лихорадки и еще более 50 видов; *Nairovirus,* в который отнесены около 40 вирусов, подобных вирусу Найроби овец; *Hantavirus,* вызывающий эпидемическую нефропатию (вирусы Хантаан и Пуумала), геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (вирус Сеул), острые респираторные инфекции с геморрагическим и почечным синдромами (вирус Син-Номбре).

В семейство *Filoviridae* включены 2 особо опасных для человека вируса – Марбург и Эбола.

4. Лимфотропные вирусы – это одно семейство *Retroviridae,* вирионы которого содержат реверсальную (обратную) транскриптазу. Отсюда и название *Retro*. Семейство подразделено на 3 подсемейства: 1. *Oncovirinae* – онкогенные вирусы B-, C- и D-типов, вызывающих у животных рак молочной железы, лейкозы и лимфосаркому; 2. *Spumavirinae* (пенящие вирусы) с идентичным родом *Spumavirus*; 3. *Lentivirinae* с таким же родом *Lentivirus,* включающий вирус висна-мэди у овец и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), или, как его до сих пор называют, вирус СПИД.

Вирусы позвоночных, растений и насекомых. К этой категории вирусов причисляют 2 семейства: *Rhabdoviridae* (*rhabdos* – прут, т. е. имеющие вид палочки), которые, как и все вышеперечисленные вирусы, содержат одноцепочечную РНК и вызывают у животных и человека *rabies* (бешенство), и *Reoviridae* (*respiratory, enteric, orphans*) – двухцепочечные РНК-вирусы-сиротки, поражающие респираторные пути и кишечник.

1. В семействе рабдовирусов имеется 3 рода: *Lissavirus* – вирусы бешенства (*lissa*); *Vesiculovirus* – вирусы везикулярного стоматита; безымянный род рабдовирусов растений.

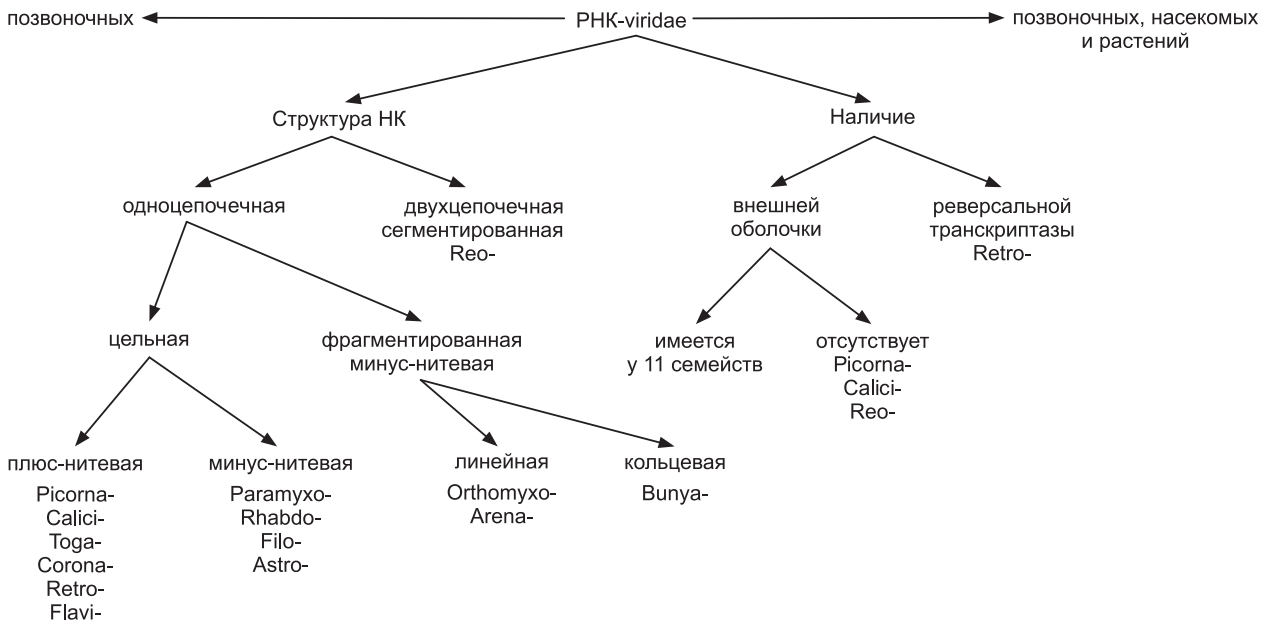
2. Семейство реовирусов содержит 7 родов, из них собственно *Reovirus, Orbivirus* (*orbis* – кольцо) и колорадский *Coltivirus* – вирусы лихорадочных заболеваний человека, *Rotavirus* (*rota* – колесо), или колесовидные, – вирусы гастроэнтеритов, *Phytoreovirus* и *Fijivirus* – фитопатогенные вирусы, *Cypovirus* – вирус цитоплазматического полиэдроза насекомых.

Краткая характеристика основных структур и свойств РНК-вирусов

Структура РНК. У РНК-содержащих вирусов, не считая семейства реовирусов, геномные РНК – одноцепочечные структуры. Вирусные РНК, как и клеточные рибосомальные, информационные и транспортные, – являются линейными цельными (несегментированными) структурами. Исключение составляют фрагментированные на 8 сегментов РНК ортомиксовирусов и на 5 сегментов – у аренавирусов. У пикорна-, калици-, тога-, флави-, корона- и ретровирусов цельнолинейная геномная РНК наделена функцией иРНК. У всех остальных семейств линейная РНК, независимо от того, сегментирована она или не сегментирована, такой функцией не обладает, выполняет ее комплементарная иРНК, транскрипция которой осуществляется в клетке на геномной с помощью вирусспецифического фермента транскриптазы. Особую структуру РНК имеют бунья- и реовирусы. У первых она кольцевая и фрагментирована на 3 сегмента, у вторых – двухцепочечная, сегментированная на 10–12 участков.

Наличие внешней оболочки, форма и размеры вирионов. 11 семейств РНК-содержащих вирусов имеют внешнюю оболочку, у трех – пикорна-, калици- и реовирусов она отсутствует. Из 11 сложных вирионов у 9 – форма округлая с поверхностными шипами вокруг (у коронавирусов – с булавовидными выступами), у рабдовирусов – пулевидная или бациллярная, а у астровирусов – звездчатая. Три простых вириона, у которых внешней оболочки нет, – икосаэдры.

СИСТЕМАТИКА РНК-ВИРУСОВ ПО ОСНОВНЫМ КРИТЕРИЯМ МКТВ



Граф 15

Размеры самых больших вирионов – парамиксо- и рабдовирусов – варьируют в пределах 150–300 нм, 130–380 × × 50–90 нм соответственно, а размеры самых маленьких – пикорна-, калици- и астровирусов – от 20 до 30 нм. Диаметры вирусных частиц у тога-, рео-, ортомиксо-, ретро- и буньявирусов колеблются в пределах 40–60; 60–80; 80–90 и 100–120 нм. Более вариабельны размеры у корона- (75–160 нм) и аренавирусов (50–300 нм).

Репликация, сборка и освобождение вирионов из клеток. Репликация РНК-вирусов происходит в цитоплазме клеток. Ядерный цикл репликации характерен лишь для ортомиксовирусов, но и он заканчивается в цитоплазме. В ней же идет сборка вирионов с последующим этапом их отпочковывания от плазматической мембраны, реже от внутрицитоплазматических мембран (коронавирусы и лиссавирус бешенства) и от мембран аппарата Гольджи (буньявирусы). Не почкуются пикорна- и калицивирусы. Почкующиеся РНК-вирусы клеток не разрушают, непочкующиеся, постепенно накапливаясь, лизируют их.

В заключение приводим систематику РНК-вирусов по основным критериям МКТВ.

ОСНОВЫ ЭКОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Экология микроорганизмов изучает эволюцию микроорганизмов, их распространение и роль в биосфере, в частности участие в круговороте веществ и взаимоотношения в биоценозах.

Экологические гипотезы зарождения жизни и эволюции микроорганизмов

Энергопотребляющим системам жизни на Земле, как полагают одни ученые, предшествовало формирование универсального механизма поглощения света и превращения солнечной энергии в химические связи с помощью молекул хлорофилла, обнаруживающегося, к слову говоря, в углистых хондритах метеоритов. В связи с этим утверждается, что фотохимическое выделение кислорода на основе органических соединений появилось раньше жизни.

По мнению других, общие условия для жизни подготовили водоросле-бактериальные сообщества, которые и сейчас обитают в высокогорьях, на ледниках Антарктиды, распростершейся под озоновой дырой, в вулканах, на дне океанов, глубоководных лагун и озер. Появившись около 3,5 млрд лет тому назад, когда на Земле были очень высокие температура и радиоактивность, они, обладая большим набором ферментов, обогатили атмосферу кислородом и, освободив ее от избытка диоксида углерода, создали предпосылки для развития современных прокариот, ядро которых представлено циркулярно-замкнутой молекулой ДНК длиной около 15 мм с одним набором 200–400 генов, а далее – эукариот, приобретших настоящее ядро.

Эндосимбиотическая теория Маргулис. Согласно представлению Маргулис, эукариотические клетки появились около 650 млн лет тому назад в Древнем океане. Возникли они якобы на основе примитивных фаготрофных клеток, питавшихся бактериями, которые на каком-то этапе эволюции превратились у одних из них в митохондрии, дав начало животным клеткам, а у других – в хлоропласты, определив развитие растений. Так сказать, вошли в их «кровь и плоть», став цитоплазматическими органеллами, запасающими энергию в виде аденозинтрифосфорной кислоты, которая затем расходуется в процессах питания и дыхания.

В пользу того, что бактерии стали митохондриями и хлоропластами эукариот, говорит то, что те и другие автономно размножаются, не возникают *de novo* (вновь), имеют замкнутую в кольцо ДНК.

Если исходить из этого представления, то, образно говоря, ассимилированные бактерии «зажгли» развитие эукариот, и живая система приобрела дискретное пластическое состояние. И как тут не вспомнить американского писателя, критика и философа Генри Менкена, который однажды заметил, что «похороны и пожары являются главным двигателем прогресса». Но если выразить эту мысль научным языком, то истоки эволюционного прогресса надо искать в симбиозе.

Гипотеза Кальвина и *Вёзе.* Американские ученые М. Кальвин и К. Вёзе, установившие цикл аутотрофной ассимиляции углекислоты, в книге «Поиски общих предков» (1985) доказывают, что на Земле одновременно появилась

радио- и термоустойчивая генетически разнородная триада сообщности: архебактерии, обладавшие особым типом фотосинтеза, при котором свет поглощался не хлорофиллом, а особым белком бактериородопсином, эубактерии и уркариоты с достаточно развитой клеточной организацией ядерных клеток. Все они, по мнению ученых, господствовали на Земле 3 млрд лет и сформировали геохимическую структуру поверхности Земли, в частности создали отложения оксидов металлов, железнорудные пласты-гиганты Кривого рога и Курской магнитной аномалии и дали начало эукариотным клеткам с настоящим ядром, но как произошел этот решающий перелом в эволюции органического мира – остается неизвестным. В связи с этой гипотезой большой интерес представляют исследования немецкого биолога Н. Денхера, обнаружившего в мембранах современных галофильных (*hals* – соль) бактерий, обитающих в соленых водоемах и Мертвом море, бактериородопсин, по свойствам близкий ретиналю глаза человека и хлорофиллу растений. При этом важно подчеркнуть, что все они детерминируются сходными по структуре генами, ДНК-нить которых связала различные организмы, стоящие на разных ступенях биологической лестницы.

Таким образом, следует полагать, что жизнь на Земле зарождалась прямо с экологических систем. Сама по себе бактерия или какой-либо иной специализированный в одном направлении организм из-за ограниченности ресурсов рано или поздно прекратил бы свое существование подобно дрожжам в винной бочке от наработанного ими спирта.

Распространение микробов в биосфере

В природе микроорганизмы занимают невообразимо большое количество экологических ниш, участвуя как продуценты и редуценты во всех трофических цепях, что определяется разнообразием их метаболизма, позволяющим приспосабливаться к разным условиям среды обитания. В частности, группа эубактерий, включающая фотосинтезирующие анаэробные виды зеленых и пурпурных бактерий, цианобактерии (сине-зеленые водоросли) и хемосинтезирующие бактерии, населяет почву, воду и другие обычные объекты окружающей среды, а архебактерии, например серные анаэробные бактерии, обитают в го-

рячих кислых водоисточниках (гейзерах), крайние галофилы – в очень соленых морских водах, а метанообразующие бактерии, восстанавливающие диоксид углерода до метана, – в болотных топях.

Численность и видовой состав микробов в разных оболочках биосферы. Наиболее богаты микробами 15 см верхнего слоя почвы, поверхностные воды и прибрежные участки дна рек, морей и океанов. Подсчитано, что в верхнем слое 1 га плодородной почвы в летнее время может содержаться около 5 т бактерий и грибов, а в одном грамме чернозема – более 5 млрд микробных тел (м. т.). Меньше всего их в глинистом подзоле, сероземе и рыхлых песках (900 тыс. м. т./г). Во всех типах почв особенно высокой насыщенностью отличаются околокорневые ризосферные зоны, где всегда происходит интенсивное размножение микрофлоры.

Количественные соотношения собственно водных (аутохтонных) микроорганизмов в открытых водоемах колеблются в широких пределах, что зависит от типа водоема, сезона и степени его загрязнения. Так, в сильно загрязненной органическими веществами полисапробной (*sapros* – гнилой) зоне их, вместе со случайной (аллохтонной) микрофлорой, около 1 млн м. т./мл, в умеренно загрязненной – 100 тыс. м. т./мл и более, а в олигосапробной зоне чистой воды – от 10 до 1000 м. т./мл.

Количество постоянно находящихся резидентных микроорганизмов атмосферного воздуха сравнительно невелико. Больше всего их содержится в околоземных слоях атмосферы. По мере удаления от земной поверхности в экологически благоприятных регионах воздух становится чище.

Видовой состав почвенной микрофлоры прежде всего зависит от вида почвы. В песчаных почвах преобладают аэробные микробы, а в глинистых – анаэробные. В их составе, как правило, обнаруживаются сапрофические виды спорообразующих бацилл и клостридий, актиномицеты, грибы, микоплазмы, архебактерии, сине-зеленые водоросли и простейшие.

Аутохтонная микрофлора воды мало чем отличается от почвенной, разве только тем, что в ее состав входят *Bacterium aquatilis communis, Pseudomonas fluorescens* и *Leptospira*.

В атмосферном воздухе видовой состав микрофлоры непрерывно меняется. Более или менее регулярно в нем находится резистентная к инсоляции почвенная микрофлора, в частности пигментообразующие микрококки, спороносные бациллы, сапрофические виды актиномицетов, плесневые грибы и дрожжи.

Экологическая роль микробов. В природных условиях микроорганизмы входят в состав биоценозов и в определенном биотопе (участке окружающей среды) вступают с животными и растениями в такие взаимоотношения, которые поддерживают нормальную жизнедеятельность всех ассоциантов. Растения-продуценты и близкие им по функции некоторые виды бактерий-фототрофов, используя энергию Солнца, синтезируют органические вещества, консументы расходуют их на построение своего тела, а микробы-редуценты (в основном бактерии и грибы) превращают их после отмирания продуцентов и консументов в неорганические, которые включаются в новый цикл круговорота.

Каталитическая активность микробов-деструкторов чрезвычайно высока. Скорость дыхания аэробных бактерий на 1 г массы тела в сотни раз превышает скорость дыхания человека, а метаболический потенциал их в верхнем 15-сантиметровом слое 1 га почвы в любой момент эквивалентен метаболическому потенциалу нескольких десятков тысяч человек. Такая интенсивность обмена субстратов и продуктов выделения между микроорганизмами и окружающей средой объясняется очень высоким соотношением у них поверхности и объема, а также большой скоростью размножения. Отличаясь высокой биохимической активностью, микроорганизмы не «атакуют» разные соединения. Каждый отдельный вид бактерий или грибов разлагает один класс органических или неорганических соединений, а некоторые – лишь одно из них, например скользящие бактерии группы *Cytophaga* – целлюлозу. Исключение из этого общего правила составляет род бактерий *Pseudomonas,* расщепляющий многие органические вещества.

Микробный круговорот основных биогенов

На различных этапах циклических превращений элементов, в совокупности составляющих круговорот веществ, участвуют разные виды организмов, но самый большой вклад вносят бактерии.

Круговорот фосфора

Потребность в фосфоре для синтеза его соединений организмы получают, поглощая свободные фосфатные ионы (PO_4^{-3}). Нерастворимые почвенные фосфаты кальция, железа или аммония, а также большинство органических соединений фосфора они не усваивают. Необходимые им фосфатные ионы освобождаются при микробном гидролизе фосфорсодержащих органических соединений после отмирания организмов или в результате перевода в раствор нерастворимых фосфатов кальция и железа, что осуществляют кислые продукты метаболизма бактерий и образованный ими сероводород, участвующий в растворении фосфатов железа.

Круговорот углерода и кислорода

Циклическое превращение углерода и кислорода, не считая горения, происходит в основном в процессе кислородного фотосинтеза и, в меньшей мере, в процессе дыхания. При этом зеленые растения и цианобактерии восстанавливают диоксид углерода до глюкозы и других углеводов, а восстановленная форма кислорода (H_2O) окисляется до молекулярного кислорода. Пурпурные и зеленые бактерии-анаэробы, окисляя NH_3, NO_2^-, H_2, Fe^{2+}, тоже могут восстанавливать CO_2 до органических веществ, но их вклад в общую фиксацию диоксида углерода незначителен. Обратный процесс окисления органических веществ до CO_2 в присутствии кислорода осуществляют псевдомонады, бациллы, актиномицеты, другие бактерии, грибы и животные. Неполное окисление сахаров до ацетата вызывают уксуснокислые бактерии (*Acetobacter*), до глюконовой кислоты – аспергиллы и пенициллы, до лактата – грибы порядка *Mucorales*.

В анаэробных условиях органические вещества расщепляются путем брожения дрожжами, молочнокислыми и пропионовокислыми бактериями или окисляются денитрифицирующими, сульфатредуцирующими и метанобразующими бактериями при наличии нитратов, сульфатов, карбонатов, фумаратов, Fe^{3+} как акцепторов водорода.

Круговорот азота

Растительный и животный мир, а также большая часть микроорганизмов для своего питания используют только связанный азот в форме аммиака, нитрата и органических соединений, которых в почве и воде часто не хватает, что ограничивает их развитие и ставит в зависимость от немногочисленных видов бактерий, фиксирующих атмосферный азот и участвующих в процессе образования аммиака (аммонификация) с последующим его превращением в нитрат (нитрификация).

Азотфиксация. Самыми активными азотфиксаторами являются бактерии рода *Rhizobium,* развивающиеся в корневых клубеньках бобовых растений, цианобактерии рода *Anabaena*, живущие внутри листьев водного папоротника азоллы, и актиномицеты рода *Franckia,* обитающие на корнях ольхи и облепихи, а среди свободноживущих – *Azotobacter, Beijerinckia* и *Bacillus polymyxa* (аэробы), фотосинтезирующие бактерии и клостридии (анаэробы).

Аммонификация. При попадании в почву растительных и животных белков и НК, мочевины, выделяемой млекопитающими, мочевой кислоты, попадающей в нее с выделениями пресмыкающихся и птиц, происходит их разложение с выделением аммиака. Процесс аммонификации обусловливается различными грибами, псевдомонадами, вульгарным протеем, *Bacillus cereus* и другими бактериями.

Нитрификация. Аммиак переводят в нитраты, являющиеся основным азотистым веществом, которое используется растениями, две группы аутотрофных бактерий-аэробов: *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosolobus,* окисляющих его вначале до нитрита, и *Nitrobacter, Nitrosococcus, Nitrospina,* превращающих нитриты в нитраты. При этом на первом этапе нитрификации участвуют гетеротрофные виды *Arthrobacter,* а на втором – грибы, но скорость нитрификации аммиака, вызванная ими, очень мала.

Денитрификация. Когда кислород в результате нитрификации исчерпывается, то некоторые факультативно-аэробные виды, например *Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, Paracoccus denitrificans, Thiobacillus denitrificans,* используя нитраты в качестве акцептора водорода, восстанавливают их. В ходе этого процесса, называемого *денитрификацией* (нитратным дыханием), связанный

азот удаляется из почвы и воды с освобождением в атмосферу молекулярного азота. В результате снижается урожайность сельскохозяйственных культур. Тем не менее денитрификация – необходимое условие существования жизни на суше, так как растворимые ионы нитрата, постоянно выщелачиваясь из почвы, переносятся в Мировой океан. Без денитрификации весь земной азот, включая атмосферный, сосредоточился бы только в нем и жизнь стала бы невозможной на большей части суши. Денитрификация имеет также большое экологическое значение. Благодаря ей пресная вода непрерывно освобождается от высоких концентраций ионов нитратов, токсичных и мутагенных для человека и животных.

Круговорот серы

Для организмов сера доступна в основном в форме растворимых сульфатов. Чтобы она могла включиться в органические соединения, сульфаты, подобно нитратам, должны быть восстановлены, так как во всех организмах сера представлена почти всегда в восстановленной форме в виде сульфгидрильных (– SH) или дисульфидных (–S–S–) групп. В анаэробном процессе разложения белков сульфгидрильные группы метионина, цистеина, гомоцистеина отщепляются *Desulfovibrio, Desulfococcus, Desulfosarcina* и другими родами облигатно анаэробных бактерий, обладающих десульфуразами. При этом в атмосферу ежегодно выделяется около 90 млн т сероводорода, значительная часть которого в отсутствии кислорода окисляется фототрофными бактериями семейства *Chromatiaceae* до серы и сульфата, а в аэробных условиях – серобактериями *Beggiatoa* и *Thiothrix* через промежуточное образование свободной серы. Элементарную серу до сульфата окисляют бактерии рода *Thiobacillus*, которые, образуя серную кислоту и уменьшая щелочность почвы, переводят карбонат кальция в сульфат.

Таким образом, благодаря участию различных групп микроорганизмов-сапрофитов (*sapros* – гнилой, *phyton* – растение) в круговороте биогенов сформировался состав почвенного покрова Земли, образовались нефть, природный газ, лечебные грязи, рапа и многие другие полезные в народном хозяйстве и медицине вещества.

Типы взаимоотношений микроорганизмов в биоценозах

Между различными видами (группами) микроорганизмов и другими сочленами биоценозов по характеру и природе их взаимодействия сформировались два типа симбиотических (*simbiosis* – сожительство) взаимоотношений – экто- и эндосимбиоз, а по последствиям партнерских отношений – комменсализм, паразитизм, мутуализм, синергизм, сателлизм, антагонизм, метабиоз.

Эктосимбиоз – сожительство свободноживущих видов микроорганизмов в автономном состоянии, классическим примером которого может быть ассоциация гриба (обычно аскомицета) с одним, иногда двумя видами цианобактерий в лишайнике.

Эндосимбиоз – тип сожительства, при котором один вид микроба локализуется внутриклеточно в другом, как, например, пресноводные цианеллы (зоохлореллы) и морские водоросли (зооксантеллы) в цитоплазме простейших.

Комменсализм – сотрапезничество (*com* – вместе и *mensa* – стол, трапеза), которое обычно устанавливается между организмами, обладающими средствами защиты, и незащищенными, «бесквартирными», паройками (*para* – вне, *oikia* – квартира).

Паройками, например, является кишечная микрофлора, усваивающая целлюлозу и принимающая косвенное участие в образовании молока у рогатого скота, а у человека – участвующая в обмене веществ и продуцирующая антибиотики, подавляющие патогенные энтеробактерии.

Более казуистичным является комменсализм «*Chlorochromatium*», представляющий собой ассоциацию палочковидной бесцветной бактерии с фотосинтезирующими зелеными бактериями, пластами, покрывающими ее, и жгутиковыми видами простейших, живущих в кишечнике термитов и несущих на своей поверхности мантию из спирохет.

Паразитизм (*para* – возле и *sitos* – хлеб, пища) – форма антагонистических взаимоотношений двух организмов, принадлежащих к разным видам. При этом один из сим-

бионтов (паразит) использует другого (хозяина) в качестве среды обитания или источника пищи, возлагая на него регуляцию своих отношений с внешней средой. Паразитов подразделяют: на облигатных (строго зависимых) и факультативных, или частично зависимых; эктопаразитов, обитающих на поверхности тела хозяина, и эндопаразитов, живущих во внутренних полостях, тканях и клетках хозяина. Их характерной особенностью является возрастание специализации, сужение круга хозяев, утрата ферментов, редуцирование одних органов (органелл) и усложнение других.

Паразиты-микробы встречаются во многих классах и семействах про- и эукариот, а царство вирусов представлено ими целиком. Здесь уместно будет кратко описать лучше всего изученного паразита бактерий *Bdellovibrio bacteriovorus* (*bdellus* – пиявка), представляющего собой группу мелких (0,3–0,45 мкм) грамотрицательных, очень подвижных бактерий, обладающих полярным жгутиком, одетым чехлом. Они атакуют и убивают другие грамотрицательные бактерии. Прикрепляются бделловибрионы к бактериальной клетке в считанные секунды и, пробуравливая ее оболочку, через 5–10 мин проникают в пространство между ней и мембраной бактерии, где, превратившись в длинную нить, сегментируются на пропорциональное число зрелых особей. Весь период паразитирования занимает около 4 ч и заканчивается лизисом бактерии-хозяина с освобождением потомства бделловибрионов.

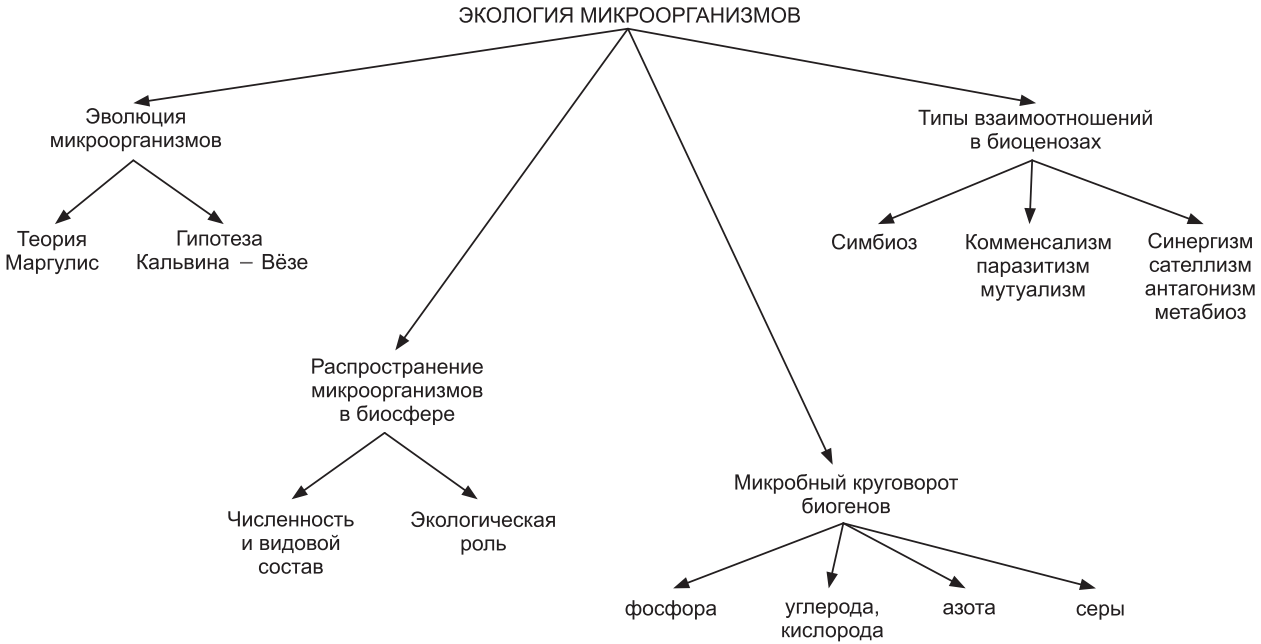
В антагонистических системах паразиты регулируют численность популяции, очищая ее от генетически неполноценных особей. Устойчивая часть организмов вырабатывает антипаразитарный иммунитет, а это, в свою очередь, оттачивает механизмы изменчивости и адаптации антагониста.

Мутуализм – взаимовыгодное сожительство. Как и паразитизм, он бывает облигатным, без которого два различных в видовом отношении микроорганизма существовать не могут (грибы + водоросли в лишайнике, простейшие + водоросли), и факультативным, что отмечается в ассоциациях грибов и бактерий, обитающих в почве, непосредственно окружающей корни растений. Так, при достаточ-

ном количестве в почве аммиака и нитратов бактерии рода *Rhizobium* перестают усваивать азот, и растения не формируют клубеньков, но союз вновь восстанавливается, когда первые начинают испытывать нужду в азоте, а вторые – в органике. В биоценозах мутуализм распространен шире, чем другие формы симбиоза. Предполагается, что взаимовыгодные отношения у растений и микробов возникли около 430 млн лет тому назад в силурийский период, когда на Земле начали происходить горообразовательные процессы, сопровождающиеся обмелением и пересыханием морей, и растения начали переходить на сушу. Выжить на суше им мог помочь лишь симбиоз с азотфиксирующими и нитрифицирующими видами микробов. Когда же Земля обогатилась органическими соединениями и на ней сформировался круговорот азота, большинство растений утратило сотрудничество с азотфиксаторами, и только около ста их видов по сей день вступают с ними во взаимовыгодный симбиоз.

Синергизм, сателлизм, антагонизм и метабиоз. Во всех биоценозах между различными видами микроорганизмов сложился ряд специфических взаимоотношений, в частности: 1) синергизм (*syn* – вместе, *ergon* – действие), основанный на взаимном усилении физиологических функций биологически активными продуктами симбионтов, что можно наблюдать, например, в ассоциации молочнокислых бактерий и дрожжей; 2) близкий синергизму по природе сателлизм с односторонней стимуляцией гемофилов бактериями-кормилками, в роли которых выступают сарцины и стафилококки, вырабатывающие необходимый им фактор роста (термостабильный кофермент); 3) антагонизм как соперничество (*antagonizmai*) в борьбе за источники питания и энергии, в котором микроорганизмы, как инструмент подавления (истребления) конкурентов, используют антибиотики и подобные им бактериоцины (см. «Антибиотики» и «Плазмиды бактериоциногении»).

В ряде биотопов установилась общая для трофических цепей взаимосвязь по эстафетной утилизации продуктов жизнедеятельности друг друга, или метабиоз, лучше всего прослеживаемый в хорошо изученной череде усвоения азота в процессах аммонификации и нитрификации.


ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ
Эволюция микроорганизмов
Теория Маргулис
Гипотеза Кальвина – Вёзе
Распространение микроорганизмов в биосфере
Численность и видовой состав
Экологическая роль
Микробный круговорот биогенов
фосфора
углерода, кислорода
азота
серы
Типы взаимоотношений в биоценозах
Симбиоз
Комменсализм паразитизм мутуализм
Синергизм сателлизм антагонизм метабиоз

Граф 16

Симбиотическая микрофлора здорового человека

Микрофлора, выделенная от здорового человека, отличается видовым разнообразием. При этом одни виды микроорганизмов обитают в организме человека постоянно и составляют нормальную, или резидентную, группу микрофлоры, другие – обнаруживаются периодически, попадая в организм от случая к случаю.

Нормальная микрофлора: 1) заселяет (колонизирует) определенный участок (полость) тела человека и доминирует в нем; 2) отличается относительной стабильностью видового состава в соответствующей ей экологической нише; 3) ведет сапрофитический образ жизни; 4) является фактором и индикатором антиинфекционной резистентности организма; 5) находится в равновесном состоянии между собой (эубиоз) и организмом человека.

Нормальная микрофлора различных отделов организма человека

Микрофлора кожных покровов и конъюнктивы глаза. На коже и конъюнктиве глаза обитают микро- и макрококки, коринеформы, плесневые дрожжи и дрожжеподобные организмы рода кандида, микоплазмы, условно-патогенные стафилококки, реже – стрептококки. Другие виды микробов, как, например, актиномицеты, грибы, клостридии, эшерихии, гемолитические стрептококки, золотистые стафилококки, обсеменяют кожу и конъюнктиву в условиях сильной запыленности воздуха помещений, загрязнения предметов обихода и производственной обстановки, прямого контакта с почвой. При этом на коже количество микробов во много раз больше, чем на той же площади глаза, что объясняется высоким содержанием в секрете конъюнктивы микробоцидных веществ.

Микрофлора верхних дыхательных путей. Постоянная микрофлора содержится только в полости носа, носоглотки и зева. В ее составе обнаруживаются ассоциации сапрофитов (грамотрицательные катаральные микрококки и фарингиальные диплококки, дифтероиды, капсульные грамотрицательные палочки, актиномицеты) с условно-

патогенными видами бактерий (стафилококки, пептококки, бактерии инфлюэнцы, протей, дрожжеподобные организмы, аденовирусы). Конечные ветви бронхов и легочные альвеолы стерильны.

Микрофлора полости рта и желудочно-кишечного тракта. Кишечный тракт новорожденных в первые часы жизни свободен от микроорганизмов и заселяется ими только после кормления грудью. Специфические (аутохтонные) виды микроорганизмов в полости рта ребенка появляются через 2–7 сут. Среди них 30–60 % от всей аутохтонной микрофлоры составляют стрептококки, обладающие тропизмом к сосочкам языка (*S. salivarius*), эпителию щек (*S. mitior*) и поверхности зубов (*S. sangis, S. mutuus*). Другие участки рта заселяются микоплазмами (*M. orale, M. salivarium*), дрожжеподобными грибами рода *Candida,* сапрофитическими видами трепонем, боррелий и лептоспир, энтамеб и трихомонад. Попадающая в желудок с пищей микрофлора ротовой полости погибает. Выживают в желудочном соке лишь единичные особи дрожжей, микрококков, актиномицетов, микобактерий и спорообразующих бацилл (при язвенной болезни желудка обнаруживаются хелико – и кампилобактеры). Тонкий кишечник детей и взрослых тоже не содержит специфических видов микробов, а случайные – столь же редки и немногочисленны, как и в желудке.

Толстый кишечник заселяется транзиторными микробами с первого дня жизни, а на 7–9-е сут формируется свойственный взрослому человеку микробиоценоз. Превалируют в нем облигатные анаэробы с сильно выраженными антагонистическими свойствами, в частности – бифидобактерии, лактобациллы, бактероиды и эубактерии, на долю которых приходится 90–95 % всех высеваемых из кишечника микробов. При этом в 1 г фекалий здорового человека может находиться от 1–10 млрд (у детей) до 50 млрд (у взрослых) живых особей бифидобактерий. Другие сочлены микробного ценоза толстого кишечника, в сумме не превышающие 5–10 %, – это факультативные анаэробные бактерии. Среди них у здоровых людей больше всего кишечных палочек и молочнокислых стрептококков (примерно 1–1,5 %). Десятые-сотые доли процента кишечного биоценоза приходятся на так называемую оста-

точную микрофлору: клостридии, энтерококки, протей, кандида, аэробные бациллы, энтеровирусы и пр. Это процентное соотношение резидентной микрофлоры толстого кишечника у взрослого человека остается почти неизменным, если не считать постепенно нарастающего доминирования кишечных палочек среди аэробных сочленов микробиоценоза и значительного расширения его видового состава – до 300 и более видов.

Микрофлора мочеполовых путей. Мочевыводящие пути здоровых людей стерильны, и лишь в передней части мочеиспускательного канала встречаются грамотрицательные непатогенные бактерии, коринеформы, микрококки, стафилококки и другие случайные виды микроорганизмов. На наружных половых органах обитают микобактерии смегмы и микоплазмы. Влагалище со 2–5-го дня жизни новорожденного на многие годы заселяется непатогенной кокковой микрофлорой, которая при половом созревании заменяется молочнокислыми бактериями рода лактобацилл. При этом pH влагалищного содержимого здоровых женщин колеблется от 4,0 до 5,5 и, кроме молочнокислых бактерий, содержит небольшое количество сопутствующих им грамположительных диплококков. Во время менструации содержимое влагалища становится щелочным, что стимулирует развитие кокковидных бактерий. Эта закономерная динамика смены микробных ценозов влагалища изменяется в период половой жизни.

Медико-биологическое значение нормальной микрофлоры человека

Установившиеся в процессе эволюционного развития симбиотические взаимоотношения между нормальной микрофлорой и организмом человека играют важную роль в жизнедеятельности организма. В частности, бифидобактерии участвуют в белковом, липидном и минеральном обмене веществ; оказывают благотворное влияние на секреторную функцию кишечника; способствуют всасыванию кальция, железа, витамина D; совместно с кишечной палочкой образуют витамины группы B и K; в ассоциации с молочнокислыми палочками и стрептококками создают в кишечнике кислую среду, препятствующую

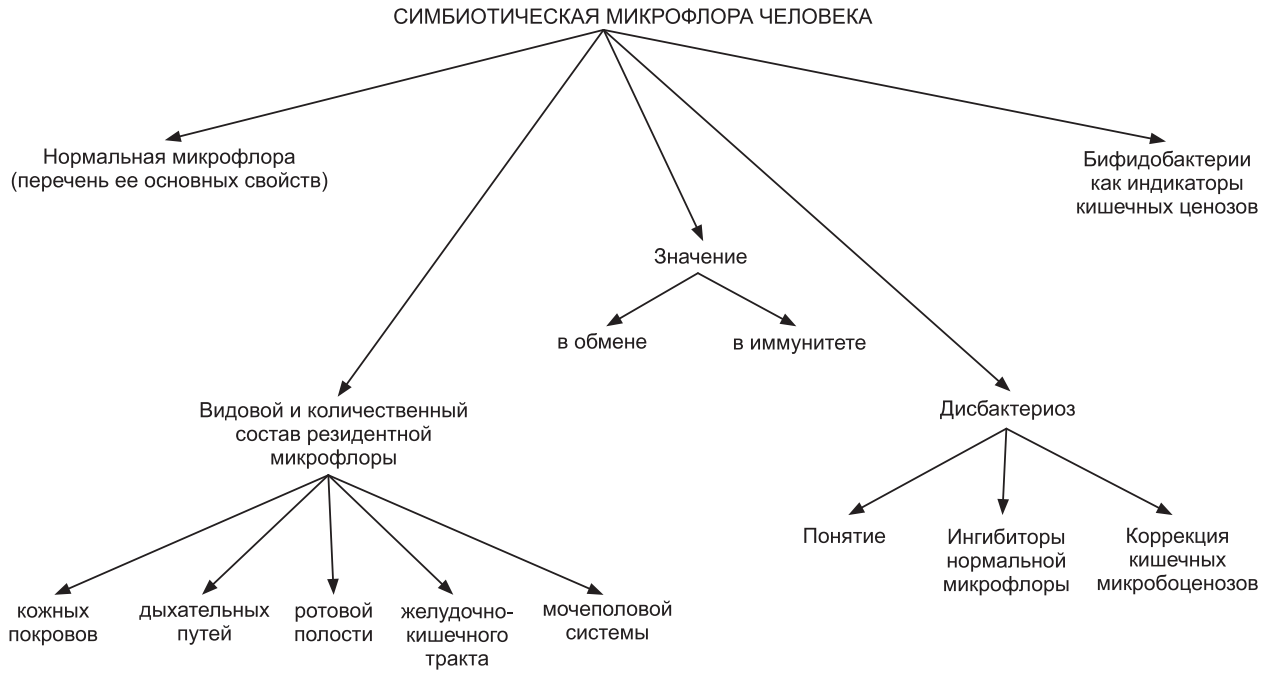
размножению патогенной, гнилостной и газообразующей микрофлоры. Сапрофитические кишечные палочки выделяют колицины, угнетающие близкие им по биологическим свойствам энтеропатогенные штаммы, шигеллы, сальмонеллы и другие патогенные энтеробактерии. Актиномицеты-симбионты организма, выделяя антибиотики широкого спектра действия, могут ингибировать почти все виды патогенных прокариот и грибов. Антагонизм других видов микробного ценоза человека в отношении патогенных микробов может выражаться в интерференции или простой конкуренции за питательный субстрат и кислород, использовании необходимых для развития патогенной микрофлоры факторов роста, как, например, ионов железа, или выделении метаболитов и веществ, изменяющих pH и окислительно-восстановительный потенциал среды (молочнокислые лактобациллы влагалища). Не меньшее значение в обеспечении антимикробного иммунитета, как считают в настоящее время, имеет пристеночная М-микрофлора, предотвращающая колонизацию слизистых оболочек толстого кишечника патогенными видами микробов. Помимо прямого антагонистического воздействия на патогенные микроорганизмы, нормальная микрофлора является, по-видимому, фактором стимуляции иммунной системы. Так, у безмикробных животных (гнотобиотов) остается недоразвитой лимфоидная ткань и в крови снижен уровень нормальных антител.

Нарушение микробного ценоза приводит к дисбактериозам, под которыми понимают совокупность патологических изменений в различных органах и системах, вызванных необычно бурным развитием отдельных ассоциантов, обладающих болезнетворными свойствами. Наиболее часто дисбактериозы возникают при белковом голодании, витаминной недостаточности и, главное, длительном использовании с целью лечения больных антибиотиков и сульфаниламидов широкого спектра действия, ингибирующих нормальную микрофлору. Это воздействие чаще всего испытывает постоянная микрофлора толстого кишечника. В результате развивается кандидоз (см. «Внутрибольничные инфекции»). Еще более чувствительны к антимикробным препаратам молочнокислые бактерии влагалища, которые под их влиянием могут полностью

исчезать и заменяться гноеродными видами бактерий, способными вызывать воспалительные процессы. Активация гноеродных микроорганизмов происходит также при снижении общего и местного иммунитета, вызванном ухудшением условий жизни и нарушениями санитарно-гигиенического режима, что ведет к возникновению фурункулезов, пиодермий, конъюнктивитов, блефаритов и других воспалительных заболеваний кожи и глаз.

Таким образом, количественный и качественный состав постоянной микрофлоры тела человека, с одной стороны, определяется резистентностью организма, а с другой – та же микрофлора сама обусловливает ее, о чем, в частности, свидетельствует успешное применение для лечения кишечных инфекций бифидо-, коли- и лактобактеринов, содержащих живые лиофилизированные культуры соответствующих бактерий. В этой связи следует отметить, что о состоянии нормальной микрофлоры кишечника и проявлении дисбактериоза как болезни можно судить по наличию и количеству кишечных палочек (см. «Эшерихии») и бифидобактерий.

В заключение вкратце приводим морфолого-культуральные свойства бифидобактерий. Представлены они булавовидными или лопатовидными нередко раздвоенными в виде буквы игрек (отсюда и название *bifidus*) полиморфными грамположительными палочками. Спор и капсул не образуют, неподвижны. Являются облигатными анаэробами. Оптимальная температура роста 36–38 °С. Выделяют бифидобактерии на слабощелочной (pH 7,4) *среде Блаурока:* 1 л печеночного бульона, 10 г пептона, 10 г лактозы, 5 г натрия хлорида, 100 мг цистина, 20 г агара. При этом 1 мл фекалий, тщательно суспендированных в 9 мл изотонического раствора натрия хлорида, засевают в 9 мл расплавленной и охлажденной до 40 °С среды. Смешав их, 1 мл переносят во вторую пробирку с таким же объемом среды, из второй – в третью и вплоть до 10–15-й, с таким расчетом, чтобы в столбике печеночного агара вырастало не больше 10 колоний. Засеянные среды помещают в термостат. Колонии бифидобактерий появляются через 2–3 сут в виде трехгранных пирамидок. Первичная идентификация их основывается на микроскопии мазков, окрашенных по Граму.


СИМБИОТИЧЕСКАЯ МИКРОФЛОРА ЧЕЛОВЕКА
Нормальная микрофлора (перечень ее основных свойств)
Значение
в обмене
в иммунитете
Бифидобактерии как индикаторы кишечных ценозов
Видовой и количественный состав резидентной микрофлоры
кожных покровов
дыхательных путей
ротовой полости
желудочно-кишечного тракта
мочеполовой системы
Дисбактериоз
Понятие
Ингибиторы нормальной микрофлоры
Коррекция кишечных микробоценозов

Граф 17

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Физиология микроорганизмов изучает их метаболизм, влияние факторов окружающей среды на их жизнедеятельность, потребность в питательных веществах (ростовых факторах), способы приготовления питательных сред, условия культивирования (выращивания), характер роста и другие биологические свойства.

Метаболизм микроорганизмов

Под термином *метаболизм* понимают совокупность протекающих в микроорганизмах (клетках) химических реакций превращения веществ и энергии и обмена ими с окружающей средой. Внутриклеточный метаболизм складывается из двух фаз – *катаболизма* (энергетический обмен) и *анаболизма* (конструктивный обмен). В первой из них сложные органические молекулы расщепляются до более простых промежуточных и конечных веществ. Так, углеводы, жиры и белки, поступающие извне или находящиеся в виде остаточных (запасных) веществ внутри клетки в серии последовательных реакций, распадаются до молочной кислоты, диоксида углерода, воды и аммиака. При этом высвобождающаяся из расщепляющихся молекул свободная энергия на определенных этапах катаболических путей благодаря сопряженным ферментативным реакциям запасается в форме высокоэнергетического соединения – аденозинтрифосфата (АТФ), а некоторая ее часть – в богатых энергией водородных атомах кофермента никотинамидадениндинуклеотидфосфата, находящегося в восстановленной форме (НАДФН).

В фазе анаболизма (биосинтеза) из малых молекул-предшественников синтезируются белки, НК, полисахариды и другие макромолекулярные вещества клеток, для чего, естественно, необходима свободная энергия. В большинстве случаев источником ее получения является расщепляющаяся АТФ, а при биосинтезе некоторых клеточных компонентов, где требуются богатые энергией водородные атомы, например липидов, – НАДФН. Все реакции метаболизма, протекающие в клетках, регулируются ферментами.

Ферменты микроорганизмов

Понятие. Ферменты – это биологические катализаторы, которые, связываясь с молекулами реагирующих веществ, резко снижают активационный барьер, препятствующий началу химической реакции.

Свойства ферментов. Ферменты, как и химические катализаторы, обладают двумя основополагающими свойствами.

1. Не входят в состав конечных продуктов реакции и не расходуются в ее циклическом процессе.

2. Ускоряют только те реакции, которые, подчиняясь законам термодинамики, могут протекать и без их участия.

От химических катализаторов ферменты отличаются по структуре и характеру действия: 1) являются белками; 2) обладают избирательно узким спектром действия на субстраты; 3) в производстве веществ и соединений обеспечивают почти 100 %-ный выход чистых продуктов; 4) в организме регулируют и координируют метаболические процессы образования жизненно необходимых веществ, участвуя в поддержании гомеостаза. При этом скорость протекания ферментативных реакций в организмах на несколько порядков выше, чем реакций *in vitro* с участием химических катализаторов.

Классификация ферментов бактерий. По механизму действия выделяют шесть основных классов бактериальных ферментов: 1) оксидоредуктазы, катализирующие перенос электронов; 2) изомеразы, осуществляющие перенос атомных групп внутри молекулы с образованием изомерных форм; 3) трансферазы, участвующие в переносе химических групп от одной молекулы к другой; 4) гидролазы, переносящие функциональные группы на молекулу воды; 5) лиазы (синтетазы), осуществляющие прямые и обратные реакции присоединения химических групп по двойным связям в молекулах; 6) лигазы, образующие C – C-, C – S-, C – O- и C – N-связи за счет реакций конденсации, сопряженных с распадом АТФ.

Среди них различают *простые ферменты*, представляющие собой белки, при гидролизе распадающиеся на аминокислоты (пепсин, трипсин, уреаза, лизоцим и др.), и *сложные,* или *голоферменты*, в состав которых кроме белка (апофермента) входят кофакторы (ионы Fe, Mn, Zn и др.) и коферменты (производные витаминов и фосфорной

кислоты, нуклеотиды, фолиевая кислота, глутатион и др.), которые, будучи прочно связанными с белковым компонентом, называются *простетическими группами*; *нерегуляторные* и *регуляторные; экзоферменты* и *эндоферменты*, тесно связанные с клеточными структурами; *конститутивные*, непрерывно продуцирующиеся бактериями, и *индуцибельные,* или *адаптивные*, синтезируемые ими при внесении в среду соответствующих веществ; *катаболические*, расщепляющие сложные органические молекулы, и *анаболические*, участвующие в биосинтезе жизненно важных веществ, а по специфичности действия – *избирательно специфические*, действующие лишь на одноединственное вещество и катализирующие только определенное его превращение, как, например, уреаза, расщепляющая мочевину на NH_3 и CO_2, и ферменты, *обладающие групповой специфичностью*, участвующие в катализе веществ, отличающихся по структуре и физико-химическим свойствам, к которым, в частности, относятся пепсин и эстеразы.

В отдельную группу выделяют *изоферменты* (*изозимы*), представляющие собой молекулярные разновидности одного фермента, отличающиеся друг от друга электрофоретической подвижностью, адсорбционными свойствами, оптимальным значением pH, термостабильностью, чувствительностью к ингибиторам, сродством к субстратам, способностью образовывать комплексы с аналогами коферментов и др. Среди них различают *генетически детерминированные* и *негенетические* (*вторичные,* или *приобретенные*) формы, возникающие в результате химической модификации исходного фермента или его частичного протеолиза. Примерами первых могут служить пять изозимов лактатдегидрогеназы, содержащих полипептидные цепи двух видов в пяти комбинациях и катализирующих обратимую окислительно-восстановительную реакцию: Лактат + $НАД^+ \leftrightarrow$ Пируват + НАДН + H^+, а вторых – два изозима пируваткиназы M и L с разными сочетаниями полипептидов в структуре и степенью сродства к фосфоенолпирувату, превращающемуся в пируват.

Некоторые болезнетворные бактерии продуцируют специфические *ферменты агрессивности*, как-то: гиалуронидазу, коллагеназу, лецитовителлазу, фибринолизин, нуклеазы, нейраминидазу и пр.

Общий механизм биологического действия ферментов. Каталитическую активность любого фермента определяет его активный центр. У простых ферментов он чаще всего образуется боковыми радикалами серина, гистидина, треонина, цистеина, глутамина, аспарагина и аргинина, а у голоферментов – аминокислотными остатками и кофактором или коферментом. Располагается активный центр, как правило, в углублении («кармане»), образованном третичной структурой молекулы белка-фермента. В нем выделяют зону связывания субстрата, где он закрепляется, и каталитическую, где происходит его превращение в продукт.

В каталитическом действии ферментов выделяют три стадии: 1) присоединение молекулы субстрата (S) к ферменту (E); 2) превращение субстрата; 3) отделение конечных продуктов реакции (P) от катализатора, что можно представить в виде следующей формулы: $E + S \leftrightarrow ES \leftrightarrow E + P$.

Первая стадия – образование фермент-субстратного комплекса ES – становится возможной благодаря взаимному сродству. При этом молекулы фермента и субстрата не только сближаются, но и определенным образом ориентируются относительно друг друга. В результате связывания субстрата с ферментом образуется комплекс, который через ряд промежуточных стадий дает продукт реакции (P). Быстрому протеканию этой реакции способствует то, что взаимодействие фермента с субстратом вызывает в нем высокое напряжение внутримолекулярных связей, легко разрывающихся при относительно небольшом повышении внутренней энергии молекул.

У аллостерических ферментов, участвующих во внутриклеточной регуляции ферментативной активности у бактерий, наряду с активным центром в белковом компоненте имеется один или несколько участков связывания вещества-модулятора (регуляторных центров), ничего общего не имеющих с субстратом. Разные модуляторы аллостерических ферментов оказывают на них как активирующее, так и ингибирующее действие, каждый раз вызывая скачкообразно обратимые конформационные перемены их молекулярной структуры и кинетических параметров активности. Иными словами, плюс-минус-модуляторы модифицируют конформацию и эффективность ка-

таболизма регуляторных ферментов, участвующих в одной и той же реакции. Непосредственного участия в каталитических реакциях они не принимают и поскольку связываются с участком аллостерического фермента вне активного центра, то какого-либо химического или «метаболического» отношения к субстрату не имеют.

Кроме конформационных модуляторов, встречаются также ковалентные, которые индуцируют присоединение – разъединение субъединиц регуляторных ферментов, вызывая изменение их четвертичной структуры с образованием прочных ковалентных связей с модификатором.

Сам по себе аллостерический фермент в мультиферментных системах находится, как правило, в начале метаболического пути и если ингибируется, то тем количеством продукта, которое превышает необходимую для жизнедеятельности клетки концентрацию. В результате этого функционирование регуляторной ферментной системы замедляется или прекращается, с тем чтобы скорость выработки продукта привести в соответствие с потребностями клетки. Ферментная регуляция такого типа называется ингибированием по принципу обратной связи или ретроингибированием.

Конститутивные ферменты синтезируются бактериями непрерывно. Индуцибельные, в отличие от них, – только при наличии в среде соответствующего субстрата (пенициллиназа, β-галактозидаза, щелочная фосфатаза, аминокислотные декарбоксилазы и др.).

Регуляция синтеза индуцибельных ферментов осуществляется путем координированной и последовательной индукции и катаболитной и анаболитной репрессии.

Координированный механизм индукции присущ коротким путям метаболизма, а последовательный – длинным катаболическим путям распада субстратов. При первой из них добавление субстрата, как правило, приводит к одновременной индукции многих или даже всех ферментов. В частности, лактоза индуцирует выработку специфической пермеазы, β-галактозидазы и трансацетилазы, а галактоза, образовавшаяся в β-галактозидазной реакции, – синтез других ферментов, превращающих ее в глюкозо-1-фосфат. Последовательная индукция вызыва-

ется как промежуточными субстратами, так и конечными продуктами.

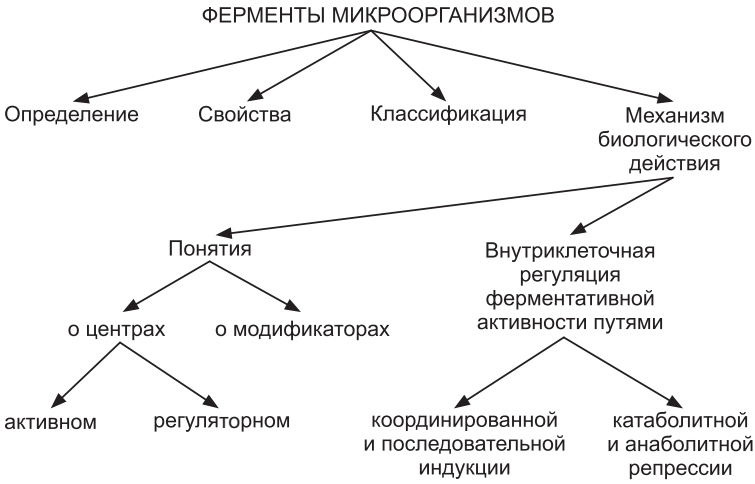
Катаболитная репрессия бактерий представляет собой широко распространенное явление подавления (*repressio*) биосинтеза ферментов одного вещества другим при насыщении ими питательной среды. Так, например, при выращивании лактозоположительных штаммов эшерихий на среде с глюкозой и лактозой моносахарид ингибирует расщепление дисахарида. Это продолжается вплоть до полного использования глюкозы, вслед за чем включается фаза потребления лактозы.

Простая констатация субстрат-субстратного катаболитного ингибирования в последнее время нашла научное обоснование. Оказалось, что катаболитная репрессия утилизации лактозы в первые 6–7 ч роста эшерихий на питательной среде, содержащей глюкозу, вызывается тем, что ее активное использование кишечными бактериями сопровождается резким снижением циклического аденозинмонофосфата (ц-АМФ) – базисного компонента, входящего в состав дерепрессора, вызывающего транскрипцию лактозного оперона (см. «Генетику микроорганизмов»). Точнее говоря, *lac*-опероны эшерихий при малом количестве ц-АМФ в первые часы культивирования остаются репрессированными. Их дерепрессия происходит лишь после использования эшерихиями большей части глюкозы, когда содержание ц-АМФ возрастает и он в комплексе со специфическим белком вступает в связь с белком-репрессором на промоторе *lac*-оперона, включая в работу его структурные гены, детерминирующие пермеазу, β-галактозидазу и трансацетилазу, которые участвуют в разложении и утилизации лактозы.

Образуется ц-АМФ в процессе расщепления АТФ аденилатциклазой, тесно связанной с мембранной фосфотрансферазной системой, перекачивающей в цитоплазму бактерии сахара. При этом если ее компоненты фосфорилированы, что наблюдается при нехватке внутриклеточных углеводов, то, наряду с возрастанием транспорта сахаров внутрь клетки, увеличивается активность аденилатциклазы. Наоборот, при активном фосфорилировании молекул транспортируемых сахаров степень фосфорилирования компонентов фосфотрансферазной системы снижается. Одновременно с этим уменьшается активность адени-

латциклазы и количество ц-АМФ, вследствие чего возникает катаболитная репрессия лактозного оперона. Таким же образом глюкоза у эшерихий репрессирует опероны ксилитола, глицерина, арабинозы и, вероятно, других углеводов. Имеются данные, что аналогичную репрессию катаболитических путей многих углеводов могут вызывать фруктоза и глюкозо-6-фосфат. У других видов бактерий доминирующими в катаболитной репрессии являются иные вещества и соединения. Так, у *Clostridium tetanomorfum,* например, L-глутамат репрессирует синтез ферментов метаболизма глюкозы, а у *Alcaligenes eutrophus* – окисляемый ими водород препятствует запуску метаболического пути Энтнера – Дудорова.

Анаболитная репрессия биосинтеза вещества, в отличие от катаболитной, вызывается не промежуточным, а конечным продуктом, наработка которого приводит к освобождению репрессора функционирующего оперона. В разветвленных биохимических путях, где функционируют несколько родственных ферментов, как, например, у эшерихий, имеющих две гомосериндегидрогеназы и три аспартаткиназы, анаболитная репрессия находится под контролем 2–3 конечных продуктов. Такой вид анаболитной репрессии называется *мультивалентной* репрессией.



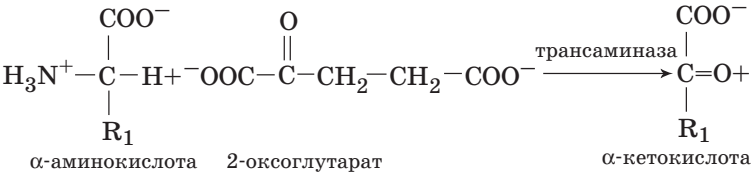
Граф 18

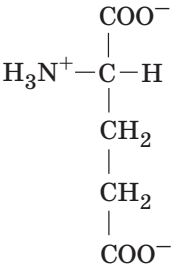
Обмен белков

В отличие от углеводов и липидов, белки не накапливаются в бактериях как запасные вещества, вследствие чего их обмен в каждый конкретный момент представляет собой взаимосменяемый процесс катаболизма ↔ анаболизма, четко регулируемый потребностями организмов. Другой особенностью обмена белков у бактерий является то, что для их построения не используются «готовые» молекулы белка. Чаще всего белки синтезируются ими из аминокислот питательной среды, которые образуются при расщеплении ее белков бактериальными экзопептидазами. «Захваченные» путем эндоцитоза чужеродные или «износившиеся» собственные белки в цитоплазме бактерий расщепляются эндопептидазами.

Катаболизм аминокислот. Начальной стадией катаболизма большинства аминокислот является удаление α-аминогруппы путем переаминирования (трансаминирования) или дезаминирования.

При переаминировании α-аминогруппа аминокислоты присоединяется к α-углеродному атому 2-оксоглутаровой кислоты (реже – к пировиноградной или щавелевоуксусной), в результате чего образуется α-кетоаналог исходной аминокислоты и новая аминокислота:





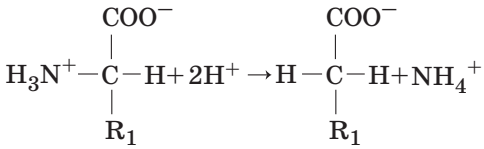
В процессе переаминирования различных аминокислот, исключая лизин и треонин, все их аминогруппы, как в воронку, «собираются» в виде глутаминовой кислоты, реже – аспартата или аланина. Однако и эти две последние, получив аминогруппу и вступив в реакцию с 2-оксоглутаровой кислотой, тоже образуют глутамат. В дальнейшем собранные в глутамате аминогруппы освобождаются в виде ионов NH_4^+.

Дезаминирование аминокислот происходит несколькими способами, в частности различают окислительное, восстановительное, гидролитическое и внутримолекулярное дезаминирование.

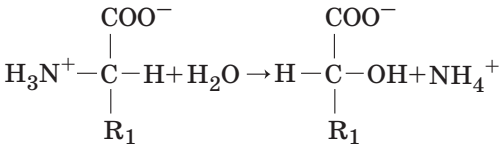
Реакцию окислительного дезаминирования катализирует специфическая α-глутаматдегидрогеназа:

$$\alpha\text{-глутамат} + \text{НАД}^+\ (\text{НАДФ}^+) + H_2O \rightarrow \text{2-оксоглутарат} + \\ + NH_4^+ + \text{НАДН (НАДФН)} + H^+.$$

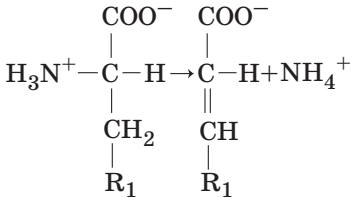
При восстановительном дезаминировании реакция протекает следующим образом:



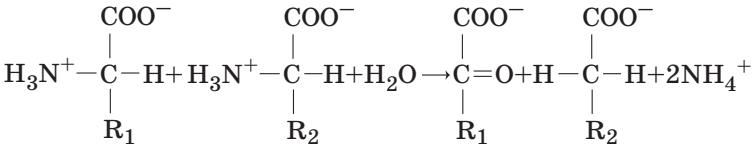
Гидролитическое дезаминирование осуществляется путем присоединения к аминокислоте молекулы воды:



Внутримолекулярное дезаминирование связано с отщеплением аминогруппы от аминокислоты и образованием двойной связи между α-углеродным атомом и соседним углеродом радикала:



В анаэробных условиях микроорганизмы-аммонификаторы разлагают аминокислоты таким образом, что одна окисляется, а другая восстанавливается с выделением аммиака:



Образовавшаяся при этом кетокислота вновь взаимодействует со следующей исходной аминокислотой.

Таким образом, процесс дезаминирования аминокислот является основным способом трансформации азотсодержащих соединений в безазотистые, которые затем используются для превращения в углеводы, липиды и другие молекулы.

Анаболизм аминокислот. В отличие от гетеротрофов, трансформирующих аминокислоты, бактерии-прототрофы образуют их из простых азотсодержащих веществ, в частности NH_4^+, нитратов и нитритов и углеродсодержащих соединений.

Свободный аммиак – ядовитое вещество, а поэтому при питании аммонийными солями микроорганизмы не накапливают его, а сразу используют для синтеза аминокислот. Так, если источником азота являются нитраты, то происходит их восстановление до аммиака в две стадии:

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow \ldots \rightarrow NH_4^+.$$

Первые две стадии катализируются нитратредуктазой. При этом на первой происходит двухэлектронное восстановление нитратов до нитритов (донором электронов слу-

жит НАДН), а на второй – идет шестиэлектронное восстановление нитритов до аммиака:

$$1)\ NO_3^- + НАДН + H^+ \rightarrow НАД^+ + NO^{2-} + H_2O;$$

$$2)\ NO_2^- + 8H^+ + 6\bar{e} \rightarrow NH_4^+ + 2H_2O.$$

Включение NH_4^+ в глутамат происходит в результате реакции восстановительного аминирования, катализируемой глутаматдегидрогеназой:

$$\text{2-оксоглутарат} + NH_4^+ + [\text{НАДН или НАДФН}] \leftrightarrow$$
$$\leftrightarrow \text{глутамат} + [\text{НАД}^+ \text{ или НАДФ}^+] + H_2O.$$

Аналогичным путем происходит прямое восстановительное аминирование пирувата и оксалоацетата с образованием соответственно аланина и аспартата.

С помощью фермента глутаминсинтетазы глутамат может использоваться для фиксации второй молекулы NH_3:

$$\text{Глутамат} + NH_3 + \text{АТФ} \rightarrow \text{глутамин} + \text{АДФ} + \Phi_н.$$

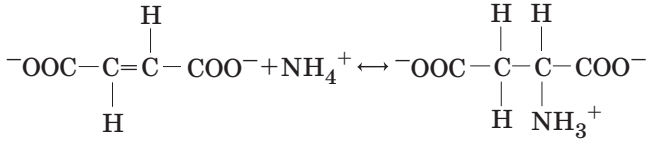
Если количество NH_3 ограничено, его усвоение может происходить при сопряжении предыдущей реакции со следующей, катализируемой глутаматсинтазой:

$$\text{2-оксоглутарат} + \text{глутамат} + \text{НАДФН} + H^+ \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\ \text{глутамат} + \text{НАДФ}^+.$$

Третьим путем усвоения аммиака является образование карбамоилфосфата, катализируемого ферментом карбамоилфосфатсинтазой:

$$NH_3 + CO_2 + 2\text{АТФ} + H_2O \rightarrow H_2N - CO - O - PO_3H_2 +$$
$$+ 2\text{АДФ} + \Phi_н.$$

У некоторых бактерий аммиак используется для синтеза аспартата при прямом присоединении его к фумаровой кислоте:



фумарат аспартат

Реакцию катализирует аспартат-аммиаклиаза.

В результате одностадийного включения NH_3 в кетокислоты образуется сравнительно небольшое число аминокислот. Значительно большее их количество синтезируется в ходе сложных многостадийных реакций.

В целом биосинтез аминокислот сводится к двум основным путям: 1) прямому аминированию α-кетокислот или ненасыщенных органических кислот; 2) переаминированию (трансаминированию) аминокислот и α-кетокислот.

Анаболизм белков. Выделяют пять основных этапов биосинтеза белка: 1) активация аминокислот; 2) инициация полипептидной цепи; 3) элонгация; 4) терминация и высвобождение; 5) сворачивание полипептидной цепи с образованием третичной структуры белка.

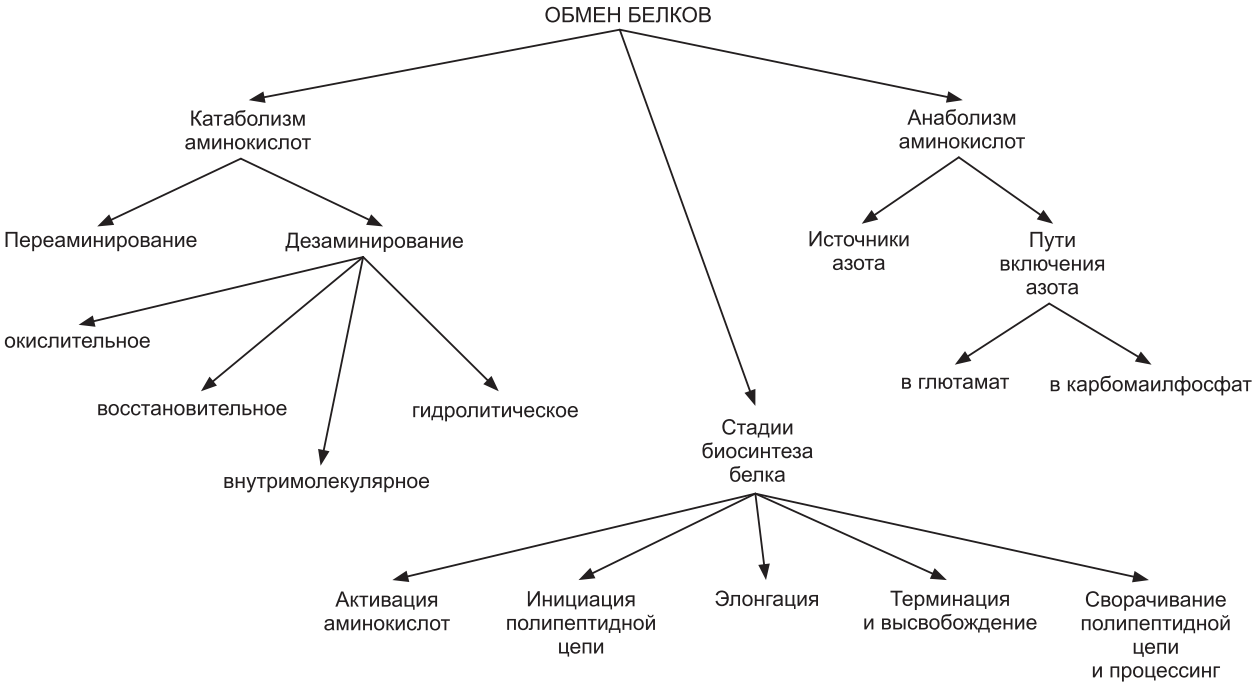
Активация аминокислот. На первом этапе биосинтеза белка аминокислоты присоединяются эфирной связью к соответствующим им тРНК. Процессы эти катализируются в присутствии ионов Mg^{2+} 20 аминоацил-т-РНК-синтетазами, каждая из которых специфична по отношению к одной аминокислоте и соответствующей тРНК.

Инициация полипептидной цепи. На втором этапе иРНК, содержащая информацию о данном полипептиде, связывается с малой субчастицей рибосомы, а затем – и с инициирующей аминокислотой, прикрепленной к соответствующей тРНК. В результате образуется так называемый инициирующий комплекс.

Элонгация. На первой стадии цикла элонгации сначала происходит связывание следующей аминоацил-тРНК с инициирующим комплексом. Для этого процесса у бактерий требуется ГТФ и специфический цитоплазматический белок элонгации EF-T. Необходимая энергия для протекания этих реакций поступает из ГТФ, который гидролизуется до ГДФ и $Ф_н$. В результате очередного акта элонгации образуются пептидные связи.

Терминация и высвобождение. Начинается четвертый этап биосинтеза белка с приходом в рибосому терминирующих кодонов. В этом процессе участвуют многие белковые факторы. У *E. coli*, например, белок RF-1, который узнает кодоны УАА и УАГ, и белок RF-2, реагирующий на данные кодоны.

Сворачивание полипептидной цепи. Новосинтезированный белок остается биологически неактивным до тех


ОБМЕН БЕЛКОВ
Катаболизм аминокислот
Анаболизм аминокислот
Переаминирование
Дезаминирование
Источники азота
Пути включения азота
окислительное
восстановительное
гидролитическое
внутримолекулярное
в глютамат
в карбомаилфосфат
Стадии биосинтеза белка
Активация аминокислот
Инициация полипептидной цепи
Элонгация
Терминация и высвобождение
Сворачивание полипептидной цепи и процессинг

Граф 19

пор, пока он не свернется с образованием присущей ему нативной конформации, которая определяется аминокислотной последовательностью. Этот процесс может протекать самопроизвольно уже во время синтеза полипептидной цепи. Однако часто новообразованная полипептидная цепь не может принять окончательную конформацию, пока она не подвергнется процессингу.

Обмен углеводов

Углеводы являются основным источником энергии для всех видов микроорганизмов, а для гетеротрофных бактерий, кроме того, – главным источником углерода. Моносахариды и дисахариды используются ими для питания, а полисахариды – как их депо, в частности, резервными полисахаридами у бактерий являются крахмал и гликоген, а у некоторых из них – целлюлоза и пектины. При этом поступившие внутрь тела бактерии растворимые углеводы или содержащиеся в ней полисахариды в процессе усвоения подвергаются ферментативному распаду. Процесс этот может происходить гидролизом, реже – фосфоролизом.

Нерастворимые полимеры углеводов входят в состав отдельных структур, выполняющих опорную функцию. В клеточных стенках бактерий такую роль, например, играет пептидогликан.

Метаболизм углеводов в микробных клетках происходит разными путями, но особенностью его является то, что в некоторых бактериях могут быть задействованы глиоксилатный и Кальвиновский циклы их трансформации, отсутствующие в клетках животных и человека.

Катаболизм углеводов. Центральным путем катаболизма углеводов у микроорганизмов является классический путь Эмбдена – Мейергофа – Парнаса (гликолиз), под которым понимают цепь 9 последовательных реакций расщепления глюкозы без участия кислорода до пировиноградной кислоты. Пируват затем может использоваться в молочнокислом, спиртовом, маслянокислом и других видах.

Молочнокислое брожение. Различают два типа молочнокислого брожения – гомо- и гетероферментативное.

Гомоферментативное молочнокислое брожение вызывают *Lactobacillus delbruckii, L. bulgaricus, L. lactis, L. casei, Streptococcus lactis, S. faecalis, Pedicoccus cerevisiae* и дру-

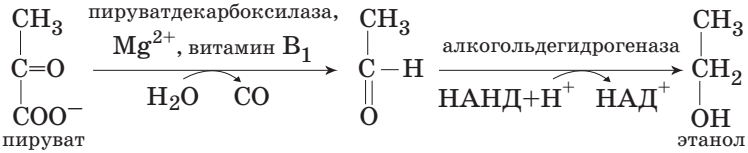
гие анаэробные бактерии, которые восстанавливают пируват в лактат (молочную кислоту), использующийся как акцептор водорода, поддерживая таким образом в реакции пул окисленного НАД$^+$ и сохраняя скорость гликолиза.

Гетероферментативное молочнокислое брожение вызывается *Leuconostoc lactis, L. mesenteroides, Lactobacillus buchneri, L. fermentum, L. brevis*. Протекает оно с образованием промежуточных продуктов пентозофосфатного пути обмена углеводов, в частности рибулозо-5-фосфата, ксилулозо-5-фосфата с участием фосфокетолазы и фосфотрансацетилазы. В фосфокетолазной реакции образовавшийся глицеральдегид-3-фосфат превращается в лактат, а в фосфотрансацетилазной – ацетилфосфат трансформируется в ацетил-КоА с последующим восстановлением его ацетальдегид- и алкогольдегидрогеназами в уксусную кислоту и этанол.

Молочнокислое сбраживание фруктозы, галактозы, маннозы, сахарозы, лактозы, мальтозы и пентоз может иметь специфические особенности. В частности, при сбраживании фруктозы *Leuconostoc mesenteroides* часть образовавшегося НАДН$_2$ используется не для восстановления ацетил-КоА до этанола, как обычно, а для восстановления ее в маннитол. Гомоферментативные молочнокислые бактерии *L. casei* сбраживают пентозы с участием фосфокетолазы, являющейся ключевым ферментом гетероферментативного брожения. Таким образом, при брожении фруктозы образуется лактат, ацетат, CO_2 и маннитол.

В результате чисто гомоферментативного молочнокислого брожения образуется по 2 моля лактата и АТФ на 1 моль глюкозы, при смешанном гетероферментативном лактат-этаноловом – по 1 молю этанола, CO_2 и АТФ на 1 моль глюкозы, а при ацетат-лактатном – 3 моля ацетата, 2 – лактата и 2,5 моля АТФ на 1 моль глюкозы.

Спиртовое брожение. Путь ферментативного расщепления глюкозы при спиртовом брожении, вызванном дрожжами или специфическими эубактериями, например *Sarcina ventriculi* или *Erwinia amylovora*, совпадает с лактатным вплоть до этапа, катализируемого лактатдегидрогеназой, которой они не имеют. В этом случае лактатдегидрогеназная реакция заменяется пируватдекарбоксилазной и алкогольдегидрогеназной. Конечными продуктами при этом являются этанол и диоксид углерода, что суммарно можно выразить следующим образом:



Маслянокислое брожение вызывают бактерии родов *Clostridium, Butyrivibrio* и *Fusobacterium*. При этом клостридии на первом этапе образования масляной кислоты (бутирата) превращают пируват в ацетил-КоА при участии пируват-ферредоксин-оксидоредуктазы, точнее, ферментной системы, включающей несколько последовательных реакций. Синтез бутирата начинается с реакции конденсации двух молекул ацетил-КоА и образования ацетоацетил-КоА с дальнейшим поэтапным превращением его в L(+)-β-гидроксибутирил-КоА, кротонил-КоА, бутирил-КоА, являющихся промежуточными продуктами масляной кислоты. Образуется она из бутирил-КоА не путем простого гидролиза, что было бы связано с потерей энергии, а в результате разрыва тиоэфирной связи и переноса КоА на ацетат с последующим образованием ацетил-КоА, который может быть вновь использован для синтеза масляной кислоты или АТФ. В связи с этим следует подчеркнуть, что маслянокислое брожение дает выход 3 молей АТФ на 1 моль глюкозы, что превышает энергетический баланс всех других типов брожения.

Смешанный тип брожения. В этом типе брожения участвуют многие виды неспецифических бактерий. Так, *Escherichia, Salmonella* и *Shigella* сбраживают сахара до молочной, уксусной, янтарной и муравьиной кислот с некоторым содержанием этанола, диоксида углерода и водорода. Родственные им виды *Enterobacter, Serratia* и *Erwinia* продуцируют меньше кислот, больше этанола, диоксида углерода и особенно много – 2,3-бутандиола.

Выход АТФ в смешанных типах брожения составляет 2–2,5 моля АТФ на 1 моль глюкозы без учета того количества АТФ, которое может синтезироваться при образовании ацетата, катализируемого ацетаткиназой.

Ряд видов *Pseudomonas, Xantomonas, Azotobacter, Rhizobium, Spirillum, Thiobacillus* получают энергию в четырех реакциях бескислородного метаболического пути Энтнера –

Дудорова, который связан через 6-фосфоглюконовую кислоту с пентозофосфатным путем, а через глицеральдегид-3-фосфат – с гликолизом. Специфичными для пути Энтнера – Дудорова являются реакция образования кетодезоксифосфоглюконовой кислоты и ее дальнейшее альдолазное расщепление на пировиноградную кислоту и глицеральдегид-3-фосфат. Если последний в дальнейшем окисляется в реакции гликолиза до пирувата, то из одной молекулы глюкозы, расщепляющейся по пути Энтнера – Дудорова, образуется по одной молекуле АТФ, $НАДН_2$ и $НАДФН_2$.

В общем, бескислородный путь катаболизма углеводов характеризуется незначительным высвобождением энергии, заключенной в них. Так, расщепление молекулы глюкозы в гликолизе на две молекулы лактата сопровождается высвобождением и запасанием лишь 6,9 % ($\Delta G^{\circ\prime} = -47{,}0$ ккал/моль) содержащейся в ней энергии. Остальная часть сохраняется в продуктах гликолиза. Несмотря на это, бескислородный катаболизм углеводов – «надежный» источник энергии, так как в реакциях субстратного фосфорилирования нет «сбоев», ибо энергия окисляющегося субстрата переносится на молекулу АДФ со 100 %-ным выходом.

Полное окисление глюкозы до CO_2 и H_2O с высвобождением всей ее энергии, равной 686 ккал/моль, возможно только в аэробных условиях при окислительном фосфорилировании, но выделяемая при этом энергия полностью не запасается из-за ее теплового рассеивания.

Аэробное расщепление углеводов. Вызывают его многочисленные виды бактерий-аэробов и факультативные анаэробы, в частности эшерихии, превращая образовавшийся в реакциях гликолиза пируват в ацетил-КоА. Реакцию катализирует пируватдегидрогеназный комплекс, состоящий из трех ферментов. В результате действия этого сложного мультиферментного комплекса на пируват он утрачивает один углеродный атом в виде CO_2, два протона, которые затем акцептируются НАД, а к образовавшемуся ацетату присоединяется кофермент А.

Дальнейшие превращения ацетата у большинства аэробных гетеротрофов связаны с циклом трикарбоновых кислот (ЦТК), или циклом Кребса.

При окислении двух молекул ацетил-КоА в цикле Кребса глюкоза полностью окисляется до CO_2 и H_2O. Во-

дород, который отщепляется от окисляющихся интермедиатов в ЦТК, запасается в виде восстановленных НАД, НАДФ и ФАД, которые затем, окисляясь в дыхательной цепи, «передадут» его для «выработки» энергии.

Подавляющее большинство аэробных гетеротрофов используют ЦТК для получения энергии из окисляющихся субстратов и наработки соединений, идущих на биосинтез различных компонентов бактериальной клетки.

У некоторых аэробов, однако, нет полного ЦТК. К ним относятся ряд уксуснокислых бактерий, вызывающих уксуснокислое брожение, протекающее при наличии в среде кислорода, но без его потребления, и бактерии, способные использовать в качестве субстрата только C_1-соединения. У этих микроорганизмов нет 2-оксоглутаратдегидрогеназы, и, следовательно, цикл Кребса у них прерывается. Однако, во-первых, промежуточные органические молекулы цикла трикарбоновых кислот у них все же синтезируются за счет обратимости почти всех его реакций, а во-вторых, – в глиоксилатном цикле, являющемся видоизмененным циклом Кребса, который, в частности, найден у эшерихий и псевдомонад.

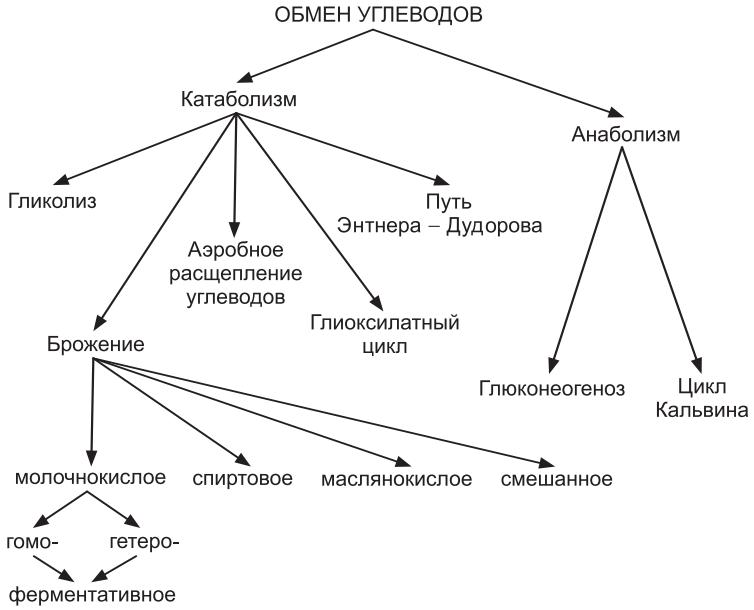
Анаболизм углеводов. Хемосинтезирующие бактерии в биосинтезе углеводов и других углеродсодержащих веществ используют углерод простых органических молекул, чаще всего катаболических продуктов расщепления углеводов. Так, например, из двух молекул пирувата бактерии-хемотрофы могут синтезировать молекулу глюкозы, вызывая как бы обратный гликолизу биохимический процесс, который называют *глюконеогенезом*.

Синтез полимеров глюкозы, в частности гликогена, включает два этапа: активацию глюкозы и ее перенос к молекуле-затравке, представляющей собой несколько сотен связанных глюкозных остатков.

Биосинтез более сложных углеводов, таких как пептидогликан, входящих в клеточную стенку бактерий, осуществляется из двух строительных блоков: УДФ-N-ацетилмурамилпентапептида и УДФ-N-ацетилглюкозамина. N-ацетилмурамилпентапептид сначала переносится на липидный переносчик – ундекапренилфосфат (бактопренол), а затем он связывается с N-ацетилглюкозамином. Впоследствии этот дисахаридпентапептид транспортируется липидным переносчиком на внеклеточную зону плаз-

матической мембраны и используется как строительный блок при удлинении цепи пептидогликана. По всей вероятности, пептидогликан *E. coli* состоит из мономолекулярного слоя, в котором полисахаридный каркас обращен наружу, а пептидные остатки – к плазматической мембране. Образование поперечных связей (сшивок) между соседними цепями происходит путем замыкания мостиков между некоторыми пептидными звеньями. Процесс катализируется транспептидазой.

Фотосинтезирующие бактерии фиксируют CO_2 и строят из него все необходимые для их жизнедеятельности углеводы и другие органические молекулы. Так как диоксид углерода служит им единственным источником углерода, то их часто называют С-аутотрофами. Захват CO_2 осуществляется в результате циклического метаболического пути Кальвина. Он катализируется самым распространенным в биосфере ферментом, ответственным за образование биомассы Земли – рибулозодифосфаткарбоксилазой.



Граф 20

Обмен липидов

Липиды, как и углеводы, – богатые энергией соединения, но большого значения в питании микроорганизмов не имеют. У бактерий они составляют основу клеточных и внутриклеточных мембран, а вместе с белками и углеводами наделяют некоторые из них, например микобактерии и актиномицеты, устойчивостью к высоким концентрациям спирта, кислот, щелочей и повышенной температуре. Липиды прокариот отличаются большим разнообразием. В составе бактерий, в частности, помимо простых и сложных липидов, содержащих насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с длинной и короткой цепями, наличием четного и нечетного числа атомов углерода, имеются липиды, в состав которых входят специфические фтионовая и туберкулостеариновая жирные кислоты, а также воск D. Главной особенностью метаболизма жирных кислот является то, что их биосинтез у бактерий осуществляется не синтазой, как в эукариотических клетках, а ацилпереносящим белком (АПБ), или, точнее говоря, 3-кетоацил-АПБ-синтетазой, активной в отношении тех из них, длина цепи которых не превышает C_{14} (см. «Анаболизм липидов»).

Катаболизм липидов. Простые жиры, или триацилглицеролы, в процессе катаболизма вначале в трехэтапной реакции расщепляются под действием липаз на трехатомный спирт глицерол и жирные кислоты.

Более многочисленны продукты гидролиза сложных липидов. Фосфолипиды, например, расщепляются фосфолипазами до глицерола, жирной и фосфорной кислот.

Продолжающийся путь ферментативного гидролиза липидов связан с гликолизом (глицерол), а жирных кислот – с циклом Кребса. При этом насыщенные жирные кислоты с четным числом углеродных атомов подвергаются катаболизму путем β-окисления в четырех реакциях.

Ацетил-КоА, образовавшийся при окислении жирных кислот, ничем не отличается от того ацетил-КоА, который формируется из пирувата при гликолизе. Его ацетильная группа в конечном итоге окисляется до CO_2 и H_2O через цикл лимонной кислоты.

Окисление ненасыщенных жирных кислот происходит так же, как и насыщенных, но с участием двух дополнительных ферментов – изомеразы и эпимеразы.

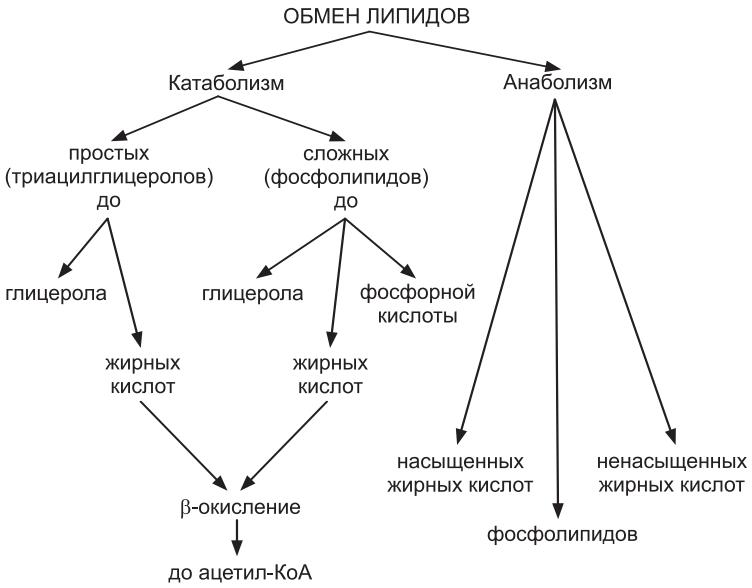
Жирные кислоты с длинной углеводородной цепью, содержащей нечетное число атомов углерода, метаболизируются в той же последовательности реакций, что и кислоты с четным числом атомов, путем отщепления двухуглеродных фрагментов с карбоксильного конца. Однако, когда остается произвести последний цикл β-окисления, остаток жирной кислоты содержит не четыре, а пять углеродных атомов. Его окисление и конечное расщепление приводит к образованию ацетил-КоА и пропионил-КоА. Ацетил-КоА окисляется обычно через цикл лимонной кислоты. Пропионил-КоА карбоксилируется с превращением в метилмалонил-КоА, который через ряд последовательных реакций трансформируется в 4-углеродную дикарбоновую кислоту оксалоацетат.

Жирные кислоты со средней длиной цепи (в меньшей степени длинноцепочечные) могут первоначально подвергаться ω-окислению (ω – омега) у двойной связи до жирных ω-оксикислот, которые затем превращаются в α-, ω-дикарбоновые кислоты. Именно таким образом при расщеплении олеиновой кислоты у двойной связи в положении 9,10 образуется азелаиновая кислота (9 атомов углерода), которая затем подвергается β-окислению, давая пимелиновую кислоту, являющуюся предшественником биотина – фактора роста и дыхания *E. coli* и других микроорганизмов.

Анаболизм липидов. Источниками углерода для синтеза бактериальных липидов являются углеводы (изредка – метионин). В образовании жирных кислот основным исходным веществом служит ацетил-КоА, а главным катализатором их синтеза – 3-кетоацил-АПБ-синтаза, входящая в мультиферментный комплекс синтазы жирных кислот. Ацилпереносящий белок (АПБ) является небольшим термостабильным протеином с молекулярной массой 9000. В его составе имеются две SH-группы, участвующие в катализе жирных кислот, одна из которых принадлежит активному остатку цистеина, а другая, вместе с пантотеновой кислотой, – 4′-фосфопантетеину, ковалентно связанному через фосфатную группу с остатком серина. Предполагают, что 4′-фосфопантетеиновая простетическая группа АПБ вместе с остатком серина, к которому она присоединена, служит «подвижной ручкой», переносящей в правильной последовательности ковалентно связанные остатки жирных кислот от одного активного центра фермента к другому.

Для биосинтеза триацилглицеролов и фосфолипидов, главными из которых являются фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин, необходима фосфатидная кислота (диацилглицерол-3-фосфат). Основными субстратами для ее образования служат 3-дифосфоглицерол и ацил-АПБ.

После гидролитического отщепления фосфата от фосфатидной кислоты может произойти образование нейтральных жиров в результате реакции с третьей молекулой ацил-АПБ. Однако большая часть фосфатидной кислоты используется для синтеза фосфолипидов. Для этого фосфатная группа фосфатидной кислоты взаимодействует с цитидинтрифосфатом и приобретает способность этерифицироваться со спиртом.



Граф 21

Обмен нуклеотидов

Различают пуриновые и пиримидиновые мононуклеотиды, отличающиеся по структуре азотистых оснований. К пуриновым относятся два мононуклеотида – аденозин-5′- и гуанозин-5′-монофосфат, а к пиримидиновым три –

цитидин-5′-, тимидин-5′- и уридин-5′-монофосфат. Все они содержат 5-углеродный углеводный компонент пентозу, точнее, дезоксирибозу, находясь в составе ДНК, или рибозу – при наличии их в РНК (см. «Генетика микроорганизмов»). В свободном состоянии мононуклеотиды участвуют в запасании и превращении энергии.

Катаболизм нуклеотидов. Катаболическое превращение мононуклеотидов на первом этапе катализируется нуклеотидазами, которые отщепляют от них остаток фосфорной кислоты, а на втором – нуклеозидазами, расщепляющими нуклеозиды на азотистые основания и углеводные компоненты.

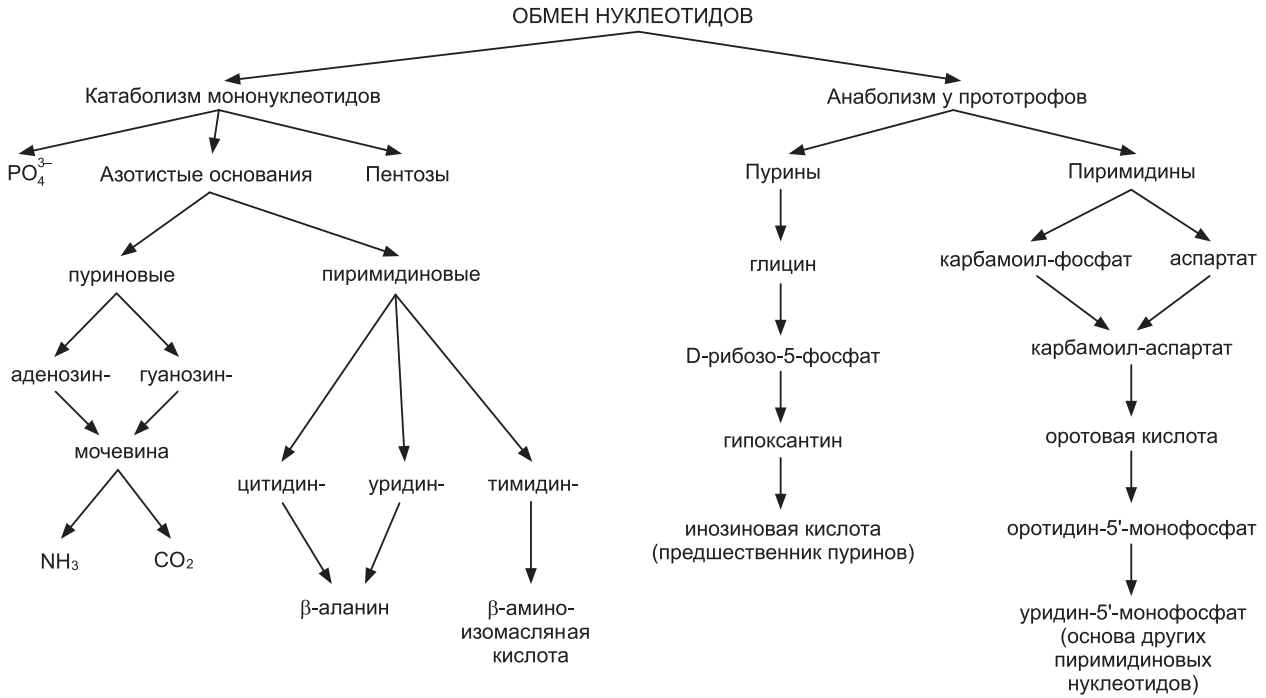
Распад пуринового азотистого основания (ядра) связан с действием аллантоиназы и аллантокиназы. Образовавшаяся при этом мочевина под влиянием уреазы гидролизуется до NH_3 и CO_2 .

Расщепление пиримидиновых ядер тоже связано с целым рядом ферментативных превращений. Конечным продуктом распада тимидина является β-аминоизомасляная кислота, а тимидина и урацила – β-аланин.

Анаболизм нуклеотидов. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды синтезируются бактериями-прототрофами из простых предшественников. Для нормального роста и развития бактерий-ауксотрофов, утративших эту способность, требуется наличие в питательной среде готовых молекул азотистых оснований.

Синтез пуриновых нуклеотидов в бактериях-прототрофах начинается с простейшей по структуре моноаминокарбоновой заменимой аминокислоты глицина, от которой в их азотистые основания поступает два атома углерода и один атом азота. Донором остальных атомов углерода служит муравьиная кислота и диоксид углерода, а атомов азота – глутамин (два) и аспарагин (один). В дальнейшем к строящемуся пуриновому основанию, содержащему остаток глицина, присоединяется D-рибозо-5-фосфат, вслед за которым надстраивается каркас молекулы гипоксантина, и, наконец, синтезируется инозиновая кислота – нуклеотид-предшественник всех пуринов.

Синтез пиримидиновых нуклеотидов, наоборот, начинается с формирования азотистых оснований. Источником их образования является карбамоилфосфат, который синтезируется из NH_3 и CO_2. Вступая в реакцию с аспарта-


ОБМЕН НУКЛЕОТИДОВ
Катаболизм мононуклеотидов
Анаболизм у прототрофов
PO_4^{3-}
Азотистые основания
Пентозы
пуриновые
пиримидиновые
аденозин-
гуанозин-
мочевина
NH_3
CO_2
цитидин-
уридин-
тимидин-
β-аланин
β-амино-изомасляная кислота
Пурины
Пиримидины
глицин
D-рибозо-5-фосфат
гипоксантин
инозиновая кислота (предшественник пуринов)
карбамоил-фосфат
аспартат
карбамоил-аспартат
оротовая кислота
оротидин-5'-монофосфат
уридин-5'-монофосфат (основа других пиримидиновых нуклеотидов)

Граф 22

том, под действием аспартат-карбамоилтрансферазы он превращается в карбамоиласпартат. На последнем этапе формирования пиримидиновых колец карбамоиласпартат подвергается окислению в оротовую кислоту. В ходе пирофосфорилазной реакции от фосфорибозилпирофосфата к оротовой кислоте присоединяется рибозо-5′-фосфат. В результате этого образуется нуклеотид оротидин-5′-монофосфат, продуктом декарбоксилирования которого является уридин-5′-монофосфат – основа других пиримидиновых нуклеотидов.

Пуриновые и пиримидиновые дезоксирибонуклеотиды образуются в результате восстановления остатков рибозы АДФ, ГДФ, ЦДФ, УДФ. Катализирует этот процесс рибонуклеозид-дифосфатредуктаза. Тимидиновые дезоксирибонуклеотиды образуются при гидролизе УТФ, катализируемом дезоксиуридинтрифосфатдифосфогидролазой.

Энергетический обмен у микроорганизмов

Нормальная жизнедеятельность микроорганизмов, их рост и размножение обеспечиваются непрерывным потоком энергии. Первичным ее источником является электромагнитное излучение Солнца. При этом фотосинтетические бактерии улавливают кванты солнечного света с помощью бактериохлорофиллов и бактериородопсина, а хемосинтетические, лишенные их, извлекают энергию Солнца, запасенную в ковалентных связях химических веществ. Последние, в отличие от растений и животных, получают энергию из неисчислимо большого количества субстратов. Фактически любое соединение, будь то природное или синтетическое, содержащее углерод, водород, кислород, азот, серу и фосфор, используются бактериями, что постулируется в так называемой «доктрине катаболической безотказности микробов».

Основными генераторами энергии у фотосинтезирующих микроорганизмов являются циклическая и нециклическая редокс-цепи и бактериородопсин, а у хемосинтезирующих – полные и укороченные дыхательные цепи.

Свободная энергия, которая расходуется микроорганизмами на механическую, осмотическую, химическую работу и производство тепла, образуется в особых мембра-

нах при участии ферментов, тесно связанных с мембранными структурами и способных преобразовывать световую или химическую энергию неорганических и органических веществ в электрохимическую энергию трансмембранного потенциала ионов водорода ($\Delta\mu H^+$) или ионов натрия ($\Delta\mu Na^+$), либо в универсальную для всех микроорганизмов химическую энергию фосфатных связей аденозин-5-трифосфата. В частности, энергия гидролиза терминального фосфата АТФ в процессе превращения его в аденозин-5-дифосфат и неорганический фосфор ($Ф_н$), за счет которой активируются все промежуточные продукты клеточного метаболизма, участвующие в реакциях конденсации, восстановления (объединения субстратов) и расщепления, составляет, например, около 42 кДж · моль$^{-1}$.

АТФ образуется из АДФ и неорганического фосфата системами фотосинтетического, дыхательного и субстратного фосфорилирования, причем первые две системы требуют наличия так называемых сопрягающих мембран, отличающихся от других очень низкой проницаемостью для самых маленьких ионов – протонов, вследствие чего если они выбрасываются на одну из ее сторон, то на ней образуется положительный заряд (H^+), а на противоположной – отрицательный, обусловленный ионами гидроксида водорода (OH^-). Иначе говоря, по обеим сторонам сопрягающих мембран создается энергия разности концентрации ионов, находящихся в разных отсеках (компартментах). К таким мембранам у бактерий относится цитоплазматическая мембрана и мембрана хроматофоров.

Механизм генерации энергии у фотосинтезирующих микроорганизмов

Фотосинтез – процесс образования углеводов из диоксида углерода; у большинства видов микробов он отличается тем, что, синтезируя углеводы, в качестве восстановителя они используют не воду, а аммиак, водород, ионы железа, серы и, реже, другие вещества. Естественно, что в этих случаях не образуется молекулярный кислород. Исключение составляют цианобактерии, синтезирующие углеводы из диоксида углерода и воды с образованием кислорода, который используется в качестве окислителя аэробами при генерации энергии, т. е. фотосинтез в их хро-

матофорах протекает точно так же, как в хлоропластах высших растений и водорослях:

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{свет}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2.$$

Генерация энергии в циклической редокс-цепи фотосинтетиков. Циклическая фотосинтетическая редокс-цепь представляет собой замкнутую систему последовательно расположенных в ней переносчиков электронов (рис. 20). Функционирует она у *Rhodospirillum rubrum, Rhodopseudomonas spheroides, R. viridis, Chromatum vinosum* и у некоторых других видов пурпурных бактерий, содержащих бактериохлорофиллы (БХл) *a* или *b*, представляющие собой тетрапиррольные Mg-содержащие пигменты, локализованные в цитоплазматической и внутриклеточных мембранах или же в мелких, диаметром около 50 нм, окруженных мембраной пузырьках-хроматофорах, находящихся в цитозоле клетки.

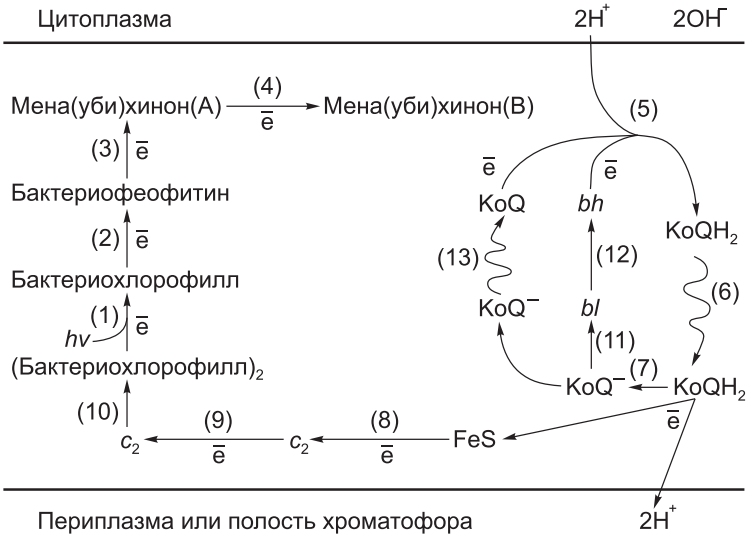


Рис. 20. Циклическая редокс-цепь пурпурных фотосинтезирующих бактерий

Генерация трансмембранного потенциала водородных ионов в циклической редокс-цепи возникает после того, как поглощенные и сконцентрированные бактериохлорофилльной магний-перфориновой светособирающей антенной кванты света ($h\upsilon$) выбивают из бактериохлорофилла электрон, который, мигрируя поперек цитоплазматической сопрягающей мембраны (1) к ее внутренней стороне, прилегающей к цитоплазме, достигает своего акцептора – убихинона, который на рис. 20 обозначен КоQ (2–5). Полное восстановление КоQ, однако, требует еще одного электрона и двух протонов ($2H^+$). Второй электрон он получает от цитохрома *bh*, а $2H^+$ – из окружающей водной фазы. Восстановленный $КоQH_2$ затем перемещается к противоположной стороне мембраны и, окисляясь в семихинонную форму $КоQ^-$ (7), выбрасывает два протона на поверхность сопрягающей мембраны и отдает один электрон (8) негемовому железосульфопротеину (FeS), который, мигрируя по цепи цитохромов (8,9,10), возвращается в бактериохлорофилл, заполняя в нем электронную «дырку», выбитую ранее $h\upsilon$. Последний электрон семихинонного $КоQ^-$ идет на восстановление гема *bh*, а сам по себе перемещается в прежнее местоположение сопрягающей мембраны (11–13).

Если в клетке возникают проблемы с генерацией $\Delta\mu H^+$, то АТФ-синтазы выполняют обратную работу – АТФ $\rightarrow$ $\rightarrow$ АДФ + $Ф_н$ $+\Delta\mu H^+$ (рис. 21).

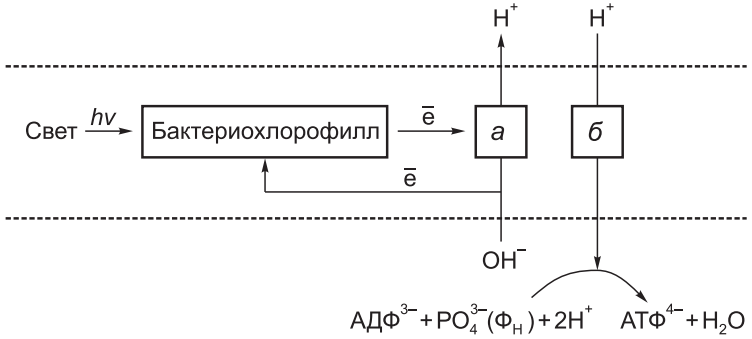


Рис. 21. Общая схема преобразования света в $\Delta\mu H^+$ и энергию АТФ в циклической редокс-цепи пурпурных бактерий:
а – переносчики электронов, *б* – H^+-АТФ-синтаза

Источниками АТФ в такой ситуации являются три реакции субстратного фосфорилирования. Две из них происходят в гликолизе (3-фосфоглицероилфосфат + АДФ → → 3-фосфоглицерат + АТФ; фосфоенолпируват + АДФ → → еноилпируват + АТФ), а третья – в цикле Кребса при превращении сукцинил-КоА в сукцинат [сукцинил-КоА + + АДФ (ГДФ) → сукцинат + АТФ (ГТФ)].

Такой простой способ получения энергии распространен среди строго анаэробных микроорганизмов, таких, как клостридии и молочнокислые бактерии, и происходит при участии растворимых ферментов, т. е. не связанных с мембранными структурами бактерий (рис. 22).

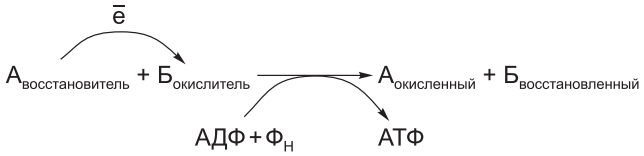


Рис. 22. Общая схема окислительно-восстановительной реакции между органическими веществами, сопряженной с фосфорилированием АДФ неорганическим фосфатом

Несмотря на то что реакции субстратного фосфорилирования дают небольшую часть пула от общей энергии, получаемой при фотосинтезе и дыхании, вся она со стопроцентным выходом используется в жизнедеятельности бактерий, тогда как остальная – частично теряется в виде тепла из-за возможного разобщения дыхания и фосфорилирования.

Генерация энергии в *нециклической редокс-цепи бактерий фотосинтетиков.* Нециклическую редокс-цепь для получения энергии используют зеленые фотосинтезирующие бактерии-анаэробы, содержащие бактериохлорофилл *a* вместе с бактериохлорофиллом *c*, *d* или *e*, каждый из которых отличается от *a* характерным спектром поглощения с максимумом в длинноволновой области (790–1040 нм) и замещающими группами. Редокс-цепь у них устроена таким образом, что свет одновременно вызывает генерацию $\Delta\mu H^+$ и восстановление сероводородом никотинамидадениндинуклеотида ($НАД^+$), энергия которого необходима для протекания реакций восстановительного синтеза (рис. 23).

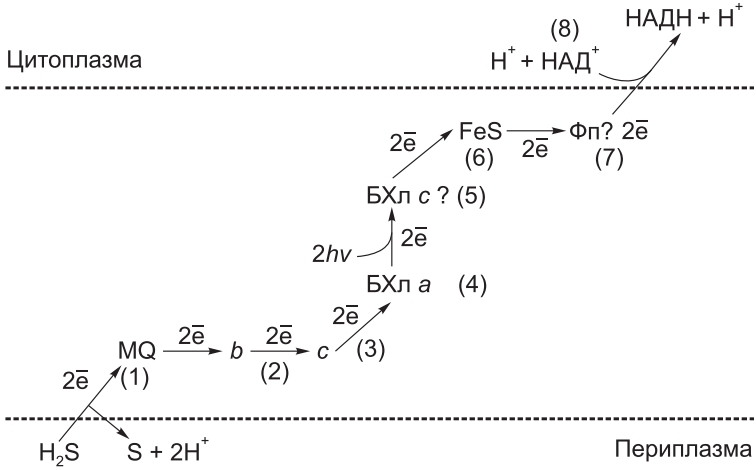


Рис. 23. Нециклическая редокс-цепь зеленых фотосинтезирующих бактерий-анаэробов:
MQ – менахинон; БХл – бактериохлорофилл; FeS – железосодержащие белки; Фп? – флавопротеин

Ряд стадий переноса электронов в этой цепи пока остается неясным. Твердо установлено, что кванты света ($2 \rightarrow h\nu$) вызывают фотоокисление бактериохлорофилла (БХл) типа *a*.

Фотоокисленный БХл *a* (4) затем восстанавливается донорным сегментом редокс-цепи (1–3), берущей начало от H_2S. Этот участок, располагающийся, как предполагают, вблизи внешней поверхности цитоплазматической мембраны, содержит менахинон (MQ), цитохром типа *b* и два цитохрома *c*. На противоположной (внутренней) стороне мембраны должно происходить поглощение ионов H^+(8), так как $НАД^+$ восстанавливается бактериохлорофилльной системой, транспортирующей не протоны, а электроны (5,6,7). Чтобы восстановить $НАД^+$, необходимо присоединить один протон и два электрона. В результате взаимодействия сероводорода с катион-радикалом $БХл^+$ *a* образуется элементарная сера и восстановленный БХл *a*.

Таким образом, приведенная схема переноса электронов у зеленых бактерий показывает, что генерация $\Delta\mu H^+$ и восстановление $НАД^+$ осуществляются одной и той же светозависимой редокс-цепью.

Подобной, но более энергетически выгодной нециклической фотозависимой редокс-цепью располагают цианобактерии, содержащие две фотосистемы, одна из которых специализирована на генерации трансмембранного потенциала ионов водорода и синтезе за счет его энергии АТФ, а другая – на восстановлении НАДФ$^+$ (рис. 24). Другим отличием ее функционирования является то, что донором электронов служит не H_2S, как у зеленых бактерий, а вода. При этом электрон H_2O передается в редокс-цепь хроматофором, возбужденным энергией света. Его транспорт по первой фотосистеме цианобактерий ввиду большой разности редокс-потенциалов между НАД(Ф$^+$) и водой (1,2 В против 0,3 В между НАД и H_2S) сопряжен с поглощением двух, а не одного фотона, как у зеленых бактерий.

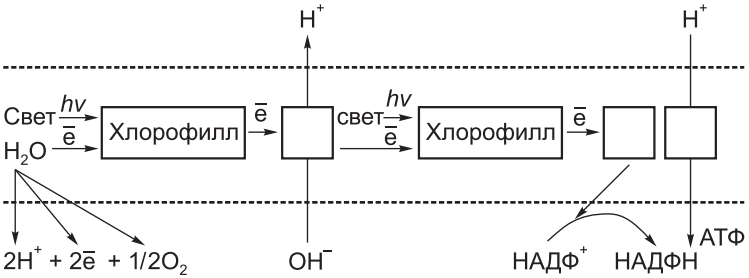


Рис. 24. Схематическое изображение нециклической редокс-цепи цианобактерий

Особым механизмом генерации $\Delta\mu H^+$ отличаются *галобактерии*. Имеющийся в их сопрягающих мембранах белок *бактериородопсин*, улавливая солнечный свет, работает как протонная помпа первого типа у бактерий-хемосинтетиков, откачивая ионы водорода и создавая тем самым трансмембранный электрохимический потенциал, образующий из АДФ и неорганического фосфата АТФ с участием H^+-АТФ-синтазы (рис. 25).

Интересно, что природа, наделив галобактерии протонными помпами, не обделила их хемосинтетическими свойствами, правда, проявляющимися при нехватке кислорода.

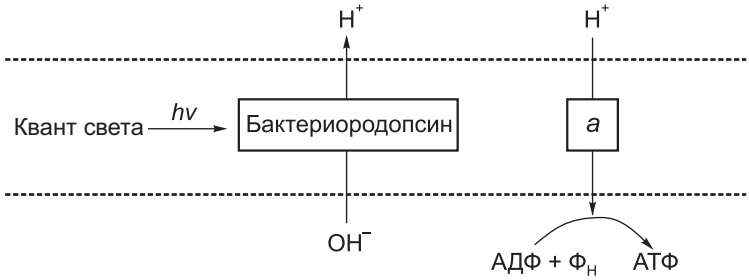


Рис. 25. Схематическое изображение получения энергии у галобактерий: *a* – H^+-АТФ-синтаза

Механизм генерации энергии у хемосинтетических микроорганизмов

В дыхательных цепях бактерий-хемотрофов используется энергия окисляющихся субстратов, а не квантов света, но генерируется, высвобождается, расходуется и запасается она так же, как у фотосинтезирующих бактерий.

Полная дыхательная цепь состоит из 4 комплексов:

I – НАДН-КоQ-редуктаза; II – сукцинат- КоQ-редуктаза или сукцинатдегидрогеназа; III – $КоQH_2$-цитохром *c*-редуктаза (комплекс *bc*-цитохромов); IV – цитохромоксидаза.

В своей совокупности они представляют электронотранспортную систему, последовательно передающую электроны от окисляющихся субстратов к кислороду-акцептору ($^1/_2\ O_2$), в результате чего в конце дыхательной цепи образуется H_2O (рис. 26).

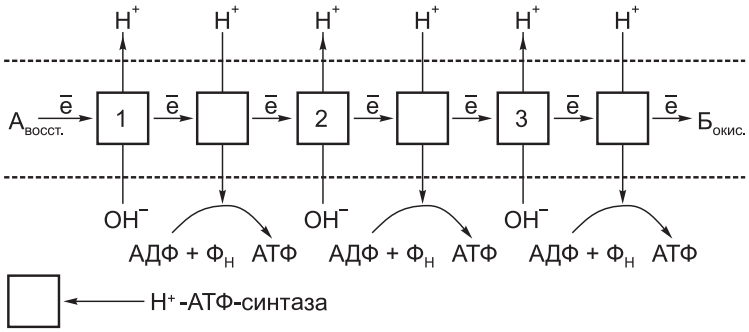


Рис. 26. Генерация трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода в дыхательной цепи бактерий-хемосинтетиков

Три из ее комплексов (I, III и IV) к тому же трансформируют передающуюся энергию и сами по себе способны генерировать $\Delta\mu H^+$, перемещая ионы H^+ сквозь сопрягающую цитоплазматическую мембрану. Второй участок дыхательной цепи, где функционирует сукцинат-КоQ-редуктаза, к преобразованию энергии и перемещению протона на другую сторону мембраны не причастен по причине низкого перепада редокс-потенциала. Кстати, в зависимости от редокс-потенциала окисляемого субстрата его восстановительные эквиваленты ($\bar{e}$ и H^+) поступают в дыхательную цепь бактерий-хемотрофов на разных ее уровнях. Так, если он равен −0,32 В, что присуще и паре НАДН/НАД$^+$, то $\bar{e}$ и H^+ поступают на первый ферментный комплекс и в окислении субстрата, естественно, участвует вся дыхательная цепь бактерий. К таким субстратам относятся в основном изоцитрат, малат, 3-оксиацил-КоА, 3-фосфоглицериновый альдегид, лактат, β-оксибутират.

Если же редокс-потенциал субстрата имеет меньшее отрицательное значение, чем −0,32 В, то восстановительные эквиваленты, минуя первый участок, переносятся сразу в третий или четвертый конечный участок дыхательной цепи. Так, например, окисляющиеся ацил-КоА и сукцинат «питают» дыхательную цепь на уровне III комплекса, а аскорбат, окисляемый цитохромоксидазой, – на IV.

Характерная особенность функционирования полной дыхательной цепи состоит в том, что окисление донора электронов и восстановление акцептора электронов, которыми могут быть органическое или неорганическое вещество, цепью последовательно расположенных переносчиков $\bar{e}$ сопровождается одновременным выбросом на одну из сторон сопрягающей мембраны H^+, что осуществляется первым типом протонных помп (переносчиков). В обратном направлении выброшенные на одну сторону мембраны протоны переносятся, как и у галобактерий, вторым типом протонных помп, разряжающих трансмембранный потенциал с образованием АТФ.

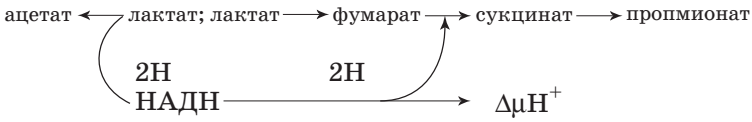
Для ряда видов микроорганизмов свойственна *укороченная дыхательная цепь*, что может быть связано с наличием

в среде (нише) вместо кислорода другого окислителя с положительным редокс-потенциалом, как у бактерий, восстанавливающих нитрат до нитрита. При этом редокс-потенциал пары NO_2^-/NO_3^- равен +0,42 В против +0,82 В у пары $^1/_2O_2/H_2O$. Если восстановителем служит НАД(Ф)Н, потенциал которого –0,32 В, то такая цепь восстановления нитрата сопровождается образованием $\Delta\mu H^+$.

Другая укороченная дыхательная цепь функционирует у *Veilonella succinogenes*:

H_2 → гидрогеназа → MQ(менахинон) → фумаратредуктаза → фумарат, восстановителями которого могут быть НАДН, формиат и глицерофосфат.

Более сложную, но тоже укороченную цепь содержат бактерии, образующие из двух молекул лактата ацетат и пропионат, перенос электронов в которой с НАДН на фумарат в одной из фаз окислительно-восстановительного процесса сопряжен с генерацией трансмембранного потенциала ионов водорода:



Интересно, что в укороченных дыхательных цепях некоторых бактерий-аэробов, в частности *Thiobacillus ferrooxidans,* содержащей огромное количество цитохромов *c* и цитохромоксидазы, происходит необычное окисление субстратов с таким же высоким значением редокс-потенциала, как у кислорода, что теоретически кажется невозможным, ибо в этих случаях не должен генерироваться $\Delta\mu H^+$. Так, у тиобактерий, использующих в качестве единственного энергетического ресурса ион закисного железа (Fe^{2+}), он окисляется кислородом воздуха до оксидного (Fe^{3+}). Расчеты между тем показывают, что этого не должно происходить, так как разность потенциалов между окислителем ($^1/_2O_2/H_2O$ = +0,82 В) и восстановителем (Fe^{2+}/Fe^{3+} = +0,77 В) в 0,05 В недостаточна для транслокации протона через сопрягающую мембрану и создания $\Delta\mu H^+$.

Механизм окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} нашел объяснение после того, как было установлено, что при каждом снижении pH на единицу, редокс-потенциал пары $\frac{1}{2}O_2/H_2O$ увеличивается на 0,06 В. Поскольку тиобактерии – ацидофилы, нормально развивающиеся в среде при pH 1–3, то редокс-потенциал пары $\frac{1}{2}O_2/H_2O$ при этих значениях концентрации водородных ионов возрастает с +0,82 В при pH 7 до +1,06 В, что на 0,29 В положительнее, чем редокс-потенциал пары Fe^{2+}/Fe^{3+}, который остается одним и тем же при закислении, т. е. такая разность потенциалов превышает достаточную (–0,25 В) для транслокации протона и создания $\Delta\mu H^+$.

Натриевая энергетика микроорганизмов. Источником энергии для формирования трансмембранного электрохимического потенциала ионов натрия ($\Delta\mu Na^+$) могут служить редокс-цепи (рис. 27) или некоторые реакции декарбоксилирования с отщеплением CO_2.

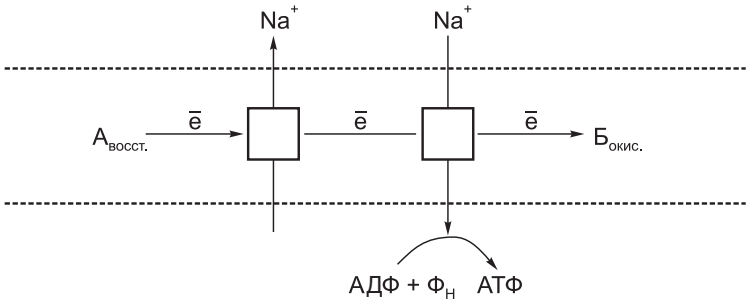
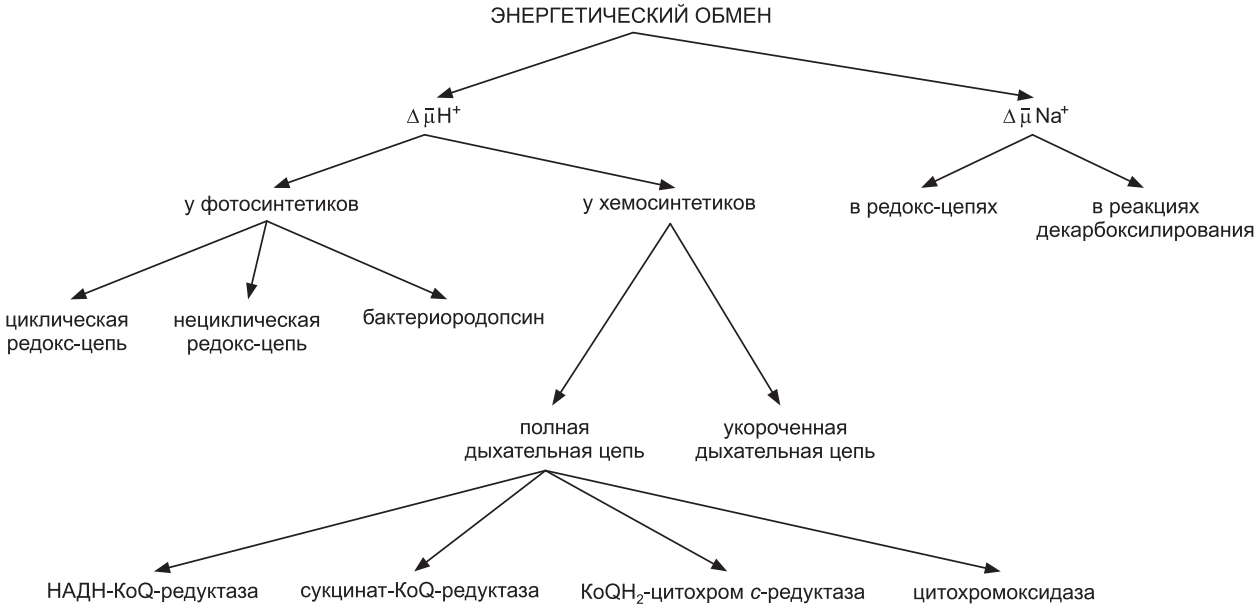


Рис. 27. Генерация трансмембранного электрохимического потенциала ионов натрия

Формирование $\Delta\mu Na^+$, обеспечивающего механическую, осмотическую и другие виды работы микробной клетки, было установлено в редокс-цепях бактерий-алкалофилов, способных размножаться при высоких значениях pH.

Декарбоксилирование, сопряженное с переносом Na^+ из клетки во внешнюю среду против концентрационного градиента, и создание $\Delta\mu Na^+$ отмечается у сальмонелл и клебсиелл. В частности, *Klebsiella aerogenes*, растущая в анаэробных условиях, декарбоксилирует оксалоацетат в пируват и CO_2 только в присутствии Na^+.


ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН
$\Delta\bar{\mu}H^+$
$\Delta\bar{\mu}Na^+$
у фотосинтетиков
у хемосинтетиков
в редокс-цепях
в реакциях декарбоксилирования
циклическая редокс-цепь
нециклическая редокс-цепь
бактериородопсин
полная дыхательная цепь
укороченная дыхательная цепь
НАДН-КоQ-редуктаза
сукцинат-КоQ-редуктаза
$КоQH_2$-цитохром *c*-редуктаза
цитохромоксидаза

Граф 23

Выбросом ионов натрия на цитоплазматическую мембрану сопровождается также декарбоксилирование глютаконил-КоА в кротонил-КоА у *Acidaminococcus fermentans, Peptococcus aerogenes, Clostridium symbiosum* и *Fusobacterium nucleatum*, лактата до ацетата – у строго анаэробной бактерии *Veilonella alcalensis* и метилмалонил-КоА в пропионил-КоА – у *Propionigenum modestum*.

Часть запасенной энергии в виде $\Delta\mu Na^+$, так же как при создании $\Delta\mu H^+$, трансформируется этими видами бактерий в макроэргические связи молекулы АТФ. Она улавливается при переходе сопрягающего иона Na^+ с положительно заряженной стороны мембраны на отрицательную с помощью АТФ-синтазы, передающей ее на молекулу АДФ.

Таким образом, наличие у бактерий многочисленных механизмов взаимопревращения различных форм энергии позволяет им быстро и гибко приспосабливать свою энергетику к меняющимся условиям окружающей среды.

Действие факторов окружающей среды на микроорганизмы

В природных условиях микроорганизмы испытывают воздействие многих факторов окружающей среды. При этом некоторые факторы оказывают благоприятное влияние на их жизнедеятельность, другие угнетают ее или вызывают гибель микроорганизмов. В биоценозах, например, этими факторами являются продукты метаболизма бактерий-ассоциантов, которые в смешанных популяциях можно выявить методами «скученных пластинок» и подсева эталонных тест-микробов к выросшим бактериальным полоскам. Используя их: 1) густую взвесь почвы высевают на поверхность мясопептонных агаров в чашках Петри и, поместив их в термостат, через 1–2 сут вокруг колоний антагонистов отмечают зоны отсутствия роста, а вокруг колоний синергистов – пышный ободочный налет; 2) то же регистрируют, подсевая суточные культуры тест-бактерий к свежевыросшим вдоль диаметра чашек Петри полоскам антагонистов, продуцирующих антибиотики (грибы, актиномицеты), или к полоскам синергистов, выделяющих факторы роста (микрококки, дрожжи, стафилококки). Сложные взаимоотношения в биоценозах устанавливаются между бактериями и фагами (см. «Фаги»).

Направленность и эффективность действия физических факторов на микробы определяется их природой, а антимикробная активность – величиной, дозой, длиной волны, условиями среды, временными и другими параметрами. Так, большинство бесспоровых бактерий при температуре 60 °С погибают в течение 60 мин, а при температуре кипения – моментально или же в первые минуты, что принято называть в отношении бактерий, вирусов, грибов и простейших терминами – бактери-, вирусо-, фунги- и протистоцидность. Столь же неблагоприятно влияют на микроорганизмы высушивание (обезвоживание) и особенно – солнечное излучение. Прямой солнечный свет, в частности, оказывает бактерицидное действие даже на фоторезистентные микобактерии туберкулеза, вызывая их гибель в течение нескольких часов. Более высокой бактерицидностью обладают ультрафиолетовые, рентгеновские и гамма-лучи (см. «Мутации и репарации»). Кроме этого, антимикробное действие оказывает ультразвук, а также отрицательно заряженные ионы.

Низкие температуры тормозят рост бактерий, но гибели их не вызывают. Многие виды микробов, например энтеробактерии, перезимовывают в почве и воде, а вирусы сохраняют жизнеспособность многие годы даже при температуре –70 °С.

На этой основе разработаны методы консервации скоропортящихся продуктов путем их обезвоживания при низкой температуре и высоком вакууме (сублимация). Не оказывает какого-либо действия на микробы рассеянный свет. Хорошо переносится ими высокое атмосферное давление (сотни и даже тысячи атмосфер), но в сочетании с повышенной температурой вызывает быструю гибель, подобно тому как само по себе встряхивание жидкости бактерицидного эффекта не вызывает, но многократно усиливает действие ионов хлора при хлорировании воды.

Антимикробное действие химических факторов зависит, прежде всего, от дозировки, а точнее – их концентрации, растворимости, наличия в среде реагирования солей, других инертных веществ и окружающей температуры. При этом высокие дозы химических веществ, как правило, оказывают микробоцидный эффект, средние или малые – вызывают диссоциацию или мутации бактерий, а микродозы могут стимулировать их рост.

Приведенные данные об антимикробном действии физических и химических факторов легли в основу применяемых в настоящее время методов стерилизации и асептики, дезинфекции и антисептики.

Стерилизация и асептика

Стерилизация (обеспложивание) – полное уничтожение патогенных и сапрофитных форм микроорганизмов в материалах.

В микробиологической практике стерилизуют посуду, питательные среды, лекарственные препараты, шприцы, а в медицинской – санитарно-техническое имущество, медицинскую одежду, аппараты и инструментарий, т. е. с помощью стерилизации осуществляется также *асептика*.

Под асептикой понимают систему профилактических мероприятий, исключающую возможность инфицирования органов и тканей при лечебно-профилактических манипуляциях, например при операциях, перевязках, эндоскопии. Законы асептики сформулированы в 1890 г. немецким хирургом Э. Бергманом. При выполнении медицинских манипуляций они требуют от лечебного персонала строгого соблюдения санитарно-гигиенических норм и правил поведения.

Способы стерилизации

Для стерилизации применяются в основном физические методы, реже – химические, в частности для обеспложивания медицинской аппаратуры многоразового использования.

К физическим методам стерилизации относят: стерилизацию в пламени, горячим воздухом, паром под давлением, текучим паром, температурным свертыванием белковых сред; тиндализацию, пастеризацию, холодные методы стерилизации, фильтрование через бактериальные фильтры, а к химическим – использование газовых смесей и растворов химических веществ.

Выбор того или иного метода стерилизации определяется особенностью стерилизуемого объекта или материала.

Стерилизация в пламени (обжигание, или фламбирование) производится для обеззараживания бактериальных петель, игл, пинцетов, предметных и покровных стекол.

Стерилизация горячим воздухом проводится в электрических сухожаровых шкафах (печах Пастера), имеющих различную форму и размеры, снабженных хорошей теплоизоляцией (рис. 28). Необходимая температура автоматически поддерживается терморегулятором. В них стерилизуют лабораторную посуду и стеклянные шприцы при 180 °С в течение 1 ч. Чашки Петри, пастеровские и градуированные пипетки помещают в специальные металлические пеналы или заворачивают в бумагу по несколько штук. Пробирки и колбы закрывают ватными пробками.

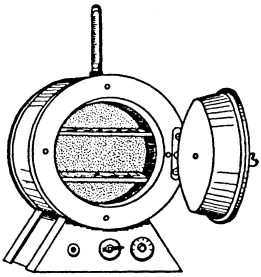


Рис. 28. Сухожаровой шкаф

Стерилизация паром проводится двумя способами: насыщенным паром под давлением и текучим паром.

Стерилизацию паром под давлением производят в автоклаве, который представляет собой толстостенный котел цилиндрической формы, покрытый снаружи кожухом и герметически закрывающийся крышкой. Автоклавы бывают горизонтальными (рис. 29) и вертикальными. Пар поступает в рабочую камеру через патрубок из маленького котла, воду в который наливают через воронку, соединенную с указательной трубкой, нагревают электротоком. Давление измеряют манометром.

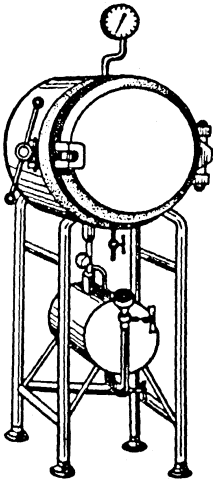


Рис. 29. Автоклав горизонтальный

Неизменяющиеся под действием высокой температуры и давления питательные среды, растворы или посуду с заразным материалом стерилизуют в автоклаве 15–20 мин при 1 атм (121 °С), среды с углеводами и нативными белками – 5–10 мин при 0,5 атм (110 °С). Материал и посуду, содержащие бациллы сибирской язвы, обеззараживают при 2 атм в течение 2 ч.

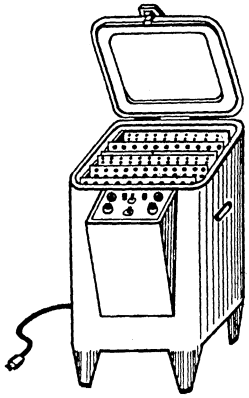


Рис. 30. Свертыватель питательных сред

Контроль за соблюдением режимных параметров работы автоклава производится с помощью максимального термометра, в отдельных случаях в автоклав помещают бензойную кислоту или бензонафтол с точками плавления 120 и 110 °С соответственно.

Стерилизация текучим паром проводится при открытом выпускном кране автоклава дробно в течение трех дней по 30–60 мин, так как однократный прогрев сред при 100 °С вызывает гибель только вегетативных форм микроорганизмов, а споры остаются жизнеспособными. Спустя сутки при комнатной температуре некоторая часть их прорастает и приходится прибегать к повторному воздействию на них горячим паром. Обычно текучим паром стерилизуют молоко, желатин, картофель и среды с углеводами, быстро портящиеся при температуре выше 100 °С.

Стерилизация температурным свертыванием сыворотки и яичных сред производится в двустенном свертывателе с электрическим нагревом (рис. 30). Аппарат покрыт теплоизоляционным материалом, имеет стеклянную и металлическую крышки. Воду в свертыватель наливают через имеющееся в его верхней части отверстие, закрывающееся пробкой с вмонтированным термометром. Пробирки со средами укладывают на дно свертывателя в наклонном положении. Подогревают среды однократно или дробно при температуре 80–90 °С 1 ч.

Тиндализация – дробная стерилизация веществ, разрушающихся в текучем паре и в свертывателе. Нагревание производят при температуре 56–58 °С в течение 1 ч 5–6 сут подряд в водяной бане или специальных нагревателях с терморегуляторами.

Пастеризация – частичная (неполная) однократная стерилизация при 55–65 °С в течение 1 ч или при 70–80 °С – 5–10 мин. Предложена Л. Пастером для уничтожения в молоке, пиве, вине, плодовых соках неспороносных видов бактерий, вызывающих брожение. Пастеризованные продукты необходимо хранить на холоде.

Холодные методы стерилизации. Факторами холодной стерилизации служат гамма-излучение (источники ^{60}Co и ^{137}Cs), ультразвук, ультрафиолетовые лучи с длиной волны 260–300 мкм и высоковольтные импульсные электрические разряды. Их используют для обеспложивания воды, пищевых продуктов, питательных сред, вакцин, сывороток и других биопрепаратов, а УФЛ – для стерилизации воздуха боксов, операционных, больничных палат и других помещений.

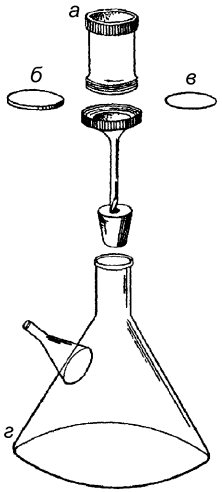


Рис. 31. Аппарат Зейтца: *а* – воронка; *б* – асбестовый фильтр; *в* – нитроцеллюлозный фильтр; *г* – бунзеновская колба

Фильтрование как механический способ стерилизации используется для обеспложивания быстро портящихся при высокой температуре жидких веществ, например сывороток, анатоксинов, других вакцин, антибиотиков. Для этого используют мембранные фильтры № 2, 3 из нитроцеллюлозы с диаметром пор не более 0,3 мкм и глубинные фильтры различной конструкции. Фильтруя вещества через мембранные фильтры, их помещают в аппарат Зейтца (рис. 31). Он состоит из цилиндра-резервуара со скрепляющими по бортику болтами, опорной части с полым наконечником и металлической сеточкой у ее основания, предназначенной для фильтров. Используя аппарат Зейтца, его предварительно стерилизуют в автоклаве или смачивают этиловым спиртом с последующим фламбированием в пламени горелки. Собирая составные части аппарата, на сеточку опорной части накладывают прокипяченный фильтр, плотно прижимают болтами к цилиндру и вкручивают его в резиновую пробку горлышка стерильной бунзеновской колбы. Фильтрацию через мембранные фильтры производят с помощью водоструйного насоса или вакуум-насоса Комовского, присоединяемых к отростку колбы. Глубинные фильтры задерживают мик-

роорганизмы не только на поверхности, но и во внутренней структуре. Они могут быть фарфоровыми (свечи Шамберлана), керамическими (свечи Беркефельда) и стеклянными; фильтрование через них проводят под вакуумом или под давлением.

Стерилизацию химическими веществами осуществляют двумя методами. При *газовом методе стерилизации* чаще всего используют невоспламеняющиеся смеси этилена с диоксидом углерода и хладонами (хлорфторуглеродами), а при *стерилизации растворами* – пероксид водорода (6 %), его производные – надуксусную и надмуравьиновую перкислоты (1 %) или глутаровый альдегид (2,5 %).

Дезинфекция и антисептика

Дезинфекция (обеззараживание) – совокупность способов полного, частичного или селективного (выборочного) уничтожения патогенных микроорганизмов на объектах окружающей среды, точнее, факторах их передачи с целью профилактики инфекционных заболеваний. Из этого определения вытекает, что дезинфекция имеет большое сходство со стерилизацией, т. е. та и другая предназначены для микробной деконтаминации (*de* и *contaminatio* – букв. «очистка») объектов внешней среды. Главнейшими признаками, которые отличают их друг от друга, являются полнота деконтаминации и методы.

Выделяют два вида дезинфекции – профилактическую, которая проводится с определенной периодичностью, и очаговую, подразделяющуюся, в свою очередь, на текущую и заключительную. Текущая дезинфекция проводится систематически (многократно) в действующих эпидемических очагах и инфекционных стационарах в процессе лечения больных, а заключительная – после ликвидации эпидемического очага и выписки выздоровевшего больного из инфекционного отделения.

Методы дезинфекции. Дезинфицирующими факторами могут являться простая очистка, стирка, мытье, проветривание, снижающие массивность микробной контаминации (инфицированности), сжигание, кипячение, воздействие горячего воздуха в сухожаровых камерах, проточного или насыщеного пара в дезинфекцион-

ных камерах или ультрафиолетовых лучей, но в большинстве случаев используются химические вещества (дезинфектанты) неспецифического действия, которые в рабочих концентрациях оказывают микробоцидное действие.

Дезинфектанты и механизм их действия. Для дезинфекции поверхностей, больничного оборудования, аппаратуры и инструментов в Европе и США допущено около 400 комплексных дезинфектантов, в большинстве из которых содержатся четвертично-аммониевые соединения, альдегиды и алкоголи, реже – хлорсодержащие соединения, препараты фенола, пероксид водорода, неорганические кислоты, тяжелые металлы.

В России, Республике Беларусь и других странах СНГ чаще применяются следующие дезинфектанты: хлорная известь в виде 0,2–1 %-ного раствора, 0,2–1 %-ные растворы хлорамина Б и Т, 5 %-ный раствор кальция гипохлорита и 0,05–0,1 %-ный раствор трихлоризоциануровой кислоты (диконита); 0,1–0,2 %-ный раствор сульфохлорантина, нарушающего структуру микробных белков посредством взаимодействия с их гидроксильными группами; раствор формальдегида, алкилирующий сульфгидрильные, карбоксильные и аминогруппы белков и других соединений; растворы дегмина и дегмицида; первомур; изредка – растворы производных фенола, денатурирующие белки и нарушающие структуру клеточной стенки; пероксид водорода, окисляющий белки; смеси оксида этилена с углекислым газом (1:10) и с бромидметилом (1:1). Часть перечисленных дезинфектантов с успехом может использоваться в антисептике.

Антисептика. В энциклопедическом словаре *P. Singleton* и *D. Sainslury* (1978) антисептика определена как дезинфекция отдельных тканей, в частности кожи человека и животных, нетоксическими химическими веществами. В США и других странах под антисептикой понимают **метод** подавления жизнедеятельности потенциально патогенных микробов на коже и слизистых оболочках независимо от их состояния. *D. Droschel* с соавторами, не довольствуясь уже давно существующим разграничением между дезинфекцией и антисептикой, полагают, что в этом определении термина антисептика «метод» нужно переиначить

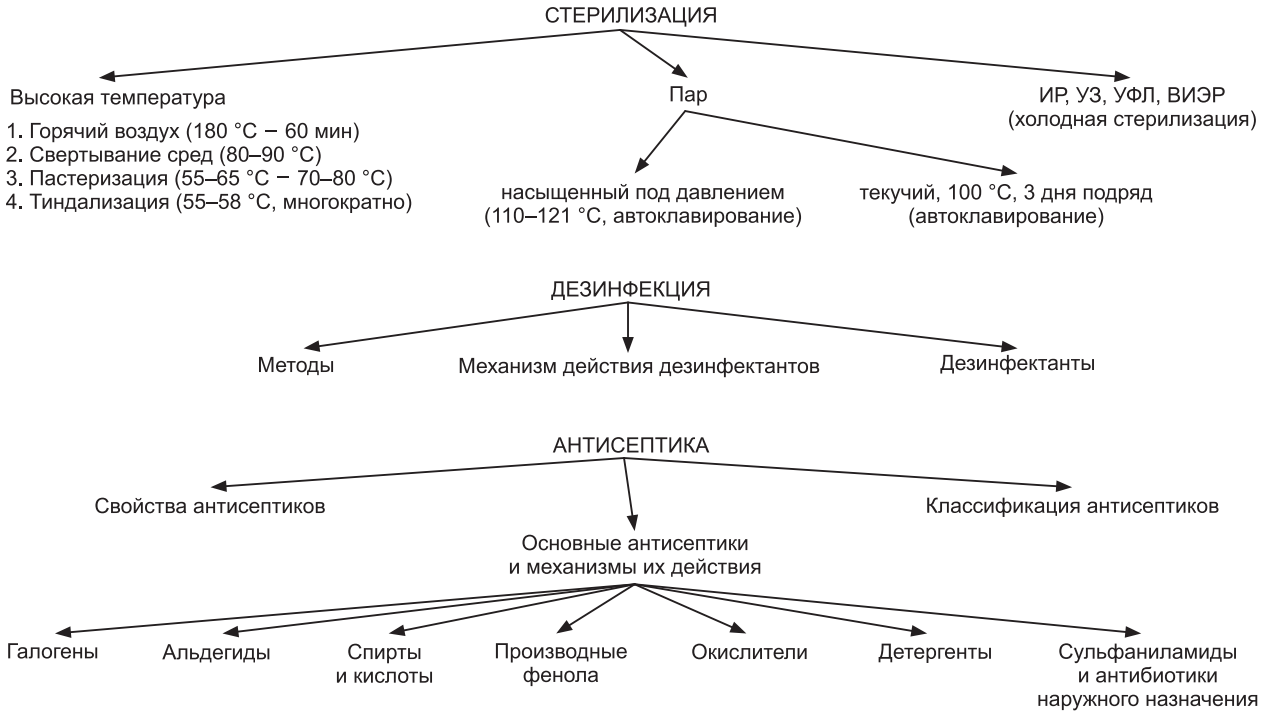
на «совокупность способов» и добавить «в ранах и полостях в целях лечения и предупреждения развития инфекционных процессов».

Основные принципы антисептики разработал Д. Листер, предложивший в 1868 г. обеззараживать руки хирурга, воздух операционных и раневые повязки 2–5 %-ным раствором карболовой кислоты (фенола).

Основные свойства антисептиков. В арсенале антисептиков в настоящее время имеется большое разнообразие антимикробных веществ. В отличие от дезинфектантов антисептики обычно являются бактериостатиками. Как правило, имеют более узкий спектр антимикробного действия, не растворяются в воде, а поэтому и не всасываются внутрь организма и в рабочих концентрациях не оказывают на человека вредного действия.

Классификация антисептиков. Антисептики по своему составу можно подразделить на моно- и многокомпонентные препараты, по происхождению – на неорганические, органические и синтетические, по направленности действия – на антибактериальные, противовирусные, антигрибковые и антипаразитарные, по механизму действия – на деструктивные, антиметаболические, окисляющие, по химическому составу – на галогены, спирты, кислоты и щелочи, альдегиды, красители, окислители, детергенты, сульфаниламидные антисептики, антибиотики антисептического (местного) назначения.

Чаще других применяют: спиртовой раствор йода и его комплексные препараты – йодинол, йодонат и раствор Люголя (галогены); раствор формальдегида, циминаль и уробесал, действующие за счет образования формальдегида при их гидролизе (альдегиды); этанол, изопропанол и другие спирты; хлоргексидин, гексахлорофен, хлорофен, тимол, салол (производные фенола); борная, уксусная и салициловая кислоты; бриллиантовый зеленый, метиленовый синий, основной фуксин (красители); пероксид водорода и перманганат калия (окислители); дегмицид, циригель (катионные детергенты); бензалкониумхлорид, или роккал (анионный детергент); сульфапиридазин-натрий, сульфацил-натрий, сульфасалазин (сульфаниламидные антисептики); бацитрацин, гелиомицин, микроцид, грамицидин С, тиротрицин и тироцидин (антибиотики наружного назначения).


СТЕРИЛИЗАЦИЯ
Высокая температура
1. Горячий воздух (180 °С – 60 мин)
2. Свертывание сред (80–90 °С)
3. Пастеризация (55–65 °С – 70–80 °С)
4. Тиндализация (55–58 °С, многократно)
Пар
насыщенный под давлением (110–121 °С, автоклавирование)
текучий, 100 °С, 3 дня подряд (автоклавирование)
ИР, УЗ, УФЛ, ВИЭР (холодная стерилизация)
ДЕЗИНФЕКЦИЯ
Методы
Механизм действия дезинфектантов
Дезинфектанты
АНТИСЕПТИКА
Свойства антисептиков
Основные антисептики и механизмы их действия
Классификация антисептиков
Галогены
Альдегиды
Спирты и кислоты
Производные фенола
Окислители
Детергенты
Сульфаниламиды и антибиотики наружного назначения

Граф 24

ПИТАНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Бактерии нуждаются в самых разнообразных веществах. Одни из них используются для построения структурных элементов клетки, другие служат источником энергии. Будучи голофитами (*holos* – полноценный, *phytikos* – как растения), бактерии утилизируют их в виде низкомолекулярных (простых) соединений из растворов, но многие виды, обладая мощным ферментативным потенциалом, так же, как голозои (*holos* + *zoikos* – как животные), способны усваивать высокомолекулярные продукты, расщепляя их вне клетки.

Питательные вещества поступают в бактериальную клетку через оболочку. В процессе питания она играет роль сита. Главное значение в питании имеет цитоплазматическая мембрана. Через нее вещества проникают разными путями: 1) путем простой диффузии низкомолекулярных соединений, образующих истинные растворы; 2) путем облегченной диффузии, которая протекает при помощи белков-переносчиков, или байдинг-белков с очень низкой степенью сродства к усвояемым субстратам, имеющих два центра, из которых один может связываться с питательным веществом, а другой – с особыми белками-пермеазами; 3) путем активного транспорта веществ, осуществляемого аминокислотными, оксикислотными, ионными пермеазами. Активный транспорт идет против электрохимического или концентрационного градиента и во многом зависит от заряда веществ и их трансформации в процессе питания (фосфорилирование глюкозы, нуклеозидов, ацетилирование жирных кислот и т. д.).

Потребность в биогенах и классификация бактерий по типам питания

Для нормальной жизнедеятельности бактериальной клетке необходимы четыре биогена (органогена): углерод, азот, водород и кислород. Наиболее важный из них – углерод.

Лито- и органотрофы. В зависимости от источника получения углерода бактерии подразделяют на две основные группы: лито-, или аутотрофы, усваивающие углерод из минеральных соединений (*lithos* – камень, *autos* – сам пи-

тающийся), и органо-, или гетеротрофы, получающие углерод из сахаров, многоатомных спиртов, оксикислот (*heteros* – за счет других питающийся). При этом органотрофные бактерии делятся на сапрофиты, использующие органические субстраты окружающей среды, и паразиты, размножающиеся внутри клеток хозяина или требующие нативного белка.

По характеру использования источника энергии и углерода различают четыре группы бактерий: фотолито- и фотоорганотрофы, хемолито- и хемоорганотрофы. Другие органогены (азот, водород и кислород) они получают из аммиака, амино- и оксикислот, нитритов и нитратов, воды и даже из атмосферы.

Зольные элементы, микроэлементы, ростовые вещества. Для синтеза клеточного вещества, помимо органогенов, бактериям нужны зольные элементы – сера, фосфор, калий, кальций, магний, железо. Так, в частности, сера входит в состав белков и имеет большое значение в регуляции окислительно-восстановительного потенциала цитоплазмы. Фосфор – основной элемент нуклеиновых кислот, фосфолипидов, многих ферментов и важнейших энергетических соединений. Калий участвует в процессах превращения углеводов. Магний входит в состав пигмента хлорофилла у фотосинтетических бактерий, железо включается в гемины, являющиеся простетическими группами ряда ферментов (геминный фермент, цитохромы). Значение кальция изучено в меньшей мере. Полагают, что его ионы активируют аденозинтрифосфатазу, сукцинатдегидрогеназу, процессы синтеза веществ. Потребность бактерий в зольных элементах невелика (0,1–0,8 %) и обеспечивается двузамещенным фосфорнокислым калием, хлористыми солями натрия и кальция, сульфатами железа и магния.

Для активации роста бактерий в микродозах необходимы также бор, молибден, цинк, кобальт, никель, марганец, медь, йод, бром. Все они – жизненно важные элементы, так как входят в состав ферментов.

Ряд бактерий (например, бруцеллы, коринебактерии, гемофилы) нуждаются в ростовых факторах, к которым относят аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины. Особенно часто бактерии испытывают недостаток в витаминах группы В, входящих в состав некоторых коферментов (пантотеновая и фолиевая кислоты,

никотинамид, пиридоксин, тиамин, рибофлавин). Существенную роль при культивировании микобактерий играет витамин К. По отношению к ростовым веществам бактерии делятся на прото- и ауксотрофы. Прототрофы самостоятельно синтезируют ростовые вещества, ауксотрофы (мутанты) эту способность утратили и без них не растут.

Питательные среды

Посуда. Готовят питательные среды в эмалированной и стеклянной посуде. Новую стеклянную посуду для нейтрализации растворимой щелочи кипятят в 1–2 %-ном растворе соляной кислоты, а бывшую в употреблении – моют в мыльном или содовом растворе. Ту и другую прополаскивают, тщательно промывают в проточной воде и сушат. Сухие флаконы, колбы, пробирки заливают питательными средами, закрывают ватными тампонами (пробками) и стерилизуют.

Классификация сред. Источниками биогенов, других элементов, ростовых и питательных веществ, предназначенных для выращивания бактерий, являются мясо, рыба, овощи, химические соединения. В зависимости от свойств и назначения различают жидкие, полужидкие и плотные среды; натуральные, синтетические и полусинтетические; простые (основные), сложные и специальные.

Жидкие питательные среды готовят на водопроводной и дистиллированной воде. Для их уплотнения используют агар-агар (от 0,15 до 3 %), диоксид кремния, или силикагель (1,5 %), и желатин (10–15 %). При этом агар-агар получают специальной обработкой морских водорослей. Он является веществом полисахаридной природы, содержит незначительное количество азота. Студень, образуемый агаром, плавится при температуре 70–100 °С и застывает при комнатной температуре. Силикагель является продуктом прокаливания геля поликремниевой кислоты. Желатин представляет собой вещество белковой природы. Его готовят из костей, хрящей и отходов шкур телят. Точка плавления 10 %-ного желатина – 32–40 °С.

Натуральные среды состоят из белковых продуктов животного, растительного и микробного происхождения. Химический состав их непостоянный и может в значительной степени варьировать.

Простые среды. К простым натуральным питательным средам относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), молоко и овощи, например кусочки картофеля, свеклы, моркови.

МПБ и МПА. Основой для приготовления МПБ и МПА служит мясная вода. Готовят ее следующим образом. Свежую говядину или телятину, отделенную от костей, жира и сухожилий (500 г), пропускают через мясорубку, фарш заливают 1 л водопроводной воды, хорошо размешивают и оставляют на сутки в прохладном месте или помещают на 2 ч в термостат при температуре 37 °С. Далее настой мясного фарша отжимают через марлю, кипятят в течение 5 мин для свертывания белков, пропускают через ватный фильтр, доливают до первоначального объема водой и после разлива в колбы и флаконы стерилизуют в автоклаве. Содержащая определенное количество аминокислот, витаминов группы В, солей, углеводов, факторов роста, прочих экстрактивных веществ мясная вода после автоклавирования должна иметь вид прозрачной желтоватой жидкости слабокислой реакции (pH 6,2–6,4).

Для приготовления МПБ к мясной воде прибавляют 1 % сухого пептона (смесь альбумоз, полипептидов и аминокислот), 0,5 % натрия хлорида и, установив нужный уровень pH среды (для бактерий-нейтрофилов – 7,2–7,6, для алкалифилов – 7,8–8,6, для ацидофилов – 4,0–6,0), кипятят 30 мин, фильтруют и стерилизуют в автоклаве.

МПА готовят на бульоне, прибавляя хорошо промытый агар-агар, который после расплавления и охлаждения придает среде плотную (1,5–3 %) или полужидкую (0,15–0,4 %) консистенцию студня (геля).

В настоящее время бактериологические лаборатории широко используют сухие питательные среды в виде порошков, хранящихся в герметично закрытых банках. Готовят эти среды по указанным на этикетках прописям. Навеску порошка растворяют в определенном объеме дистиллированной воды, среду разливают в соответствующую посуду и стерилизуют. Преимуществом сухих производственных сред является постоянство их состава, стандартность, удобство в приготовлении, легкость транспортировки.

Молоко как простая среда становится пригодным для выращивания бактерий лишь после снятия сливок, для чего требуется отстаивать его в холодильнике, а *овощи* – после очищения от кожуры и получения сочных ломтиков.

Сложные среды. Сложные питательные среды готовят на основе МПБ или МПА, добавляя к ним углеводы, сыворотку, дефибринированную кровь животных и человека, асцитическую жидкость брюшной полости больных. К числу сложных относят также молочные, сывороточные и яичные среды.

Сахарные МПБ и МПА. Чаще всего бульон и агар готовят с 0,5–1 %-ным раствором глюкозы. Стерилизуют их текучим паром. К стерилизованным МПБ и МПА можно добавлять ампульные растворы глюкозы с последующим контролем на стерильность.

Агар и бульон с кровью, сывороткой, асцитической жидкостью. К стерильному, расплавленному, охлажденному до 45 °С МПА и МПБ прибавляют 5–10 % дефибринированной крови, 20–25 % сыворотки или асцитической жидкости. Тщательно перемешивают со средами; агар скашивают в пробирках и разливают в чашки Петри.

Желчный бульон. К МПБ прибавляют 10 % бычьей желчи, разливают в пробирки, флаконы и стерилизуют.

Специальные среды по своему назначению делят на консервирующие, селективные (элективные) и дифференциально-диагностические.

Консервирующие среды. Используются для предотвращения отмирания патогенных микробов в патологическом материале при его транспортировке в лабораторию. К ним, в частности, относится глицериново-солевая смесь, состоящая из одной части глицерина, двух частей изотонического раствора хлорида натрия и одной части 15–20 %-ного раствора фосфата натрия.

Селективные среды. Селективные, или избирательные, среды создают оптимальные условия для выращивания определенного вида микроорганизма. Например, селективной средой для коринебактерии дифтерии является свернутая лошадиная сыворотка, для сальмонелл брюшного тифа и паратифов – желчный бульон, для холерного вибриона – щелочная 1%-ная пептонная вода и щелочной агар. С учетом чувствительности бактерий к химическим веществам селективные условия можно создать, добавив в питательные среды небольшие концентрации красителей или антибиотиков. К приготовлению таких селективных сред прибегают при выделении сальмонелл брюшного тифа и паратифов (среда Мюллера с тетратионатом натрия),

стафилококка, бруцелл, иерсиний чумы (генцианвиолет), микобактерий туберкулеза (малахитовый зеленый), бордетелл, нейссерий, бруцелл (пенициллин, линкомицин, ристомицин, полимиксины).

Дифференциально-диагностические среды (ДДС). Предназначены для дифференциации больших групп родственных микроорганизмов, например семейства энтеробактерий, в состав которого входят десятки видов, отличающихся друг от друга только биохимической активностью, в частности – активностью протеаз и гликозидаз, которые чаще всего изучают на мясопептонном желатине, свернутой сыворотке, пептонной воде, средах Гисса, Мак-Конки, Плоскирева, Эндо и Левина.

Мясопептонный желатин. К МПБ добавляют 10–15 % нарезанного желатина. После набухания желатин нагревают до полного расплавления, устанавливают pH 7,0–7,1. Среду осветляют, прибавляя к 1 л яичный белок, смешанный с двумя объемами воды, взбалтывают и кипятят в течение 20 мин, фильтруют в горячем виде, разливают в пробирки и стерилизуют.

Свернутая сыворотка. Готовят среду из нормальной лошадиной или бычьей сыворотки, стерильно разливают в пробирки по 3 мл и укладывают их наклонно в аппарате для свертывания. Стерилизацию проводят при температуре 80 °С в течение 1 ч. Свернутая сыворотка должна содержать конденсационную воду и выборочно подвергаться проверке на стерильность в термостате. При прорастании сред в контрольных пробирках все остальные стерилизуются дважды при той же температуре по 1 ч в течение 2 сут.

Пептонная вода. К 1 л дистиллированной воды добавляют 10 г пептона и 5 г натрия хлорида, кипятят, охлаждают, подщелачивают до pH 8,0–8,2, разливают в пробирки, флаконы и стерилизуют.

Среды Гисса. Используются жидкие и полужидкие агаризованные среды. В те и другие вносят необходимые углеводы и индикаторы (в жидкие – фуксин с гипосульфитом натрия, который называют индикатором Андраде, а в полужидкие – водный голубой + розоловая кислота). Чаще всего используют производственные среды Гисса, заливая их столбиками в бактериологические пробирки.

Среды Мак-Конки. Плотные среды Мак-Конки готовят путем прибавления к 1 л дистиллированной воды 5 г тау-

рохолевокислого натрия, 20 г пептона, 5 г хлористого натрия, 20 г агар-агара с последующим кипячением до полного его расплавления. Затем горячую среду осветляют белком куриного яйца, фильтруют, а установив pH 7,3 и добавив 10 г лактозы, 5 мл 1 %-ного водного раствора нейтрального красного, ее стерилизуют при 110 °С в течение 15 мин. Бульон Мак-Конки содержит те же ингредиенты, кроме агар-агара (лактозу к нему желательно добавлять из стерильных ампульных растворов после автоклавирования среды).

Близкие по составу средам Мак-Конки производственные *лактозные агары Плоскирева, Эндо и Левина*, широко используемые в странах СНГ, отличаются друг от друга только индикатором, в частности в первом из них индикатором является нейтральрот, во втором – фуксин, обесцвеченный сульфитом натрия, в третьем – эозин и метиленовый синий. Среды заливаются в чашки Петри пластинками. Кишечные палочки (эшерихии), ферментирующие лактозу до альдегидов и оксикислот, образуют на средах Мак-Конки и Плоскирева розовые колонии, на среде Эндо – красные с металлическим блеском (восстановление фуксина), на среде Левина – фиолетовые. В отличие от них родственные им сальмонеллы, шигеллы, не ферментирующие лактозу, вырастают на всех четырех средах в виде бесцветных колоний.

Для определения видовой принадлежности бактерий часто применяют *многокомпонентные среды,* которые в сжатые сроки позволяют выявить несколько основных ферментных систем. Одной из таких сред, в частности, является среда Олькеницкого.

Среда Олькеницкого. Готовится среда путем прибавления к 100 мл МПА 1 г лактозы, 1 г сахарозы, 0,1 г глюкозы, 1 г мочевины, 0,02 г соли Мора, 0,03 г гипосульфита. При этом все ингредиенты предварительно растворяют в дистиллированной воде на водяной бане, хорошо перемешивают с МПА, фильтруют через стерильную марлю, добавляют 0,4 мл фенолового красного, устанавливают pH 7,2–7,4, разливают в пробирки и располагают их под таким углом, чтобы получить скошенную поверхность с агаровым столбиком. Интактная среда Олькеницкого имеет бледно-розовый цвет.

Гемолитическую способность бактерий изучают *на кровяном агаре в чашках Петри.*

Синтетические среды. Создаются из химически чистых соединений в строго определенных концентрациях в зависимости от потребностей микроорганизмов в факторах роста. Готовят их на основе минимальных сред, в состав которых входят минеральные соли и глюкоза как единственный источник углерода и энергии, обеспечивающий рост прототрофов. Эшерихии-прототрофы хорошо растут на синтетической *минимальной среде*, состоящей из NH_4Cl (1,0 г), $MgSO_4$ (0,13 г), KH_2PO_4 (3,0 г), Na_2HPO_4 (60,0 г) и воды (100 мл). Для выращивания в ней ауксотрофов обычно прибавляют 10–20 мкг/мл необходимых им аминокислот, 10 мкг/мл пуринов и пиримидинов, 1 мкг/мл витаминов.

Для культивирования микобактерий туберкулеза используют синтетическую *среду Сотона.* В 200 мл дистиллированной воды при подогревании растворяют 4 г аспарагина, 2 г лимонной кислоты, 0,5 г дигидрофосфата калия, 60 г глицерина. Смесь фильтруют, добавляют к ней 800 мл дистиллированной воды, доводят pH до 7,2 путем добавления аммиака, разливают по колбам и стерилизуют. Во избежание быстрого высыхания среды пробирки, засеянные культурой микобактерий туберкулеза, парафинируют.

Важным показателем пригодности среды является концентрация в ней водородных ионов (pH), которая для большинства патогенных бактерий соответствует 7,2–7,4. Исключение составляют алкалифилы (щелочелюбивые бактерии), например холерный вибрион, лучше развивающийся при 7,8–8,6, и ацидофильные грибки, хорошо размножающиеся при кислых значениях pH 4,0–6,0.

По температурному оптимуму роста бактерии подразделяют на психро- (15–20 °С), термо- (50–60 °С) и мезофилы (30–37 °С). Болезнетворные виды микробов в большинстве своем – мезофилы. К психрофилам принадлежат возбудители чумы, лептоспироза, некоторые варианты клостридий ботулизма.

Вырастая на поверхности плотных питательных сред, отдельные особи микробов образуют колонии, представляющие собой однородную популяцию клеток. При этом у разных видов бактерий, грибов и микоплазм колонии неодинаковы по размерам, очертаниям, характеру поверхности, особенностям краев, прозрачности, влажности, консистенции, пигментной окраске и пр.

При густом засеве плотная среда покрывается сплошным налетом культуры, который называют *газоном*.

Фазы размножения бактерий

Скорость размножения у разных бактерий зависит от видовых свойств, питательной среды, температуры, аэрации и других условий культивирования. Характер процесса их размножения определяется способом выращивания.

В закрытой системе при ограниченном объеме мясопептонного бульона в пробирке или небольшом сосуде различают несколько фаз размножения засеянных бактерий: 1) начальную, стационарную, или лаг-фазу; 2) фазу положительного ускорения, в которой начинается деление бактерий; 3) экспоненциальную (логарифмическую), отличающуюся максимальной скоростью размножения клеток и увеличением их количества в геометрической прогрессии; 4) фазу отрицательного ускорения, характеризующуюся замедлением темпа размножения; 5) стационарную фазу максимума, в которой количество жизнеспособных особей в единице объема среды для каждого вида бактерий достигает постоянного максимального уровня, или М-концентрации; 6) поэтапные фазы отмирания культуры, заканчивающиеся переходом оставшейся живой популяции в состояние покоя.

Продолжительность отдельных фаз размножения у различных видов бактерий варьирует. Так, у кишечной, дизентерийной и брюшнотифозной палочек, которые при 37 °С делятся каждые 20–30 мин, длительность первых двух фаз не превышает 1–2 ч, фаза экспоненциального роста продолжается 5–6 ч, в стационарную фазу максимума культура переходит спустя 12–16 ч, а в состояние покоя – через 20–24 ч с момента посева. У медленно делящихся бактерий, например микобактерий туберкулеза, фазы размножения удлиняются, и культура вырастает через 10–14 дней и более.

В открытой системе типа хемостата размножение микробов непрерывно поддерживается поступлением свежей среды и зависит от концентрации лимитирующих метаболитов.

ПИТАНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ
Механизм питания
Диффузия
Транспорт
Фото- и хемосинтез
Потребность
Органогены
Литотрофы
Органотрофы
Сапрофиты
Паразиты
Факторы-вещества
Экстракты
Зольные
Микроэлементы
Ростовые
Среды
Прототрофы
Ауксотрофы
жидкие
(полужидкие)
плотные
натуральные
синтетические
(полусинтетические)
простые
сложные
специальные
Фазы размножения
начальная
ускорения
стационарная
отмирания
положительного
экспоненциального
отрицательного

Граф 25

Культивирование бактерий

Рост и размножение, процессы структурной организации, функциональная активность бактерий требуют затрат энергии. Потребность в ней удовлетворяется за счет энергетического обмена веществ, или дыхания, под которым понимают цепь последовательных окислительно-восстановительных реакций, катализируемых ферментами (см. «Метаболизм микроорганизмов»).

Типы дыхания бактерий. По типу дыхания бактерии подразделяют на облигатные аэробы (*aer* – воздух, *bios* – жизнь), облигатные анаэробы (*an* – отрицание, отсутствие) и факультативные анаэробы. Простейшим приемом определения типа дыхания у бактерий служит посев культуры уколом в столбик полужидкого агара (см. ниже). Рост аэробов будет происходить на поверхности среды, облигатных анаэробов – у дна пробирки, а факультативных – по всему каналу укола. Главное различие между бактериями с разным типом дыхания определяется особенностями обменных реакций.

Бактерии-аэробы. Облигатными аэробами (аэрофилами) называют те бактерии, которые развиваются при обычном парциальном давлении кислорода воздуха, без которого они существовать не могут, так как используют энергию, освобождающуюся при реакциях окисления, протекающих с его поглощением. При аэробном механизме расщепления вещества распадаются до диоксида углерода и воды, что ведет к полному освобождению энергии окисляемых соединений. К аэробам относят холерный вибрион, сибиреязвенную бациллу, микобактерии туберкулеза.

Бактерии-анаэробы. Анаэробы – это бактерии, развивающиеся в бескислородной среде. Строго облигатные – быстро отмирают даже при ничтожно малом наличии свободного молекулярного кислорода. Анаэробный механизм расщепления веществ никогда не идет до конца, а приостанавливается на стадии промежуточных продуктов. Естественно, энергетический эффект аноксидантного расщепления, которое присходит, например, в процессе брожения, оказывается значительно ниже аэробного. Облигатными анаэробами среди патогенных бактерий являются бактероиды, клостридии ботулизма, столбняка и газовой гангрены. В отличие от них факультативные анаэроб-

ные бактерии развиваются как при наличии, так и при отсутствии свободного кислорода, используя в последнем случае энергию, освобождающуюся в процессе брожения. Факультативно-анаэробный тип дыхания присущ большинству бактерий, типичными представителями которых могут быть, например, эшерихии, сальмонеллы, стафилококки, стрептококки и многие другие виды. Из этой группы бактерий выделяют микроаэрофилы, хорошо развивающиеся при пониженном доступе кислорода (молочнокислые бактерии), и капнеические бактерии, требующие к тому же повышенной концентрации диоксида углерода (бычий вид бруцелл, кампилобактеры).

Тип дыхания микроорганизмов определяется их ферментными системами (см. «Классификация ферментов»). С учетом этого при культивировании (выращивании) разных бактерий следует создавать оптимальный уровень окислительно-восстановительного потенциала питательной среды (rH_2), который отражает ее насыщение кислородом и водородом. Так, аэробы лучше растут при rH_2 14–20 и выше, облигатные анаэробы – в диапазоне 0–12, а факультативные – 0–20.

Условия выращивания бактерий-анаэробов. Факультативные бактерии-анаэробы растут при пониженном содержании кислорода, облигатные – при полном его отсутствии.

При культивировании облигатных анаэробов на пластинчатых средах в чашках Петри их помещают в макро- или микроанаэростаты, из которых полностью откачивают воздух, нередко заполняя создавшийся вакуум азотом или диоксидом углерода.

Макроанаэростат представляет собой двухстенный аппарат с герметически закрывающейся крышкой. Между стенками аппарата находится вода, источником тепла служит электричество; постоянную температуру обеспечивает терморегулятор.

Микроанаэростат – это небольшой портативный металлический цилиндр с герметически закрывающейся крышкой и отводящим соском, через который с помощью вакуум-насоса из него откачивают воздух (рис. 32).

Анаэробные условия можно создать также в эксикаторе или других герметических сосудах, поместив в них смесь гидрокарбоната натрия и гидросульфита натрия, щелочной раствор пирогаллола. В качестве биологичес-

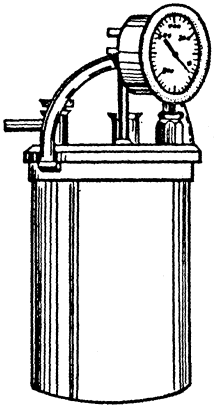


Рис. 32. Портативный микроанаэростат

ких поглотителей кислорода используются также бактерии-аэробы. С этой целью Фортнер предложил засевать одну половину питательного агара в чашке Петри эшерихиями, а другую – анаэробными клостридиями, предварительно вырезав между ними полоску среды, предотвратив тем самым смешивание разноименных видов бактерий, обладающих жгутиками. Затем чашка парафинируется и термостатируется. Анаэробы вырастают вслед за аэробами.

В практических лабораториях облигатные анаэробы культивируются в толще сахарного агара в пробирках или в пастеровских пипетках, концы которых после заполнения средой запаиваются (метод Виньяля – Вейона). Они выращиваются также на среде Китта – Тароцци, состоящей из концентрированного МПБ, глюкозы и 0,15 %-ного агара (pH 7,2–7,4). Залив ее в пробирки (6–7 мл), на дно для адсорбции кислорода помещают кусочки вареной печени (или фарша) слоем 10–15 мм, и приготовленную таким образом среду покрывают стерильным вазелиновым маслом.

Способы посева бактерий и материалов

Существует несколько способов посева, но каждый из них может отличаться некоторыми техническими особенностями, зависящими от инструмента засева, консистенции питательной среды, посуды, в которой она находится, характера засеваемого вида бактерий, материала, в котором он содержится. При этом засев бактерий производят бактериальной петлей или иглой (см. рис. 2), микробиологическим шпателем, пастеровской или градуированной пипеткой (рис. 33). К основным из них относятся посевы бактериальной петлей и шпателем.

Посев бактериальной петлей на скошенную и жидкую среды в пробирках. Приступая к посеву, в левой руке раз-

мещают две пробирки, например, с чистой культурой бактерий и со стерильной средой, держа их пальцами в наклонном положении так, чтобы не проливалось имеющееся в них содержимое. В правую руку, как писчее перо, берут петлю и в вертикальном положении фламбируют в пламени горелки. Пробки из пробирок вынимают одновременно, зажав их между мизинцем и ладонью правой руки, тотчас же обжигают края горлышек пробирок. Прокаленную петлю вводят в пробирку, охлаждают, прикасаются к культуре и быстро переносят ее в пробирку со средой, ополаскивая петлю в бульоне или распределяя штрихами по скошенной поверхности агара (рис. 34, *а*). Петлю извлекают, фламбируют края пробирок и закрывают их проведенными через пламя пробками, затем петлю стерилизуют, пробирки надписывают и ставят в штатив.

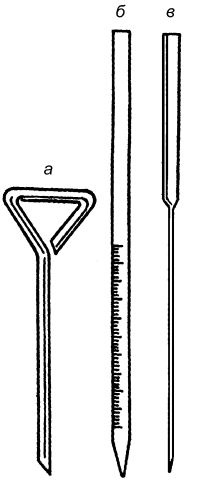


Рис. 33. Микробиологический шпатель (*а*), градуированная (*б*) и пастеровская (*в*) пипетки

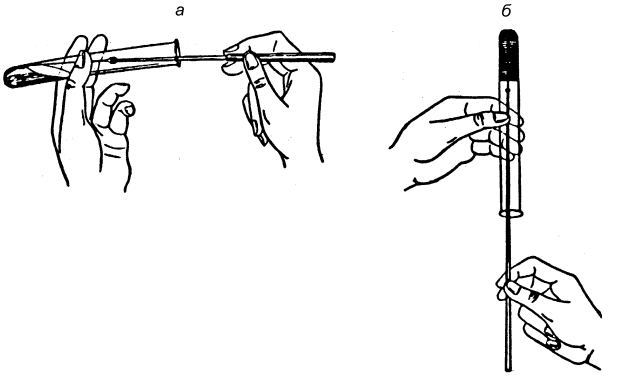


Рис. 34. Посев материалов-культур:
а – бактериальной петлей на скошенную среду; *б* – уколом в столбик среды

Посев уколом в столбики полутвердых сред. Обычно засевают полутвердые столбики мясопептонного агара и желатина, насквозь прокалывая их иглой или петлей, держа пробирки дном вверх (рис. 34, *б*). Посев применяют для выращивания бактерий-анаэробов, хранения культур, выявления ферментативных свойств.

Посев пипетками. Пробирку (колбу), содержащую жидкую среду, держат левой рукой под небольшим углом, а градуированную или пастеровскую пипетку с набранным материалом под таким же наклоном, но при обратном положении, – в правой. Переносят его в питательную среду после снятия пробки и фламбирования горлышка пробирки, погружая кончик пипетки до дна. Материал выдувают и тщательно перемешивают в среде. Пробирки закрывают, а пипетки помещают в дезинфицирующий раствор.

Способы посева на плотные среды в чашках Петри. Плотные питательные среды, например МПА, разливают в чашки следующим образом. Флакон (пробирку) с расплавленной средой берут в правую руку, левой вынимают пробку, обжигая горлышко. Большим и указательным пальцами левой руки приподнимают крышку чашки Петри и, не касаясь ее краев, вводят под нее горлышко, наливая 15–20 мл среды. Быстро закрывают крышку и флакон. Чашку слегка покачивают для равномерного распределения среды и оставляют на столе для застывания. Затем переносят ее в термостат, переворачивают вверх дном, снимают крышку и в таком положении 15–20 мин подсушивают.

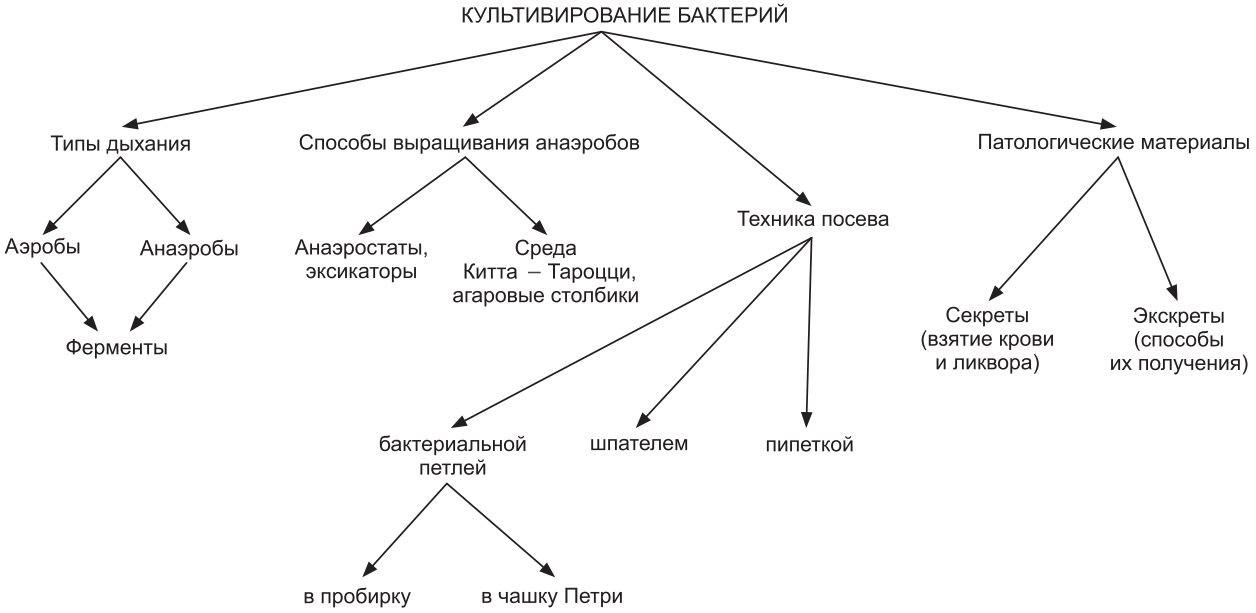
Посев бактериальной петлей. Исследуемый жидкий материал набирают петлей и, не прикасаясь к стенке пробирки, встряхивают для удаления излишка. Чашку Петри с агаризованной средой помещают на столе вверх дном. Донную часть чашки берут левой рукой и держат почти вертикально, петледержатель – большим и указательным пальцами правой руки и легкими движениями наносят оставшуюся часть материала параллельными штрихами по всему диаметру поверхности среды.

Посев шпателем. Шпатели готовят из стеклянных палочек толщиной 4–5 мм, согнутых в виде треугольни-

ка (рис. 35). Стерилизуют их завернутыми в бумагу в сухожаровом шкафу, а также сжиганием спирта после предварительного смачивания им. Засевают шпателем каплю материала или взвеси микробов, распределяя ее круговыми движениями по всей поверхности питательной среды, удерживая левой рукой крышку чашки Петри приоткрытой. Одним и тем же шпателем таким же приемом засеваются поочередно вторая и третья чашки, после чего его погружают в банку с дезинфицирующим раствором. Чашки переворачивают, надписывают и ставят в термостат вверх дном, чтобы избежать размывания растущих колоний на среде капельками конденсационной воды, в большом количестве скапливающихся на внутренней поверхности крышки при обычном ее положении.

Рис. 35. Посев микробиологическим шпателем на МПА в чашках Петри

Патологическими материалами, которые используются для посева на питательные среды, могут быть кровь, спинномозговая жидкость, пунктаты (*punctum* – прокалывать), например, полостей и лимфоузлов (секреты), рвотные массы, промывные воды желудка, моча, испражнения, гной, слизь, мокрота (экскреты). Эти и другие материалы берутся стерильными инструментами и помещаются в стерильные банки, флаконы, пробирки и направляются на исследование. В сопроводительном листе, прилагаемом к пробам, должны быть указаны фамилия, инициалы больного или умершего, материал, цель исследования, название направляющего пробы учреждения, адрес лаборатории, куда они доставляются, и дата. При микробиологическом исследовании материалов нужно строго соблюдать правила противоэпидемического режима, исключающего возможность внутрилабораторного инфицирования, и, прежде всего, неукоснительно выполнять рекомендации по предотвращению заражения вирусами гепатитов и СПИДом.


КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ
Типы дыхания
Способы выращивания анаэробов
Техника посева
Патологические материалы
Аэробы
Анаэробы
Ферменты
Анаэростаты, эксикаторы
Среда Китта – Тароцци, агаровые столбики
бактериальной петлей
шпателем
пипеткой
в пробирку
в чашку Петри
Секреты (взятие крови и ликвора)
Экскреты (способы их получения)

Граф 26

Выделение чистых культур бактерий

Чистая культура – это биомасса одной особи бактерий (колонии), полученной на питательной среде из патологического материала, глубокое исследование которой позволяет установить ее видовую принадлежность и природу инфекционного заболевания.

Приступая к выделению чистой культуры, следует иметь в виду, что возбудители в экскретах находятся в ассоциации с банальной (посторонней) микрофлорой. Следовательно, для их изоляции гной, мокроту, осадки мочи, испражнения необходимо засеять так, чтобы получить изолированные колонии. С этой целью они засеваются частыми штрихами бактериальной петлей по всей поверхности агаризованных сред в чашках Петри. Взятые тампонами слизь из зева, смывы с рук и предметов засевают на пластинчатые среды круговыми движениями или вначале их отжимают в жидких средах с последующим штриховым отсевом бактериальной петлей.

Выросшие колонии после детального изучения пересевают на скошенные и жидкие среды. Накапливая в них биомассу чистой культуры, на I этапе идентификации вида исследуют ее морфолого-культуральные свойства. При этом следует учитывать некоторые различия в выборе метода получения чистых культур аэробных и анаэробных бактерий.

I этап идентификации бактерий-аэробов. Бактерии-аэробы выращивают при нормальном парциальном давлении кислорода и температуре 37 °С в термостате (рис. 36).

Идентифицируя их, *в первый день исследования* материал микроскопируют и высевают шпателем или бактериальной петлей на плотную среду в чашки Петри (в отдельных случаях – в жидкую среду обогащения). Посевы помещают в термостат на 18–24 ч.

На второй день исследования изучают специфические признаки колоний, выросших на поверхности питательной среды в чашках Петри.

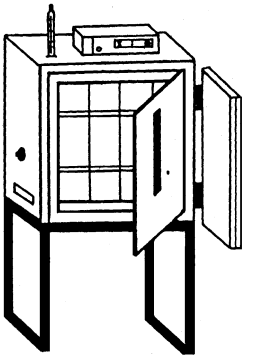


Рис. 36. Термостат

1. Вначале рассматривают их невооруженным глазом со стороны дна чашки Петри *в проходящем свете*. Если имеются два-три различных вида колоний, их нумеруют и описывают каждую в отдельности. В протоколе отмечают следующие данные: а) размеры колоний (крупная – 4–5 мм в диаметре и более, средняя – 2–4 мм, мелкая – 1–2 мм, карликовая – менее 1 мм); б) форму очертаний (правильно или неправильно округлая, розеткообразная, ризоидная и др.); в) степень прозрачности (непрозрачная, полупрозрачная, прозрачная).

2. Далее колонии описывают *в отраженном свете* со стороны крышки, отмечая: а) цвет (бесцветная, пигментированная); б) поверхность (гладкая, блестящая, влажная или морщинистая, матовая, сухая); в) положение на питательной среде (возвышающиеся над средой, погруженные или сливающиеся с ней, плотно прилегающие к среде, уплощенные).

3. Наконец, приступают к *микроскопическому изучению* структуры колоний. Чашку Петри устанавливают вверх дном на предметном столике микроскопа, опускают конденсор и объективом ×7 изучают: а) характер краев (ровные, волнистые, зазубренные, бахромчатые); б) структуру (гомогенная или аморфная, зернистая, волокнистая).

Из колонии готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. Остаток колонии пересевают на скошенный агар для получения в достаточном количестве чистой культуры. С этой целью чашку Петри с исследуемой колонией берут в левую руку. Бактериальную петлю держат ближе к концу петледержателя и фиксируют руку, опираясь мизинцем о борт чашки. Снимают петлей остаток отмеченной колонии, чашку Петри помещают в крышку и засевают скошенный агар. Пробирки с посевами помещают в термостат на 18–24 ч при температуре 37 °С.

I этап идентификации бактерий-анаэробов. *В первый день* исследуемый материал, содержащий анаэробы, микроскопируют и высевают в две пробирки со средой накопления Китта – Тароцци, при этом учитывая то, что анаэробы – спорообразующие бактерии, одну из них прогревают 30 мин при 80 °С для уничтожения конкурирующих с ними вегетативных форм сопутствующей микрофлоры. Посевы плотных питательных сред, разлитых в чашки Петри, помещают в макро- или микроанаэростаты.

На второй день помутневшую (нередко вспенившуюся) среду накопления набирают пастеровской пипеткой, опуская ее через слой вазелинового масла до дна пробирки. Масло с поверхности стенок пипетки удаляют стерильной ватой при помощи пинцета над сосудом с дезинфицирующим раствором. Полученную культуру микроскопируют и пересевают шпателем в три чашки Петри с кровяно-сахарным агаром, помещая их в анаэростат при температуре 37 °С на 24–48 ч (метод Цейсслера) или, после разведения в изотоническом растворе, ее засевают запаянным концом пастеровской пипетки в столбики расплавленных и остуженных сахарных агаров (метод Вейнберга).

На третий день изучают выросшие на чашках Петри колонии, делают из них мазки, высевают на среду Китта – Тароцци для накопления чистой культуры. Колонии из столбиков агара извлекают пастеровской пипеткой, микроскопируют и тоже высевают на среду Китта – Тароцци.

Окончательное определение видовой принадлежности выделенной культуры осуществляют на II этапе идентификации после всестороннего исследования: 1) спектра ферментатов, 2) генотипической и антигенной структуры с помощью ДНК-зондирования и диагностических иммунных сывороток в серологических реакциях, 3) фагочувствительности и 4) патогенности для экспериментальных животных.

Определение ферментативных свойств бактерий

В идентификации бактерий особенно важное значение имеет определение у них гидролаз, оксидоредуктазы и каталазы. По действию на различные вещества гидролазы в микробиологии подразделяют на сахаролитические и протеолитические.

Сахаролитические ферменты. Расщепляющие углеводы гликозидазы определяют в жидких или полужидких средах Гисса с моно- и дисахаридами (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза), полисахаридами (крахмал, гликоген, инулин), высшими и низшими спиртами (глицерин, маннит). Культуры в полужидкие среды засевают, прокалывая среду бактериальной петлей до дна пробирки. В процессе ферментации углеводов бактериями образуются альдегиды и кислоты, которые вызывают изменение цве-

та индикатора столбиков полужидкого агара, а при газообразовании – появление в них пузырьков.

Протеолитические ферменты. Протеазы у бактерий обнаруживают, засевая их уколом в столбик желатина. Выдерживают при комнатной температуре (20–22 °С) в течение нескольких дней, при этом регистрируют характер разжижения желатина (послойное, в виде гвоздя, елочки и др.). Протеазы бактерий расщепляют также уплотненную сыворотку. При посеве на молоко они нередко растворяют сгустки казеина с образованием пептона, что придает ему желтоватый цвет (пептонизация молока).

Более глубокое расщепление белка визуально определяют по изменению цвета узких полосок фильтровальных бумажек, смоченных разными индикаторами, которые помещают между стенкой пробирки и пробкой так, чтобы они свободно свисали над засеянной средой, в качестве которой используют 1 %-ную пептонную воду или мясопептонный бульон. Посевы выдерживают в термостате 1–3 сут.

Об индолообразовании в среде будет свидетельствовать порозовение полоски бумаги, пропитанной насыщенным раствором щавелевой кислоты (способ Мореля).

На расщепление белка до сероводорода укажет почернение кончика индикаторной бумаги, смоченной раствором уксуснокислого свинца, взаимодействие которого с H_2S приведет к образованию сульфита свинца.

Образование аммиака в питательной среде определяют по посинению свисающей лакмусовой бумаги.

Процесс декарбоксилирования гистидина, тирозина, орнитина, аргинина и других аминокислот, сопровождающийся образованием аминов и диоксида углерода, регистрируют, подвешивая над средой полоску бумаги с тимоловым синим в слабой щелочи (0,05 н. NaOH), исходный цвет которого по мере выделения CO_2 и его взаимодействия со щелочью будет сменяться на желтый. Интервал перехода окраски при pH 9,6–8,0. Одновременно протекающее дезаминирование аминокислот с подщелачиванием питательной среды аммиаком определяют с помощью 0,05 %-ного раствора бромтимолового синего. Желтая исходная окраска этого индикатора по мере защелачивания аммиаком становится синей. Интервал перехода окраски – при pH 6,0–7,6.

Изредка готовят среды для определения у бактерий цистиназы и уреазы.

Пропись среды для определения цистиназы (проба Пизу). К 90 мл расплавленного 2 %-ного МПА (pH 7,6) добавляют 2 мл раствора цистина (1 %-ного раствора цистина в 0,1 н. растворе NaOH), тщательно перемешивают и добавляют 2 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4. Среду стерилизуют при 110 °С в течение 30 мин. Перед определением цистиназы ее расплавляют, охлаждают до 50 °С и добавляют к ней 1 мл стерильного 10 %-ного раствора уксуснокислого свинца, 9 мл нормальной лошадиной сыворотки и разливают по 2 мл в агглютинационные пробирки.

Пропись среды для определения уреазы (проба Закса). К 100 мл простого мясопептонного бульона или бульона Хоттингера (pH 7,0) добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл крезолрота (1,6 %-ного раствора в спирте). Разливают по 2–3 мл в стерильные пробирки и стерилизуют текучим паром 10 мин.

При положительных результатах на цистиназу и уреазу соответствующие среды чернеют (проба Пизу) и приобретают малиновый оттенок (проба Закса).

Для определения каталазы на поверхность суточной агаровой культуры наносят несколько капель 1 %-ного раствора пероксида водорода – при положительной реакции происходит бурное образование пузырьков газа.

Определяя наличие оксидазы, на поверхность колонии или 18-часовой агаровой культуры наносят каплю 1 %-ного раствора парадиэтилфенилендиамина солянокислого. При положительной пробе через 1–3 мин колония или культура окрашивается в розовый цвет.

С целью определения редуцирующей (восстанавливающей) способности бактерий используют растворы метиленового синего, тионина, индигокармина, нейтрального красного, которые вносят в питательный бульон, покрытый слоем стерильного вазелинового масла, или агаризованную среду. При наличии у бактерий редуцирующей способности среды обесцвечиваются. Наиболее часто используют среду Ротбергера (МПА с 1 % глюкозы и несколькими каплями насыщенного раствора нейтрального красного). При положительной реакции красный цвет агара переходит в желтый, желто-зеленый, флюоресцирующий; в случаях одновременной ферментации глюкозы происходит разрыв столбика среды.

Для того чтобы составить ориентировочное представление о видовой принадлежности бактерий, обычно исследование ферментативных свойств проводят на коротком ря-

де Гисса, который включает пять столбиков полужидкого агара с индикатором ВР (водный голубой + розоловая кислота) и глюкозой, лактозой, мальтозой, сахарозой или маннитом, молоко, желатин и пептонную воду.

Методы идентификации нуклеиновых кислот

В диагностике гонореи, легионеллеза, хламидиоза, туберкулеза, вирусных гепатитов, малярии, других вирусных и протозойных инвазий применяют: а) методы гибридизации НК, в основе которых лежит их способность соединяться с комплементарными нитями (фрагментами); б) полимеразную цепную реакцию наращивания копий определенного фрагмента ДНК в реакции, катализируемой ДНК-полимеразой.

Метод гибридизации НК. Основной алгоритм ДНК-идентификации микробов состоит в следующем. ДНК, выделенную из прокариот, эукариот и вирусов, культивируемых вне организма, подвергают расщеплению рестрикционной эндонуклеазой. Среди множества образовавшихся ее фрагментов необходимо найти один или несколько из них, несущих определенную нуклеотидную последовательность, с тем, чтобы охарактеризовать ДНК. Для этого разделенные электрофорезом в геле фрагменты ДНК «перепечатывают» на фильтр (нитроцеллюлозу или нейлон), фиксируют на нем и подвергают гибридизации с так называемым «зондом» – олигонуклеотидом, меченым радиоизотопом. Этот зонд представляет собой ранее клонированную с помощью методов генетической инженерии нуклеотидную последовательность гена, подлежащего исследованию, или нуклеотидную последовательность, синтезированную искусственным путем. Благодаря тому что нуклеотидная последовательность зонда специфически связывается с комплементарными последовательностями фрагмента, зафиксированного на фильтре, указанный фрагмент выявляется путем экспозиции с рентгеновской пленкой. Подобный процесс гибридизации может происходить между двумя любыми одинарными цепями НК (ДНК:ДНК, РНК:РНК, ДНК:РНК). Точность такого теста настолько велика, что с его помощью можно выявить

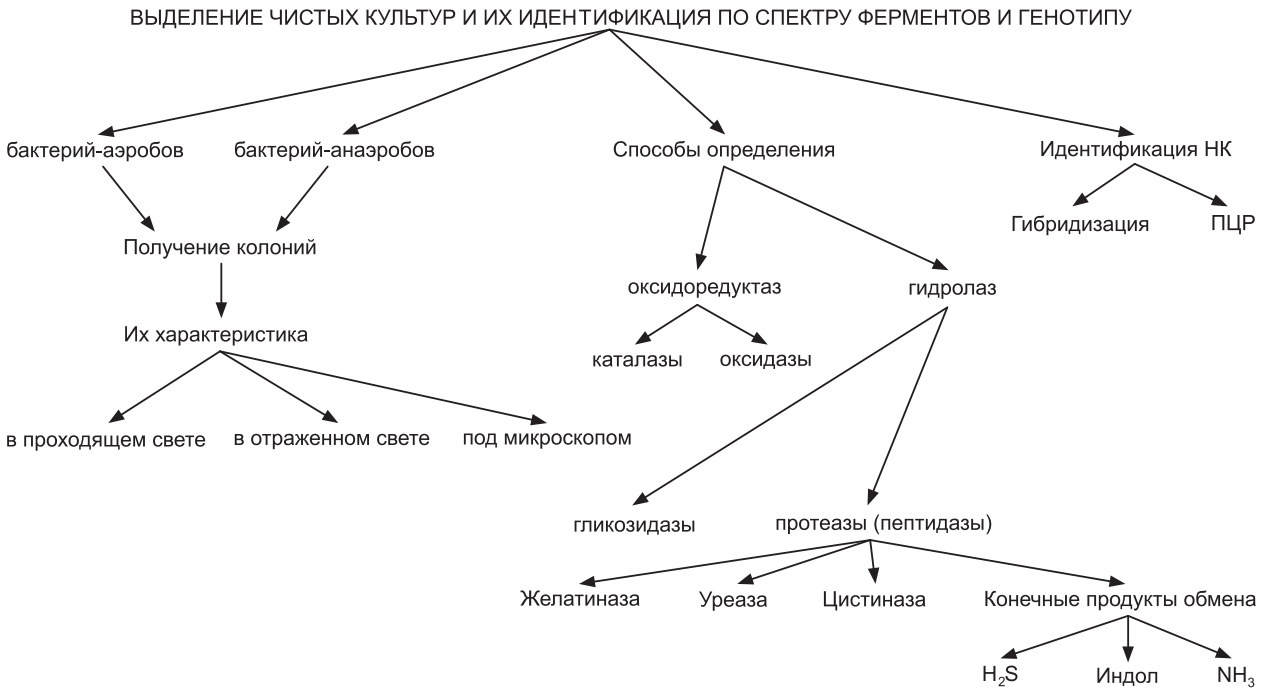
комплементарные ДНК-зонду нуклеотидные последовательности даже в тех случаях, когда концентрация их составляет всего лишь одну молекулу на клетку.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). При постановке ПЦР двунитчатая ДНК разделяется на отдельные цепочки термическим путем. Для ее запуска в среду вносят синтетические олигонуклеотиды-праймеры (затравки), состоящие из 10–20 нуклеотидов, способных взаимодействовать с окончаниями нуклеотидных последовательностей обеих цепочек. Процесс этот индуцируется термостабильной *taq*-полимеразой, полученной из бактерии *Thermus aquaticus*. Полученные ДНК снова разделяют на отдельные цепочки и всю процедуру наработки новых копий возобновляют, правда, без повторного введения *taq*-полимеразы, поскольку в ПЦР она не затрачивается и, будучи термоустойчивой, не разрушается. С помощью ПЦР из одной молекулы ДНК можно получить миллионы ее копий, идентификацию которых осуществляют методом электрофореза.

Фаготипаж, серотипаж и патогенность выделенной культуры, которыми завершается процесс ее идентификации, рассматриваются в гл.: «Фаги», «Инфекция» и «Иммунитет».

Особенности культивирования риккетсий

Риккетсии выращивают в культурах клеток и тканей (8–14 сут) или в полости желточного мешка куриного эмбриона (6–8 сут) при температуре 35–36 °С. Кроме этого, они культивируются в организме кровососущих (вши, клещи). Выделение и дифференциация патогенных для человека видов риккетсий производится путем подкожного, внутрибрюшинного и интрацеребрального заражения морских свинок или интраназального инфицирования белых мышей. Развиваясь в организме свинок, риккетсии вызывают образование вокруг капилляров узелковых гранулем, орхит у самцов (скротальный феномен), а у мышей – пневмонию. Работа с риккетсиями требует большой осторожности и выполняется в специальных лабораториях.


ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПО СПЕКТРУ ФЕРМЕНТОВ И ГЕНОТИПУ
бактерий-аэробов
бактерий-анаэробов
Способы определения
Идентификация НК
Гибридизация
ПЦР
Получение колоний
оксидоредуктаз
гидролаз
Их характеристика
каталазы
оксидазы
в проходящем свете
в отраженном свете
под микроскопом
гликозидазы
протеазы (пептидазы)
Желатиназа
Уреаза
Цистиназа
Конечные продукты обмена
H_2S
Индол
NH_3

Граф 27

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ

Паразитируя на генетическом уровне как молекулы НК, вирусы, лишенные энергообменных систем, не могут подобно бактериям размножаться на искусственных питательных средах. Процесс их репродукции (воспроизводства) всецело обусловлен метаболизмом ограниченного круга чувствительных организмов и клеток, которых в вирусологии называют *хозяевами* (см «Лабораторная диагностика вирусных инфекций человека и животных»). Детально репродукция вирусов изучена на культурах клеток.

Культуры клеток и способы их приготовления

Культура клеток – это выращенные *in vitro* на специальных средах клетки различных тканей животных и человека (в том числе лейкоциты), сохраняющие присущие им обмен и восприимчивость к определенным вирусам. Главное требование при работе с культурами клеток и вирусами – строгое соблюдение стерильности, которое достигается в асептических условиях вирусологического бокса.

Для выращивания клеток (тканей) применяют различные питательные среды (199 или Игла), содержащие полный набор необходимых им веществ (аминокислоты, пурины, пиримидины, углеводы, витамины и др.) с добавлением бычьей сыворотки.

Имеется много типов культур клеток: 1) первичные культуры, способные к 5–10-кратному пассированию; 2) неограниченно перевиваемые; 3) полуперевиваемые, представляющие собой морфологически однородные клетки легких и почек человека, сохраняющие в 50 пассажах диплоидный набор хромосом (рис. 37).

Все эти типы клеток выращивают при температуре 36–37 °С в ультратермостатах, получая в течение 5–7 сут хороший монослой в виде пласта, сцепленного со стенками матрацев, флаконов и пробирок. Контролируют рост клеток под малым увеличением микроскопа, начиная со 2–3 дня.

Первичные культуры клеток. Источником получения первичных культур клеток являются эмбриональные тка-

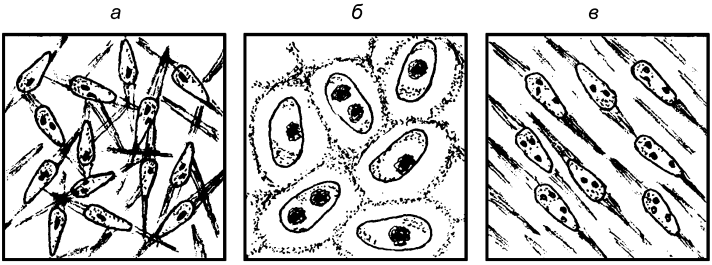


Рис. 37. Монослойные культуры клеток:
а – первичные типа фибробластов; *б* – перевиваемые типа HeLa; *в* – диплоидные клетки легких человека

ни птиц (главным образом куриные фибробласты), обладающие большой потенцией роста, экспериментальных животных, обезьян, но чаще всего их готовят из трипсинизированных тканей абортированных 8–14-недельных плодов человека (рис. 38) . Для этого ткань плода измельчают ножницами на мелкие кусочки размером 2–4 мм и

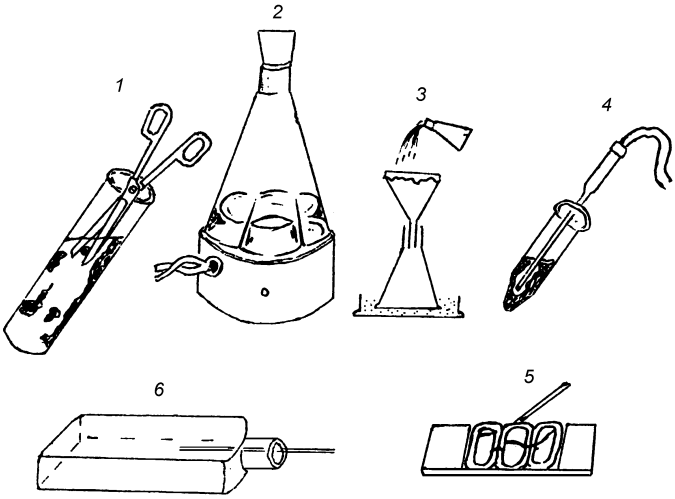


Рис. 38. Схема приготовления культуры клеток путем трипсинизации ткани:
1 – измельчение ткани; *2* – трипсинизация; *3* – фильтрование взвеси клеток; 4 – отсасывание раствора трипсина над осадком клеток; 5 – подсчет клеток в камере Горяева; 6 – посев клеток в матрацы

2–3 раза отмывают от крови буферным раствором Хенкса, пока жидкость не станет почти прозрачной. Затем для разрушения межклеточного вещества кусочки ткани заливают подогретым до 32–37 °С 0,25 %-ным раствором трипсина и в смесителе на электромагнитной мешалке перемешивают взвесь в течение 10–30 мин. Первую порцию трипсинизированных клеток удаляют. Подходящие для культивирования вирусов клетки получают после повторных трипсинизаций. Далее жидкость, содержащую клетки, для отделения крупных комочков ткани и соединительнотканных волокон фильтруют через марлю, центрифугируют при 800–1000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок отмывают раствором Хенкса и разводят средой 199, чтобы получить в 1 мл 100 000–400 000 клеток. Взвесь клеток разливают по 1 мл в пробирки или по 20–100 мл в стеклянные матрацы, плотно закрывают резиновыми пробками и помещают в термостат при температуре 37 °С. Матрацы располагают в горизонтальном положении, а пробирки под углом 5–10° в специальных лотках. Прикрепляясь к стеклу, клетки начинают пролиферировать и в течение недели образуют монослой.

Перевиваемые культуры клеток. Перевиваемые культуры клеток – это стабильные или, как их нередко называют, иммортализованные (бессмертные) линии клеток, автономно размножающиеся подобно бактериям. Получают их из нормальных тканей человека (амниона – FL, А-0, А-1; почек – Rh, ППЧ, диплоидных клеток); животных (почек обезьян – Vero, MS, BSC-1; почек кролика – ПК и его роговицы – SIRK) и злокачественных опухолей (шейки матки человека – HeLa, гортани человека – HEp-2, полости рта – КВ, костного мозга – Д-6 и др.), которые поддерживаются путем последовательных пассажей на питательных средах вот уже многие десятки лет.

Стадии и фазы репродукции вирусов

Репродукцией вирусов называют процесс размножения вирусных частиц в чувствительных к ним клетках. Репродуцируются в них не все вирусы, а только те, геном которых после инфицирования остается в цитоплазме и ядре в автономном состоянии. У интеграционных вирусов

способность к репродукции возникает после исключения (отщепления) их генома от генома клеток.

В цикле репродукции тех и других вирусов различают четыре стадии: 1) подготовительную, или инициальную, включающую фазы адсорбции вируса на клетке, проникновения и раздевания в клетке; 2) собственно репродуктивную стадию с фазами образования структурных белков и вирионных НК; 3) сборку вирионов; 4) заключительную, сопровождающуюся выходом зрелых вирусных частиц из клетки.

Подготовительная стадия репродукции. Взаимодействие вирусов с клетками определяется наличием у них биологического сродства (тропизма) и прежде всего специфических рецепторов. С них-то и начинается «узнавание» вирусом чувствительных клеток. Они находятся на поверхности наружной мембраны клеток в большом количестве, не менее 10^4–10^5. По химической структуре рецепторы разнородны – молекулы-белки, углеводные или липидные компоненты протеидов. В частности, рецепторами для пикорна- и аденовирусов являются протеины, а для миксовирусов – сиаловая кислота. Адсорбция этих и других вирусов на соответствующих им рецепторах осуществляется с помощью имеющихся у них прикрепительных белков. У простых вирусов прикрепительные белки содержатся в составе капсидов, у сложных – в суперкапсидах, например в шипах или в булавовидных утолщениях у коронавирусов.

Следующая за адсорбцией фаза проникновения вируса в цитоплазму клетки реализуется двумя способами – пассивным путем виропексиса или активным путем слияния (интеграции) вирусной оболочки с клеточной мембраной (рис. 39).

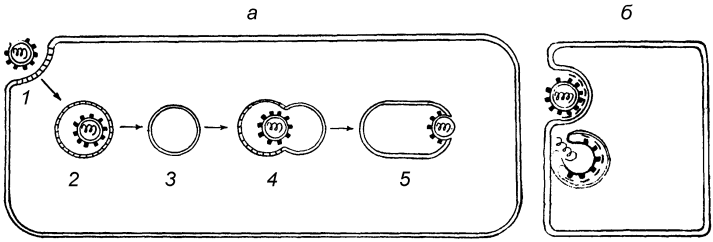


Рис. 39. Способы проникновения вирусов в клетку:
а – путем виропексиса (1 – адсорбция вируса на рецепторах; 2 – вирусная рецептосома; 3 – лизосома; 4 – рецептолизосома; 5 – выход вируса); *б* – путем слияния с оболочкой клетки

Виропексис (*pexis* – прикрепление) представляет собой своеобразную форму эндоцитоза (*endo* – внутри и *cytus* – клетка), при котором вирус проникает в клетку путем впячивания мембраны с образованием вокруг него вакуоли и поэтапным ее слиянием вначале с более крупной цитоплазматической вакуолью, а далее – с лизосомой или же с внутриклеточными мембранами, включая ядерную.

Второй, более редкий путь проникновения вирусов в клетку происходит посредством интеграции вирусных оболочек с наружной мембраной. Отмечается он лишь у тех видов, которые наделены белками слияния. Так же как прикрепительные, белки слияния у простых вирусов содержатся в капсидах, а у сложных – в суперкапсидах. Если исключить F-белок парамиксовирусов, то природа других белков слияния остается неизвестной. Кстати, F-белок вызывает образование многоядерных симпластов и синцитиев в однослойных культурах клеток.

Способность к репродукции вирусы приобретают только после освобождения их нуклеиновых кислот от оболочек, что принято называть фазой раздевания (депротеинизации). Осуществляется раздевание вирусов ферментами поверхностных плазматических мембран клеток-хозяев при слиянии с ними вирусных оболочек, а при виропексисе – ферментами лизосом, цитоплазматических и ядерных мембран.

Конечными продуктами раздевания у ряда вирусов являются, правда, не голые НК, а связанные с внутренним вирусным белком (пикорна-, аденовирусы), нуклеокапсидом (вирус гриппа) или сердцевиной (аденовирусы).

Собственно репродуктивная стадия. Истинно репродуктивная стадия, включающая фазы транскрипции, трансляции и репликации, которые у разных групп вирусов и семейств неодинаковы.

Так, *транскрипция*, или переписывание НК вирусов на иРНК, как первый ее этап, у ДНК-содержащих семейств папова-, адено- и герпесвирусов, репродукция которых происходит в ядре, осуществляется клеточной РНК-полимеразой, а у репродуцирующихся в цитоплазме иридо- и поксвирусов – вирусспецифической, попадающей в клетку вместе с их геномом. Таким же вирусспецифическим ферментом осуществляется акт транскрипции у РНК-содержащих вирусов с негативным геномом. В акте транскрипции для синтеза белка РНК-вирусы с позитив-

ным геномом не нуждаются. Исключение составляют ретровирусы, транскрипция у которых происходит на интегрированных с клеточным геномом вирионных ДНК-транскриптах с помощью клеточных РНК-полимераз (см. «НК вирусов и реализация генетической информации у них»).

Характерной особенностью транскрипции у плюс-нитевых РНК-вирусов является кодирование синтеза одной длинной иРНК, а у ДНК-вирусов – многих, но более коротких.

Второй этап реализации генетической информации вирусов – *трансляция*, в процессе которой синтезируется их белок, начинается с узнавания клеточными рибосомами вирусных иРНК, чему способствуют особые вирусспецифические инициаторные факторы. Переключение на избирательную трансляцию вирусных иРНК часто связано с вирусным механизмом подавления трансляции иРНК клеток-хозяев.

В процессе трансляции у вирусов, кодирующих синтез одной длинной иРНК, синтезируется гигантский полипептид-предшественник, впоследствии нарезающийся на несколько различных белков, а у вирусов, кодирующих короткие иРНК, – соответствующее им число полностью созревших белков. Интересно, что синтез внутренних структурных белков вирусов происходит в клетках на свободных полирибосомах, а синтез гликопротеидов – на полирибосомах, связанных с мембранами. При этом образующиеся вирусные белки часто подвергаются посттрансляционным модификациям, например гликолизированию, ацилированию, метилированию, фосфорилированию.

Репликация ДНК-содержащих вирусов, или копирование их генома, представленного линейной двухцепочечной структурой, сходна с репликацией ДНК клеток и осуществляется их ДНК-полимеразами. Другими словами, синтез гомологичных НК происходит на обеих расплетенных цепях, в результате чего каждый вновь образующийся вирион получает ДНК, состоящую из старой цепи и ее новой копии. Здесь следует, правда, подчеркнуть, что раскручиванию кольцевых двухцепочечных ДНК предшествует разрезание одной из ее нитей, а репликация однонитчатых ДНК-содержащих парвовирусов происходит после синтеза второй цепи ДНК и образования промежуточных двухцепочечных форм.

Репликация вирусных РНК тоже происходит не на родительских, а на промежуточных комплементарных нитях, т. е. образованию новых геномных предшествует синтез их двойников. При этом синтез вирионных нитей РНК, так же как иРНК, осуществляют не клеточные, а вирусспецифические РНК-полимеразы или, точнее, репликазы, являющиеся, скорее всего, модифицированными транскриптазами. Процесс репликации комплементарных нитей РНК у минус-нитевых вирусов хотя и очень сходен с процессом синтеза иРНК при транскрипции, но не аналогичен. В отличие от относительно коротких иРНК, комплементарных отдельным участкам генома, комплементарно-репликативные РНК считываются с полного генома и, по существу, являются *антигеномом*. Следовательно, в инфицированных вирусами клетках существует механизм переключения частичного считывания генома (транскрипции) на сквозное (репликацию).

Вновь синтезированная при сквозном считывании антигенома геномная РНК может служить матрицей для синтеза ее новых копий или иРНК, т. е. войти в состав вириона или функционировать как иРНК.

То или иное использование геномных молекул НК вирусов регулируется временными механизмами реагирования между вирусными компонентами, которые, как вытекает из вышеприведенного, синтезируются неодновременно и в разных местах клеток. Такой способ репродукции называется *дизъюнктивным* (разобщенным). Так, у вируса гриппа РНК синтезируются в ядре клеток, а оболочечный V-антиген (*viral* – вирусный) и S-антиген (*solution* – растворимый), связанный с нуклеопротеидом, образуются в цитоплазме. Более того, синтез вирусспецифических молекул внутри ядра и цитоплазмы тоже может быть разобщен. У плюс-нитевых РНК-вирусов синтез белка и геномной РНК не отделены во времени и следуют друг за другом без значительных интервалов. У ДНК-вирусов и минус-нитевых РНК-вирусов синтез белка по сравнению с синтезом геномных НК запаздывает на время, которое необходимо для образования иРНК.

Сборка вирионов. Сборка вирусных компонентов в корпускулярную частицу – сложный и до конца не выясненный процесс. Хорошо известно лишь то, что при формировании простых вирусов в его основе лежит самопроизволь-

ный белок-нуклеиновый механизм взаимосвязи. У сложноустроенных вирусов сборка происходит поэтапно и во многом зависит от того, где происходит их репликация – в цитоплазме или ядре.

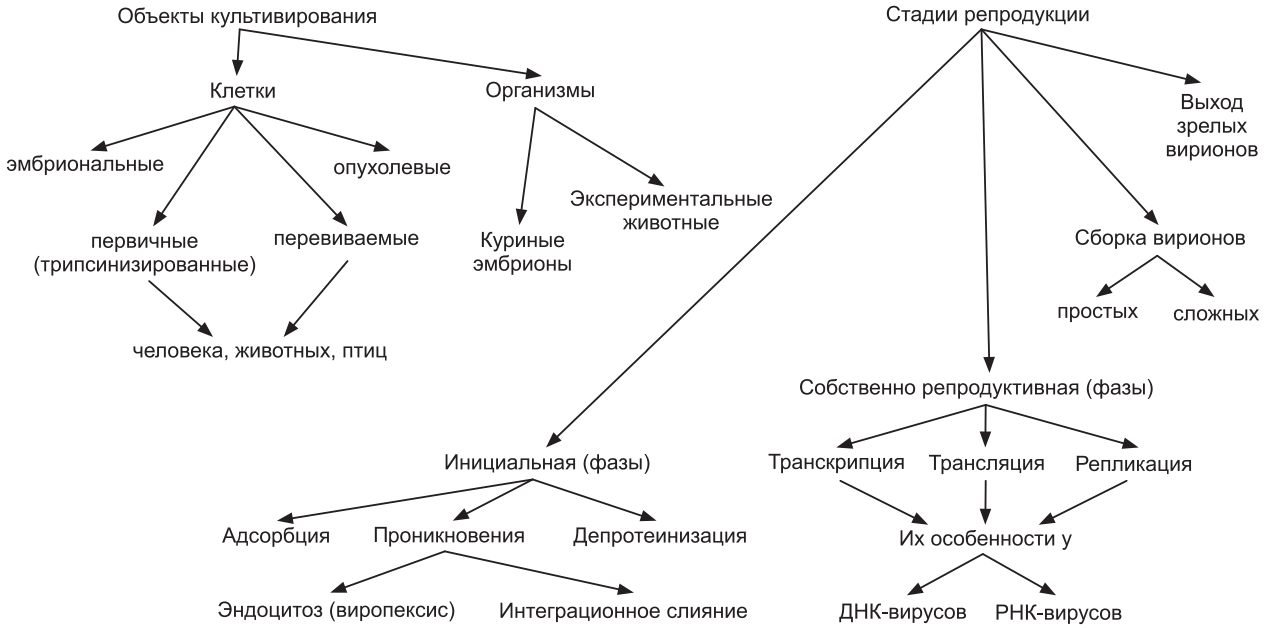
Начинается она всегда с формирования нуклеокапсидов (сердцевин) и синтеза суперкапсидных белков. При этом образование первых происходит в специальных структурах клеток, или «фабриках», индуцированных вирусами, а вторых – в полирибосомах, связанных с внутриклеточными мембранами. Затем нуклеокапсиды, глико- и липопротеиды суперкапсидов РНК-вирусов мигрируют в места их сборки, которыми обычно являются мембраны эндоплазматических сетей, а чаще – поверхностные мембраны клеток. Связывание нуклеокапсидов с суперкапсидными субъединицами может происходить без или с участием матриксных мембранных М-белков вирионов, способных к белок-белковым и белок-липидным взаимодействиям.

Процесс сборки ДНК-содержащих вирусов еще сложнее. Начинаясь с формирования сердцевин или нуклеокапсидов, протекает через образование неполных форм вирионов с разным содержанием ДНК в капсидах и незрелых вирионов с полностью ненарезанными в них предшественниками полипептидов, свойственных зрелым формам вирионов.

При окончательном формировании зрелых вирионов в их внешние оболочки часто включаются липиды, углеводы, белки и даже ферментные системы клеток-хозяев. Например, вирус герпеса формируется в ядре клеток в виде «голых частиц», лишенных обычных для него оболочек. Первую, являющуюся дериватом ядерной мембраны, он приобретает, отпочковываясь от нее в перинуклеарное пространство, а вторую, в которой тоже есть немало клеточных веществ, – созревая в мембранах эндоплазматической сети, в аппарате Гольджи и клеточной мембране при выходе наружу, часто включая в состав второй оболочки клеточную АТФ-азу.

Участие клеточных структур хорошо изучено также при формировании миксовирусов, тогавирусов и некоторых других. Самый сложный процесс созревания – у поксвирусов, в частности вириона натуральной оспы.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ



Граф 28

Заключительная стадия репликации. Конечным этапом репликации вирусов является выход сформированных вирионов из инфицированных клеток. При этом возможны два пути их освобождения: 1) отпочковывание от клеток, присущее сложным вирусам, имеющим липопротеидную оболочку; 2) разрушение клеток, что в основном вызывают безоболочечные простые пикорна-, рео-, парво-, папова- и аденовирусы (рис. 40).

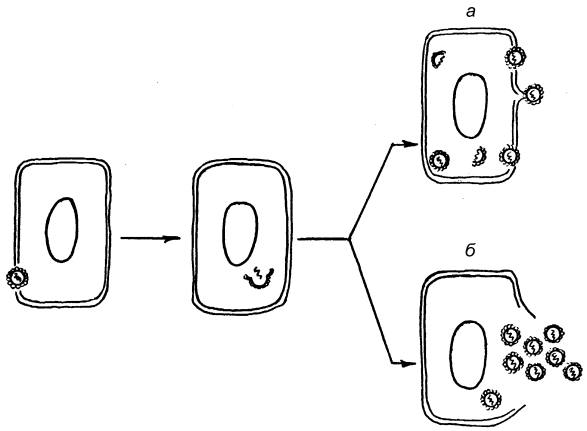


Рис. 40. Следствие взаимодействия вирусов с клетками-хозяевами: *а* – продуктивная инфекция с отпочковыванием вирионов; *б* – продуктивная инфекция с разрушением клеток

ФАГИ (БАКТЕРИОФАГИ)

Фаги (*phagos* – пожирающий) – это вирусы-паразиты про- и эукариот.

История открытия. Учение о фагах связано с именем канадского ученого Ф. д'Эрелля, который в 1917 г. установил наличие в испражнениях больных дизентерией ультрамикроскопического агента, лизирующего шигелл, назвал его бактериофагом и предположил, что невидимый в световом микроскопе дизентерийный бактериофаг, накапливаясь в организме больных, благоприятствует их выздоровлению. Для доказательства этого в 1920 г. во время эпидемии холеры в Индокитае он с целью профилакти-

ки заболевания использовал высококонцентрированные бульонные фильтраты холерного бактериофага. Бактериофагопрофилактика и лечение бактериофагом инфекционных болезней не оправдали радужных надежд, так как не была учтена ставшая теперь известной типо- и штаммоспецифичность бактериофагов, а также их чрезвычайно большая изменчивость.

Начатые д'Эреллем работы уже в первые десятилетия привели к открытию всех других вирусов, лизирующих бактерии, микоплазмы, грибы и сине-зеленые водоросли (цианобактерии), которые стали называть одним термином – фаги. Углубленное исследование взаимодействия фагов с бактериями в 50–60-е гг. XX в. завершилось открытием умеренных трансдуцирующих фагов, используемых в генной инженерии (А. М. Львов, Ф. Жакоб, Ж. Моно), и составлением генетических карт вирусов (М. Дельбрюк, А. Херши, С. Лурия).

Классификация, форма и строение фагов

Фаги, как и вирусы позвоночных, беспозвоночных и растений, по содержанию НК подразделяются на *ДНК- и РНК-содержащие*, а по характеру взаимодействия с бактериями – на *вирулентные* и *умеренные* с полноценным и дефектным геномами.

Различают *простые* и *сложные фаги* (рис. 41). Простые имеют форму шестигранников (колифаги MS-2, f 2, ϕX174) или нитей (фаги f1, fd), а сложные (колифаги группы T1 – T7) – сперматозоидную.

У лучше всего изученного сложного вирулентного фага T2 (рис. 42) различают следующие структуры: шестигран-

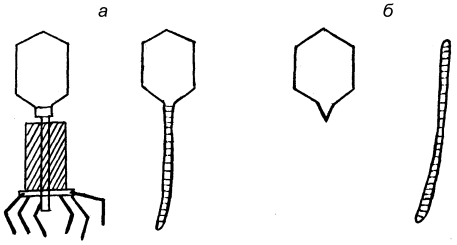


Рис. 41. Основные формы бактериофагов:
а – сложные фаги; *б* – простые фаги

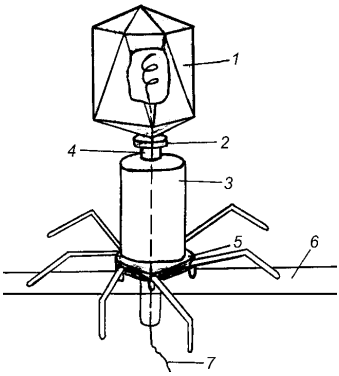


Рис. 42. Схематическое изображение фага Т2:
1 – головка; *2* – воротничок; *3* – чехол; *4* – полый стержень; *5* – базальная пластинка с нитями; *6* – оболочка бактерии; *7* – ДНК

ную головку; воротничок; отросток, состоящий из полого стержня, снаружи покрытого сократительным чехлом; шестиугольную базальную пластинку с отходящими от каждого угла нитями. Диаметр головки в среднем составляет 50 нм, а величина отростка – 100–200 × × 10–15 нм.

Свойства фагов

Химический состав. По химическому составу ДНК фагов отличается от ДНК вирусов животных и растений тем, что содержит оксиметилцитозин. Сперматозоидной формы фаги состоят из 40–50 % спирально скрученной двухцепочечной ДНК, находящейся в полости головки фага, и 50–60 % белка, из которого построены оболочка головки и отросток фага. Капсомеры фага в головке располагаются по кубическому, а в отростке – по спиральному типу симметрии. В концевой части отростка находится небольшое количество липидов в виде нейтральных жиров и фермент типа лизоцима.

Простые по строению головчатые и нитевидные фаги содержат одноцепочечную кольцевую ДНК, в которой находится по одному остатку метилцитозина (ϕX174, f1 и fd), или одноцепочечную линейную РНК (MS-2 и f2).

Резистентность. Устойчивость фагов к факторам окружающей среды достаточно велика. Они выдерживают нагревание до 75 °С, не обезвреживаются в малых концентрациях дезинфицирующих веществ, резистентны к антибиотикам, хлороформу и ферментным ядам, что широко используется при выделении фагов из бактериальных популяций, весьма чувствительных ко всем трем микро-

боцидным веществам. Фаги быстро разрушаются в желудочном соке, а также при воздействии ультрафиолетовых лучей и ионизирующих излучений. В организме человека сохраняются в течение 7–13 дней, поэтому при проведении профилактических мероприятий в очагах кишечных инфекций контактным (инфицированным) лицам требуется повторное назначение фагов.

Антигенность и специфичность фагов. Белки фагов – хорошие антигены и при парентеральном введении вызывают выработку антител. По антигенной структуре фаги подразделяются на серогруппы и серовары.

Обычно фаги отличаются типоспецифичностью, т. е. лизируют только определенные серовары данного вида. Видоспецифические фаги (монофаги) разрушают все штаммы вида, но на разных особях популяции размножаются неодинаково интенсивно. Полифаги, способные лизировать родственные бактерии, встречаются редко.

Фазы взаимодействия вирулентных фагов с бактериями

Вирулентными называют фаги, взаимодействие которых с чувствительными к ним бактериями сопровождается накоплением новых фаговых корпускул (продуктивной инфекцией), а заканчивается – бактериолизисом. Размножаясь в бульонных культурах, вирулентные фаги вызывают просветление помутневшей среды, а на агаровых газонах бактерий формируют бляшки, или негативные пятна. Подобно колониям бактерий, морфология бляшек специфична для фагов. В частности, вирулентные фаги образуют прозрачные бляшки округлой формы диаметром 1 мм (рис. 43). Типичными представителями вирулентных фагов являются колифаги Т-группы.

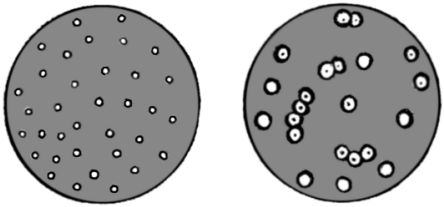


Рис. 43. Бляшки фагов в газоне культуры бактерий на агаровом геле

Различают несколько фаз взаимодействия колифагов с эшерихиями: фазу прикрепления и их проникновения в цитоплазму бактерий; эклипс-фазу, или фазу затмения; фазы синтеза ранних ферментов и компонентов фага; сборки и выхода фагов (рис. 44).

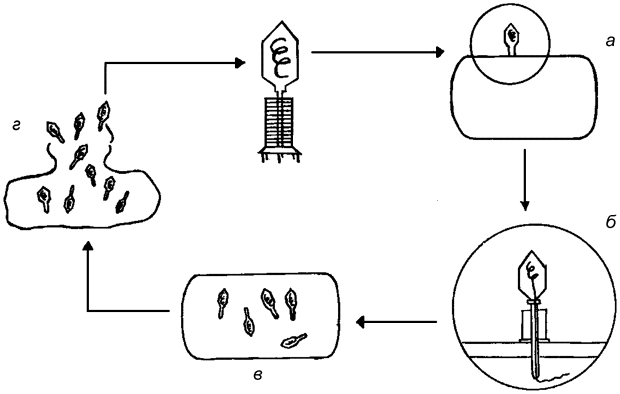


Рис. 44. Основные этапы взаимодействия вирулентного фага с бактериальной клеткой:
а – адсорбция фага; *б* – введение ДНК; *в* – размножение фагов; *г* – выход фагов

При эффективном взаимодействии фаги эшерихий адсорбируются на липопротеидных (Т-2, Т-6) или липополисахаридных (Т-3, Т-4, Т-7) рецепторах, а простые по строению фаги, как правило, лизирующие только мужские особи бактерий, – на пилях. При этом на рецепторах и пилях могут адсорбироваться десятки фаговых частиц, однако продуктивную инфекцию чаще всего вызывает лишь одна из них, а точнее – ее НК.

Распознаются рецепторы нитями базальной пластинки Т-четного колифага. Вслед за этим под влиянием выделяемого фагом лизоцима в клеточной стенке эшерихий образуется отверстие, через которое посредством сокращения оболочки головки и чехла вталкивается кончик стержня, и из него в цитоплазму бактерии проникает ДНК с несколькими молекулами небольших пептидов и белков, предохраняющих ее от бактериальных эндонуклеаз (рестриктаз).

Фаги, прикрепляющиеся к пилям бактерий, вводят свою НК через их канал; возможно, он используется как всасывающий механизм для целых вирионов.

После введения в клетку фаговой ДНК следует эклипс-фаза, в которой обнаружить фаг невозможно. В этой фазе происходит синтез эндонуклеаз, разрушающих ДНК клетки-хозяина, образование ферментов, катализирующих биосинтез промежуточных продуктов ДНК фагов и ферментов репликации, которые совместно с клеточной ДНК-полимеразой обеспечивают репликацию фагового генома, полностью прекращая синтез каких бы то ни было клеточных веществ. При этом, если ДНК бактерий не хватает, фаговая ДНК синтезируется из компонентов среды. Бактериальный белок для синтеза капсида фага почти не используется, и аминокислоты для него извлекаются только из среды. Процессы синтеза ДНК и белка фага в общем идут параллельно и независимо друг от друга. На последнем этапе взаимодействия фага с бактерией происходит самосборка фаговых частиц. Состоит она из нескольких этапов. Вначале собирается базальная пластинка; на ней, как на затравке, происходит сборка стержня, а вокруг него – чехла; далее формируется головка; на последнем этапе сборки фага к его базальной пластинке присоединяются шесть независимо синтезированных нитей.

Хуже изучен процесс репродукции РНК-содержащих колифагов. Геном их служит матрицей как для вирионной, так и для информационной РНК. Репликация этих фагов осуществляется с помощью особых ферментных механизмов, отсутствующих у бактерий.

Следствие взаимодействия вирулентного фага с бактерией. Выход фага в окружающую среду сопровождается лизисом бактерий под влиянием накопившегося в ней фагового лизоцима. Исключение составляют нитевидные фаги, не вызывающие лизиса клеток, размножающиеся в них в течение длительного времени и выходящие через клеточную оболочку. Полный цикл развития фага, или латентный период, продолжается у колифагов 15–60 мин (у Т-четных – около 30), в течение которых образуется в среднем 100–200 фаговых частиц (у MS-2 и f2 – 20 000).

Умеренные фаги

Наряду с вирулентными в природе имеются *умеренные фаги*, взаимодействие которых с бактериями проявляется в двух формах: одни штаммы или клетки популяции опре-

деленного вида бактерий они разрушают, образуя на их газонах мутные бляшки, в другие проникают, но гибели не вызывают. В последнем случае ДНК умеренного фага образует кольцо и с помощью репрессоров, кодируемых вирусным геномом, прерывается ее способность к автономной репликации, что заканчивается интеграцией с геномом бактерии. В дальнейшем генетический материал фага воспроизводится вместе с бактериальным геномом при делении клетки.

Умеренный фаг, наследственные детерминанты которого объединились с бактериальными, называется *профагом*; бактерии, содержащие профаг, – *лизогенными*, а само явление – *лизогенией*. Связь профага с бактерией очень прочная и в естественных условиях нарушается с частотой 10^{-2}–10^{-5} (спонтанная продукция фага).

Частоту исключения профага из бактериальной хромосомы можно увеличить, воздействуя на лизогенные бактерии ультрафиолетовыми лучами, ионизирующей радиацией и химическими мутагенами (индукция лизогенных бактерий). Нами доказано индуцирующее действие магнитных полей на лизогенные системы. При исключении профаг переходит в вегетативную (размножающуюся) форму и лизирует клетку. Выделившиеся фаговые частицы не способны к репродукции в лизогенных по тому же фагу бактериях, но могут вызывать лизис нелизогенных или лизогенных по другим фагам родственных клеток. Изредка лизогенные бактерии утрачивают фаг без перехода его в вегетативную форму. Иногда в состоянии лизогенности у бактерий появляются новые признаки и свойства, кодируемые геномом фага. Так, в результате лизогенизации у некоторых бактерий изменяются форма и цвет колоний, нетоксигенные штаммы коринебактерий дифтерии превращаются в токсигенные, а у сальмонелл появляются новые антигенные детерминанты. Изменчивость, формирующаяся под влиянием профага, получила название *фаговой конверсии*. При индукции лизогенных бактерий в профаг нередко включаются гены бактерий, но чаще они замещают некоторую часть того участка ДНК, которая остается в геноме бактериальной клетки. Утратившие часть своего генома умеренные фаги становятся дефектными и, будучи неспособными к образованию зрелых частиц, осуществляют трансдукцию (см. рис. 50).

Происхождение и распространение фагов

Вопрос о происхождении фагов не решен. Одни исследователи считают, что фаги – экзогенные агенты, другие полагают, что они имеют эндогенное происхождение, продуцируются бактериями и являются своеобразной формой их развития.

Фаги обнаруживаются во всех объектах окружающей среды, в которых обитают бактерии, грибы, микоплазмы. Они найдены в воде, почве, молоке, в различных выделениях человека и животных.

В природных биоценозах фаги определяют внутри- и межвидовое микробное равновесие; являются индикаторами загрязнения водоемов бытовыми, сельскохозяйственными и промышленными стоками; косвенным показателем инфицирования животных и человека; движущей силой образования новых вариантов и разновидностей бактерий; лизируя или угнетая патогенные микроорганизмы, они обеспечивают естественный антимикробный иммунитет у человека и выздоровление от бактериальных инфекций.

Изменчивость фагов. Являясь фактором изменчивости микробов, фаги сами могут изменяться под влиянием мутагенов или в процессе генетических рекомбинаций. Частота появления мутантов в фаговом потомстве варьирует в широких пределах. Некоторые из них образуются с частотой не ниже 10^{-9}, тогда как другие возникают с частотой 10^{-3} и выше.

Известно несколько видов мутации фагов. Самые распространенные – мутации бляшек. По этому признаку различают крупные, карликовые, звездчатые, мутные бляшки. Фаги могут отщеплять мутанты, способные к размножению на бактериальных штаммах, которые устойчивы к исходному типу фага. Такой тип мутаций получил название мутаций в отношении диапазона действия. Известны мутации по кофакторам адсорбции, устойчивости к ультрафиолетовым лучам, температуре, профлавину, вирулентности и пр. У покоящихся фаговых частиц частота спонтанных мутаций очень низка, но их можно индуцировать рентгеновскими или ультрафиолетовыми лучами, азотистой кислотой, гидрооксиламином или алкилирующими веществами. Изменчивость фагов может также возникать

при заражении бактерий двумя родственными фагами, в результате чего в потомстве фагов обнаруживаются рекомбинанты, или частицы со свойствами обоих вирионов, как следствие их генетического скрещивания. В одной бактерии может размножаться до двух десятков различных фаговых частиц. Такое множественное заражение бактериальных клеток не влияет ни на длительность латентного периода, ни на выход фага. Но если фаги не родственны, то из-за несовместимости каких-то биохимических этапов развития взаимно блокируют продуктивную инфекцию, что называют *феноменом взаимного исключения*.

Получение и практическое применение фагов в биологии и медицине

Фаги получают путем фильтрации лизированных ими бульонных культур бактерий через бактериологические свечи Шамберлана и фильтры Зейтца. Готовый препарат фага представляет собой прозрачную желтоватую жидкость. В целях повышения стабильности фильтрат фаголизатов таблетируют и покрывают кислотоустойчивой оболочкой из ацетилцеллюлозы.

Узкоспецифический спектр действия фагов на микробы ограничивает возможность их применения в медицине как этиотропных препаратов. Для лечения в основном применяют стафилококковый, стрептококковый фаги и колифаг. Они представляют собой фильтраты фаголизатов соответствующих бактерий. Выпускают их в запаянных ампулах или флаконах. Эти препараты назначают при нагноительных процессах, вызванных фагочувствительными штаммами стафилококка, стрептококка, кишечной палочки, орошая ими инфицированную рану или обкалывая очаг воспаления.

В целях профилактики фагирование в настоящее время проводят только в эпидемических очагах брюшного тифа и дизентерии. Взрослые люди, находившиеся в контакте с больными, принимают указанные бактериофаги внутрь за 1,5–2 ч до еды по 1–2 таблетки (в дизентерийном очаге 2–3 раза с интервалом 3 дня).

Низкая эффективность фаготерапии и фагопрофилактики с лихвой компенсируется широким использованием фагов для идентификации и внутривидовой дифференци-

ации бактерий, при диагностике инфекционных болезней и эпидемиологическом обследовании очагов дизентерии, сальмонеллезов, дифтерии, стафилококковых и других инфекций, где с их помощью удается выявить источники и пути передачи заразного начала. Для иллюстрации этого приводим способы выявления фагов, методики индукции лизогенных бактерий, фаготипирования и определение их активности.

Выделение вирулентного фага. Для выделения фага исследуемый жидкий материал центрифугируют. Надосадочную жидкость в количестве 1 мл переносят в 30 мл мясопептонного бульона (МПБ), засеянного 1 мл 6–18-часовой культуры соответствующего микроорганизма. Посев помещают в термостат при температуре 37 °С на сутки, после чего пропускают через фильтр Зейтца, фильтрат разводят 1:10, 1:100, 1:1000 и прибавляют по 0,05 мл культуры. Контролем служит бульонная культура без фильтрата. Через 18–20 ч пробирки извлекают из термостата и учитывают результат. О наличии фага судят по просветлению среды (в контроле отмечается нормальный рост бактерий).

Индукция лизогенных бактерий ультрафиолетовыми лучами. Свежевыросшую 8-часовую культуру бактерий разводят 1:20–1:30 вероналовым буфером и по 5 мл разливают в две чашки Петри. Одну из них (опытную) открывают и в течение 30–180 с облучают под бактерицидной лампой БУВ, а вторую (контрольную) – выдерживают в зоне действия УФ-лучей закрытой. Затем обе взвеси бактерий (3–3,5 мл) засевают в две пробирки с 5 мл соответствующей питательной среды и после нескольких часов инкубации в термостате в облученном посеве обнаруживают литический эффект действия вегетативных фагов.

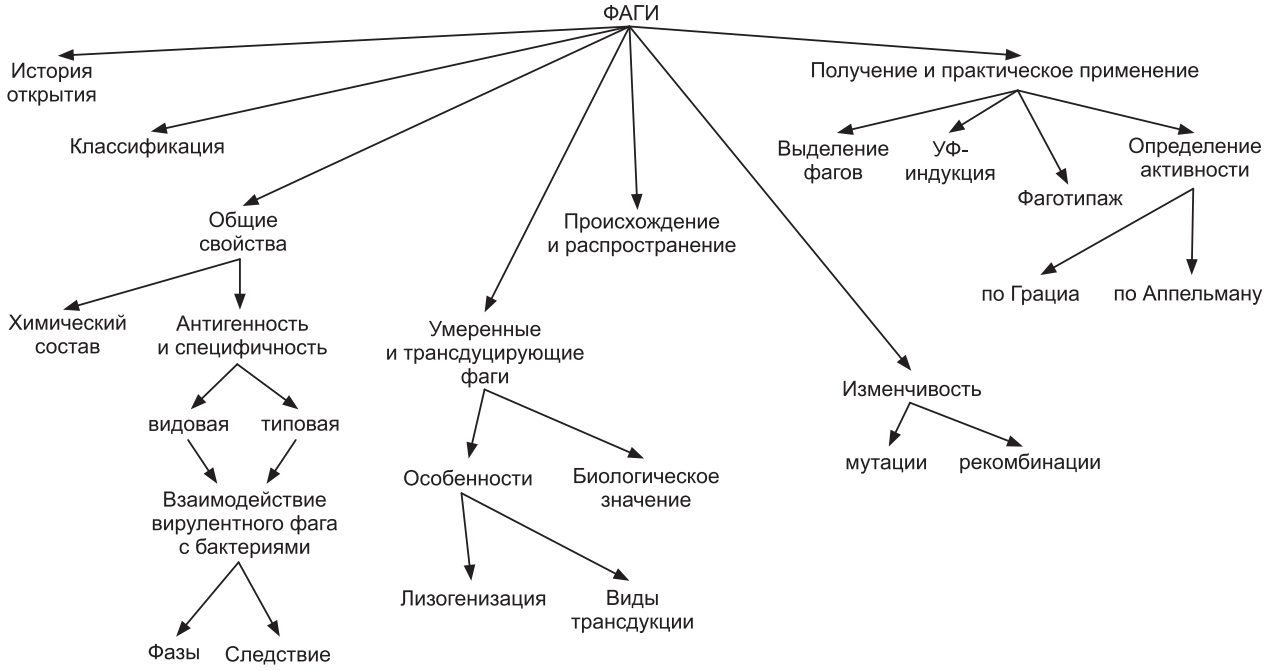
Типирование стафилококков набором 23 эталонных фагов. Суточную культуру золотистого стафилококка 209 Р высевают в 2,5 мл бульона Хоттингера, выращивают в течение 3–4 ч и засевают газоном на свежеприготовленный и подсушенный питательный агар в чашках Петри. Дно засеянной чашки расчерчивают карандашом на 23 квадрата и в каждый из них стандартной бактериальной петлей или тонко оттянутой пастеровской пипеткой наносят каплю соответствующего фага. После всасывания фагов чашку Петри переворачивают крышкой вниз и помещают

на 5–6 ч в термостат при 37 °С или оставляют на 1 сут при комнатной температуре. Степень литического действия фага на культуру стафилококка обозначают плюсами – от «±» до «++++».

Выявление и подсчет фагов методом агаровых слоев по Грациа. Для постановки этого опыта необходимо иметь тщательно высушенный стерильный пластинчатый мясопептонный агар (МПА) как подложку. С этой целью чашки Петри с 20–25 мл 1,5 %-ного МПА, покрытые стерильной бумагой, выдерживают под бактерицидной лампой в течение нескольких часов, затем закрывают крышками и оставляют до следующего дня при комнатной температуре. Для выделения фага 1 мл испытуемого фильтрата, разведенного бульоном 1:10, 1:100, 1:1000, и 0,1 мл фагочувствительной культуры бактерий поочередно вносят в пробирку с 2,5 мл расплавленного 0,7 %-ного агара и, хорошо смешав ее содержимое, выливают в чашки Петри на поверхность подготовленного 1,5 %-ного агара. После равномерного распределения смеси для уплотнения полужидкого агара чашки Петри оставляют на 30 мин при комнатной температуре, а затем на сутки помещают в термостат при 37 °С. При небольшом количестве корпускул фага в бактериальном газоне обнаруживаются отдельные негативные колонии, при большой концентрации фага – диффузный или даже сплошной лизис культуры.

Титр фага выражают максимальным разведением, в котором проявляется его литическое действие. Более точные данные об активности фага получают, определив количество активных фаговых корпускул в единице объема. Для этого разные разведения фага засевают в две параллельные чашки Петри и после 18 ч пребывания их в термостате подсчитывают количество негативных колоний, умножая на разведение. Например, при исследовании по методу Грациа на чашках, в которые вносили 1 мл фага в разведении 10^{-7}, было обнаружено 25 колоний. Следовательно, титр фага (количество корпускул в 1 мл) равен $25 \cdot 10^7$, или $2{,}5 \cdot 10^8$.

Определение активности фага по методу Аппельмана. Активность фага определяют в МПБ. Для этого берут ряд пробирок, содержащих по 4,5 мл бульона. В первую вносят 0,5 мл испытуемого фага, смешивают его со средой и другой пипеткой переносят 0,5 мл в следующую пробирку


ФАГИ
История открытия
Классификация
Общие свойства
Химический состав
Антигенность и специфичность
видовая
типовая
Взаимодействие вирулентного фага с бактериями
Фазы
Следствие
Происхождение и распространение
Умеренные и трансдуцирующие фаги
Особенности
Биологическое значение
Лизогенизация
Виды трансдукции
Изменчивость
мутации
рекомбинации
Получение и практическое применение
Выделение фагов
УФ-индукция
Фаготипаж
Определение активности
по Грациа
по Аппельману

Граф 29

и т. д. Таким образом фаг последовательно разводят от 10^{-1} до 10^{-9} и выше. В каждое разведение фага вносят по 0,05 мл 18-часовой бульонной культуры соответствующего вида бактерий. Две пробирки с МПБ должны составлять контроль: одну засевают культурой бактерий (контроль за наличием в ней фага), во вторую наливают фаг (контроль за его стерильностью). Учет результатов проводят после 18–24 ч пребывания пробирок в термостате. Титр фага определяют наибольшим разведением, в котором наблюдается полный лизис бактерий (табл. 1).

Таблица 1. **Схема титрования фага по Аппельману**

Ингредиенты, мл	Номер пробирки						Контроль	
	1	2	3	4	5	6–10	фага	культуры
							11	12
МПБ	4,5 →	4,5 →	4,5 →	4,5 →	4,5 →	4,5 ↓	4,5	4,5
Исследуемый фаг	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Изотонический раствор натрия хлорида								0,5
Бульонная культура бактерий	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	–	0,05
Учет результатов	–	–	–	–	–	+	–	+

Примечание. «+» – наличие роста; «–» – отсутствие роста бактерий.

ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Введение в генетику микроорганизмов

Общие понятия. Генетика (*geneticos* – относящийся к воспроизведению) микроорганизмов как наука берет свое начало от описания отдельных видов бактерий, простейших и грибов во второй половине XIX в. Ее развитие на первоначальном этапе было всецело связано с вопросом о существовании у микробов естественно-исторических видов. В то время существовало два противоположных взгляда на данный вопрос. Плеоморфисты (К. Негели, Г. Бухнер) считали, что микробы безгранично изменчивы и могут принимать различную форму (плеоморфны), прев-

ращаясь, например, из палочки в кокк или спирохету, вызывая в одних случаях брожение, в других – гниение, в третьих – инфекционное заболевание (дифтерию, тиф или иную лихорадочную болезнь). Сторонники другого течения, мономорфисты (Ф. Кон, Р. Кох), утверждали, что микроорганизмы обладают неизменной формой и специфической функцией, стабильными признаками и свойствами. Победу одержали мономорфисты, и вслед за этим был разработан метод научной классификации микроорганизмов на основе описания морфологических, культуральных, биохимических свойств, антигенной структуры, патогенности и резистентности самых различных видов про- и эукариот.

Однако вскоре выяснилось, что почти все эти видовые признаки подвержены изменчивости, и уже в начале XX в. наступил период пересмотра догмы мономорфистов и накопления материала по изменчивости микробов под влиянием разнообразных факторов окружающей среды.

Систематизировав сведения о внутривидовой изменчивости микробов, начиная с 50-х гг. XX в., генетика микроорганизмов на третьем этапе своего развития изучает закономерности их наследственности и изменчивости.

Наследственность – способность при размножении (вегетативном и половом) передавать потомству те же или сходные признаки и свойства, которые закодированы в генетическом материале микроорганизма и определяются его генотипом. Генотип – это совокупность самовоспроизводящихся структур (генетических детерминант, генов), которыми обладает клетка. Различают истинный генотип и плазмотип.

Истинный генотип – сумма генов, имеющихся в хромосоме. Бактериальная хромосома (нуклеоид) состоит из той же ДНК, которая имеется в клетках высших организмов, однако она замкнута в кольцо. Из этого правила есть исключение. Так, у бруцеллы козье-овечьего вида (*Brucella melitensis*) имеются две кольцевые хромосомы, а у некоторых стрептомицетов хромосома представлена в виде линейной структуры.

У бактерий, микоплазм, риккетсий и хламидий генетический материал представлен одним набором генов, и так как они гаплоидны, то, следовательно, у всех прокариот отсутствует явление доминантности, что способству-

ет быстрому выявлению у них мутированных генов. Функция хромосомы – передача жизненно важных свойств клеток в ряду поколений.

Плазмотип – совокупность внехромосомных генов (плазмид). Функция плазмотипа – передача нежизненно важных свойств, обладая которыми микроб может получать определенные преимущества. Ген (по С. Бензеру, цистрон) – это самовоспроизводящаяся единица наследственности, обладающая элементарной биохимической функцией. Как структурная единица наследственности ген представляет собой часть молекулы ДНК, которая состоит из сотен и даже тысяч пар нуклеотидов. Как функциональная единица наследственности ген детерминирует формирование белка, фермента, антитела, гормона, витамина, всякого признака и свойства клетки (организма), в том числе способность к модификации, мутации, рекомбинации. Наиболее точное понимание гена как функциональной единицы должно основываться на том допущении, что один ген детерминирует одно семейство родственных полипептидов. В зависимости от того, какое свойство, признак или процесс детерминируют гены, они получают соответствующее название. Так, различают структурные и функциональные гены. Первые детерминируют образование ферментов (полипептидов), вторые – регулируют функционирование структурных генов. В понятия *ген-мутатор* и *ген-супрессор* вкладывают смысл индукции и исправления мутаций, а под *rec-генами* понимают систему генов, обусловливающих рекомбинационные процессы. В связи с тем что гены обладают плейотропностью и, следовательно, модифицируют экспрессию других, введено понятие о генах-модификаторах.

Наличие тех или иных генов можно выявить, установив их мутацию. Для определения локализации и последовательности генов на бактериальной хромосоме используют рекомбинационный анализ (обмен генетического материала).

Гены взаимодействуют через генные продукты. По теории репликона (Ф. Жакоб, С. Бреннер, Ф. Кузен), репликация (удвоение) хромосомы бактерий находится под генетическим контролем гена-инициатора, детерминирующего образование белка-инициатора, который, воздействуя на ген-репликатор (участок, откуда начинается репликация), обеспечивает функционирование ферментов синтеза ДНК.

Взаимодействие генов проявляется также при биосинтезе биологически важных соединений. Это особенно хорошо прослеживается при рассмотрении работы лактозного оперона (единица считывания информации), обеспечивающего утилизацию лактозы у кишечной палочки.

Согласно схеме Ф. Жакоба и Дж. Моно, лактозный оперон (*operor* – работаю) состоит из трех линейно расположенных (слева направо) структурных генов, деятельность которых контролируется геном-регулятором.

Процесс распада лактозы непосредственно осуществляют структурные гены, которые детерминируют образование трех катаболических ферментов: β-галактозидазы, β-галактозидпермеазы и β-галактозидтрансацетилазы. Однако функционирование структурных генов зависит от гена-регулятора и наличия в среде лактозы (индуктор синтеза ферментов). Ген-регулятор контролирует образование белка-репрессора, который при отсутствии лактозы связывается с оператором, играющим роль пускового механизма в транскрипции (перепечатывании) структурных генов. Поступая в клетку, лактоза вступает в связь с белком-репрессором, освобождает оператор и включает деятельность структурных генов. После полной утилизации лактозы белок-репрессор освобождается и вновь связывается с оператором, «приостанавливая» процесс выработки теперь уже ненужных ферментов распада лактозы.

Опероны анаболических ферментов аминокислот и азотистых оснований функционируют по принципу обратной связи: «наработка» продукта приостанавливает синтез ферментов, участвующих в его образовании.

Таким образом, смысловое определение наследственности не исключает изменчивости, ибо она, как и любое другое видовое свойство микроорганизмов, отличается лишь относительным постоянством.

Рассмотрение различных форм изменчивости микроорганизмов и механизмов ее возникновения требует определенных знаний молекулярных основ наследственности.

Нуклеиновые кислоты. Открытие наследственного вещества связано с работами О. Эйвери, К. Мак-Лауда и М. Мак-Карти. Эти ученые показали, что очищенная ДНК капсульного пневмококка, как и его экстракт, с которым в 1928 г. экспериментировал Ф. Гриффитс, вызывает образование капсул у бескапсульных штаммов того же пневмококка.

Впоследствии Г. Френкель-Конрат, А. Гирер и Т. Шрам (затем и другие) получили полноценные частицы вируса мозаичной болезни табака путем заражения здоровых листьев его НК, очищенной от примесей белка и других соединений.

Окончательные доказательства генетической роли ДНК были получены Нобелевским лауреатом А. Корнбергом, который искусственно синтезированной ДНК фага ϕX174 осуществил инфекцию у бактерий и наблюдал выход полноценных фаговых частиц.

Структура нуклеиновых кислот и реализация генетической информации у про- и эукариот. У микроорганизмов с клеточной структурой молекулой наследственности является ДНК (см. «Обмен нуклеотидов»). Она состоит из двух полинуклеотидных цепей, закрученных правильными витками вокруг общей оси, и по конструкции напоминает винтовую лестницу. Две цепочки молекулы ДНК соединены между собой слабыми водородными связями, которые устанавливаются между комплементарными друг другу азотистыми основаниями. В одной паре оснований всегда находится пурин и пиримидин. При этом отношение А+Т/ Г+Ц является постоянным для вида (правило Чаргаффа) и у бактерий колеблется от 0,45 (*C. perfringens*) до 2,73 (*сем. Actinomyces*).

Молекула РНК у про- и эукариот – одноцепочечный полимер. По молекулярной массе и выполняемой в клетке функции различают три типа РНК: информационную (иРНК), транспортную (тРНК) и рибосомную (рРНК).

ДНК репродуцируется в период деления клетки путем самоpепликации. В ее основе лежит разрыв водородных связей между двумя полинуклеотидными цепями, их раскручивание с последущим синтезом вдоль каждой из них аналогичных комплементарных цепей. Вновь синтезированная молекула ДНК всегда состоит из старой и новой цепи. Иными словами, механизм репликации ДНК имеет полуконсервативный характер. Важно отметить, что синтез ДНК непрерывно происходит лишь на одной матричной цепи, на второй – она синтезируется сравнительно короткими фрагментами Оказаки длиной от 100 до 1000 нуклеотидов, которые затем объединяются ДНК-лигазой, а удлиняются, по-видимому, ДНК-зависимой ДНК-полимеразой. Окончательная идентификация всех фер-

ментов, участвующих в репликации ДНК, восстановлении ее повреждений и в ходе генетической рекомбинации, не закончена.

Удвоение молекулы ДНК – очень сложное явление, протекающее во взаимодействии с другими процессами обмена, поскольку для синтеза новых молекул ДНК сначала должны быть синтезированы нуклеотиды, а еще раньше – азотистые основания и дезоксирибоза. Спаривание азотистых оснований при репликации ДНК происходит с большой точностью, и вероятность ошибки включения другого нуклеотида в природных условиях не превышает 10^{-8}–10^{-9}.

Синтез всех трех типов РНК происходит на молекуле ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы. Процесс ДНК-направляемого синтеза РНК называется *транскрипцией* (перепечатыванием, копированием) генетической информации. При этом доказано, что в иРНК транскрибируется лишь одна цепь ДНК.

Отличия ДНК и РНК. Нуклеиновые кислоты близки по структуре и тесно взаимосвязаны в репродуктивном процессе. Отличаются они не только по количеству нуклеотидов, молекулярной массе, химической структуре и конфигурации, но и по локализации в клетке, а главное, – по биологической роли. ДНК преимущественно локализуется в нуклеоиде, но может содержаться в цитоплазме (в плазмидах), РНК входит в состав многих структур клетки. ДНК выполняет генетическую функцию, а РНК – участвует в биосинтезе белка.

Понятие о нуклеотидном коде и программировании биосинтеза белка. После установления генетической функции ДНК стало ясно, что последовательность включения аминокислот в белках различных организмов (кодирование) обусловливается ее азотистыми основаниями. Теоретически можно было предположить, что кодирование нельзя реализовать по принципу один нуклеотид – одна аминокислота, так как ДНК состоит из четырех нуклеотидов, а в белках насчитывается 20 и более аминокислот. Известное положение о том, что одна аминокислота кодируется тремя нуклеотидами (триплетами), доказал М. Ниренберг, который с помощью РНК, содержащей один урацил (полиуридиловая кислота), синтезировал полипептид, сплошь состоящий из фенилаланина (полифенилаланин).

Далее были расшифрованы все другие свойства генетического кода: 1) каждый триплет следует один за другим, и ни один из нуклеотидов отдельного триплета не входит в состав другого, т. е. является неперекрывающимся; 2) обладает помехоустойчивостью, т. е. исправляет одиночные ошибки, а естественный отбор элиминирует организмы с существенными изменениями, неадекватными условиям среды; 3) универсален, т. е. одинаков у вирусов, бактерий, водорослей и млекопитающих, что в свою очередь доказывает общность происхождения всей живой природы.

Биосинтез белка происходит на иРНК в рибосомах, куда тРНК доставляет необходимые аминокислоты. Процесс последовательного включения аминокислот в полипептидную цепь обусловлен специфическим взаимодействием кодонов иРНК с комплементарными ему антикодонами тРНК (см. «Обмен белков»).

Нуклеиновые кислоты вирусов. Геномные НК вирусов отличаются от клеточных необычайным разнообразием структуры и формы. Так, вирусные ДНК могут иметь не только двухцепочечную, но и одноцепочечную цельную структуру или же «разрыв-дефект» в одной цепи, а по форме, кроме обычной линейной, – циркулярно-замкнутую (кольцевую). Еще больше разнятся вирусные РНК: одно- и двухцепочечные; цельные (сплошные) и фрагментированные на 2–5 – 8–12 сегментов; линейные и кольцевые, как у вирусных ДНК (рис. 45).

У вирусов, геном которых представлен двухцепочечной ДНК, механизм ее репликации обеспечивается ДНК-зависимой ДНК-полимеразой. Считается, что у кольцевых форм вирусных ДНК способ репликации более эффективен, чем у линейных. Они более устойчивы к клеточным эндонуклеазам и, вероятно, потому через кольцевые стадии вирусные ДНК интегрируют с клеточным геномом.

Среди РНК-содержащих вирусов с одноцепочечным линейным типом НК различают вирусы с позитивным и негативным геномом.

У вирусов с позитивным геномом РНК обладает функциями информационной, т. е. одновременно служит матрицей для синтеза вновь образующихся вирионных РНК и белков. Линейные вирусные РНК со свойствами иРНК принято обозначать знаком «+», а вирусы, их содержащие, – называть «плюс-нитевыми».

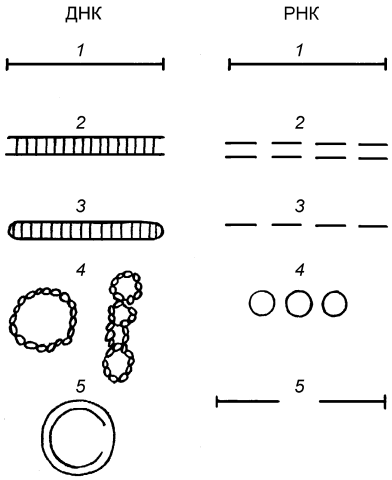
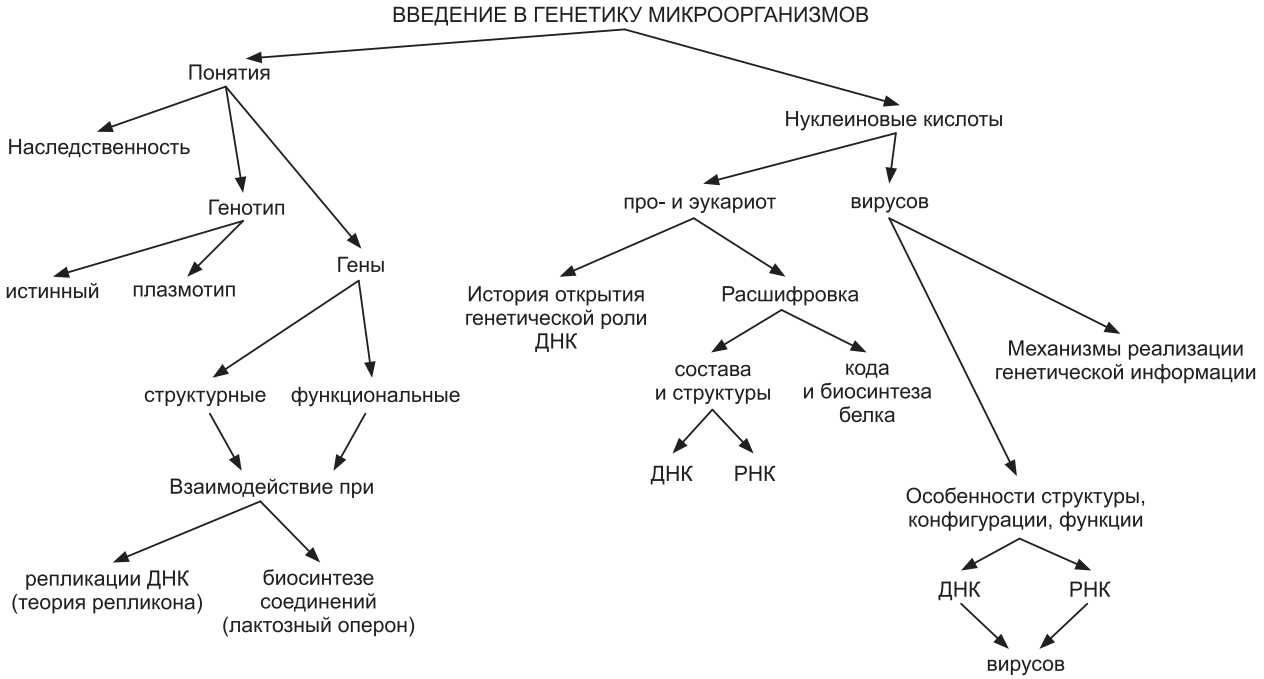


Рис. 45. Форма молекул вирионных нуклеиновых кислот:
ДНК – линейная одноцепочечная (*1*) и двухцепочечная с незамкнутыми (*2*) и замкнутыми концами (*3*), циркулярно-замкнутые обычные (*4*) и с недостроенным участком в одной цепи (*5*); РНК – одноцепочечная цельная (*1*), двухцепочечная сегментированная (*2*), одноцепочечная сегментированная (*3*), кольцевая сегментированная (*4*), двойная одноцепочечная цельная (*5*)

У вирусов с негативным геномом РНК не обладает функциями информационной, вследствие чего ее обозначают знаком «–», а вирусы называют «минус-нитевыми». Синтез иРНК у такого рода вирусов осуществляется в зараженной клетке на матрице минус-РНК с помощью вирусспецифического фермента транскриптазы.

Некоторые РНК-содержащие вирусы могут являться амбисенсвирусами и содержать как плюс-, так и минус-нити РНК.

Особым свойством обладает РНК ретровирусов. В своем составе ретровирусы содержат две идентичные геномные молекулы РНК и реверсальную (обратную) транскриптазу, или РНК-зависимую ДНК-полимеразу. С помощью этого уникального вирусспецифического фермента на ее матричной основе последовательно синтезируются вначале одна нить ДНК, а затем и другая, которые, замкнувшись в кольцо, интегрируют с клеточным геномом, после чего с участием РНК-полимеразы клеток происходит пе-


ВВЕДЕНИЕ В ГЕНЕТИКУ МИКРООРГАНИЗМОВ
Понятия
Наследственность
Генотип
истинный
плазмотип
Гены
структурные
функциональные
Взаимодействие при
репликации ДНК (теория репликона)
биосинтезе соединений (лактозный оперон)
Нуклеиновые кислоты
про- и эукариот
вирусов
История открытия генетической роли ДНК
Расшифровка
состава и структуры
кода и биосинтеза белка
ДНК
РНК
Механизмы реализации генетической информации
Особенности структуры, конфигурации, функции
ДНК
РНК
вирусов

Граф 30

реписывание информации на РНК. Поскольку синтезированная таким окольным путем иРНК не просто комплементарна геномной, как у минус-нитевых вирусов, а полностью гомологична ей, то ретровирусы с полным правом относятся к плюс-нитевым.

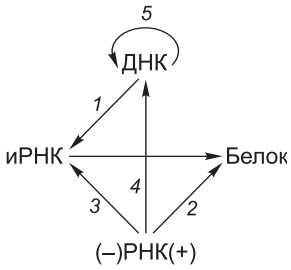


Рис. 46. Пути реализации генетической информации у вирусов

Реализация генетической информации у вирусов. Вследствие большого разнообразия геномов механизм реализации генетической информации у вирусов происходит в нескольких направлениях (рис. 46): 1) ДНК → → иРНК → белок (ДНК-содержащие двухцепочечные); 2) РНК → белок (позитивный геном РНК-вирусов); 3) РНК → → иРНК → белок (негативный геном РНК-вирусов); 4) РНК → ДНК → иРНК → белок (позитивный геном с обратной транскриптазой у ретровирусов); 5) одноцепочечная ДНК → двухцепочечный ДНК-транскрипт → иРНК → белок (у парвовирусов).

Изменчивость микроорганизмов

Общие понятия. Под изменчивостью микроорганизмов принято понимать способность клеток изменять видовые признаки и свойства. Признак (свойство) в генетике называют словом *фен,* а их сочетание в определенной среде обитания – *фенотипом.* Следовательно, изменчивость – это способность изменять фенотип, или фенотипическое выражение. При одной и той же наследственной конституции микроорганизм может иметь несколько фенотипов, что зависит от характера питания, аэрации, температуры и других условий культивирования.

Классификация. Смена фенотипов при изменении условий существования и развития микроорганизмов может происходить без участия наследственного аппарата (генотипа) или являться следствием его повреждения.

Изменчивость, при которой смена фенотипа микробов происходит без изменения генотипа, называют ненаслед-

ственной, фенотипической изменчивостью или модификацией. Модификационная изменчивость микробов легче всего обнаруживается в таких условиях окружающей среды, которые отличаются от оптимальных. Модификация возникает под влиянием не только сильных, но и слабых факторов: 1) химических (глицерин, рицинолеат натрия, хлорид кальция, железо); 2) физических (температура, влажность, радиация, действие ультрафиолетовых лучей и магнитных полей); 3) биологических (желчь, антитела, антибиотики). Эта форма изменчивости, однако, рано или поздно утрачивается, и микроб вновь приобретает фенотип исходной культуры.

Изменчивость микроба, связанную с предшествующим структурным изменением в генотипе, называют *наследственной* или *генотипической*. Эта форма изменчивости передается по наследству и сравнительно редко реверсирует в фенотип, характерный для исходного вида или разновидности.

Модификации и мутации прежде всего касаются морфолого-культуральных свойств микробов, но эти легко обнаруживаемые изменения нередко сочетаются с изменениями биохимических свойств и если последние достаточно глубоки, то сопровождаются также вариациями химической структуры микроба и даже вирулентности.

По диапазону изменчивости выделяют внутривидовую и видообразующую изменчивость.

Внутривидовая изменчивость включает процессы, возникающие при модификациях, изменениях чувствительности микробов к лекарственным веществам и другие, при которых сохраняются основные таксономические (видовые) признаки микробов.

Видообразующая изменчивость связана с глубокой реорганизацией наследственных структур микроба и познается при изучении жизненно важных процессов обмена, фило- и онтогенеза родственных групп микроорганизмов.

Внутривидовая форма изменчивости встречается часто, видообразующая – чрезвычайно редко.

Первую форму изменчивости можно легко воспроизвести, прибавив к расплавленному мясопептонному агару 3 % желчи, 0,1 % фенола, и, разлив его в чашки Петри, засеять суточную бульонную культуру протея. Посевы выращивают при температуре 37 °С в течение суток. Из сформиро-

вавшихся колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму. В опытных препаратах наблюдают нитевидные формы бактерий, нередко с колбовидными утолщениями на концах, в контроле – типичные грамотрицательные палочки.

Характер проявлений. Модификация при смене условий культивирования или старении в наследственно однородной культуре происходит у всех или у большинства особей микробов. Характерно, что изменчивость биологических свойств, возникшая в результате модификации, существенно не отражается на жизнедеятельности бактерий. Спектр, выраженность, длительность фенотипических проявлений при модификациях ограничены генотипом и, естественно, у разных видов неодинаковы. В этой связи модификации бывают лабильные (кратковременные) и стабильные (длительные), которые, по-видимому, обусловлены плазмотипом.

Исход. Возникающие в результате модификации новые признаки всякий раз утрачиваются, поэтому в отличие от мутаций модификационная изменчивость не играет существенной роли в эволюционном процессе микробов.

Диссоциация (*dissociatio* – расщепление). Диссоциацию большинство ученых рассматривают как закономерную форму модификации, а некоторые ее относят к мутациям. Присуща она прежде всего энтеробактериям, в однородной популяции которых обычно появляются различные по биологическим свойствам особи микробов, образующие на питательных средах несколько типов колоний.

Формы колоний. Колонии у разных видов кишечных бактерий, как правило, круглые, с ровными краями, выпуклые, влажные, полупрозрачные. Первооткрыватели диссоциации назвали их S-формой (*smooth* – гладкий). При диссоциации возникают пять основных типов колоний: 1) шероховатые R-колонии (*rough* – шершавый), отличающиеся неправильной формой, неровными краями, уплощенной, радиально исчерченной поверхностью, сухостью; 2) SR-формы или переходные, нестойкие типы колоний; 3) слизистые M-колонии (*mucoid* – слизь) – круглые, вязкой консистенции, часто с концентрическими кольцами на поверхности; 4) карликовые D-колонии (*dwarf* – карлик), возникающие нередко в виде дочерних в нормально развитых колоний (рис. 47); 5) L-колонии

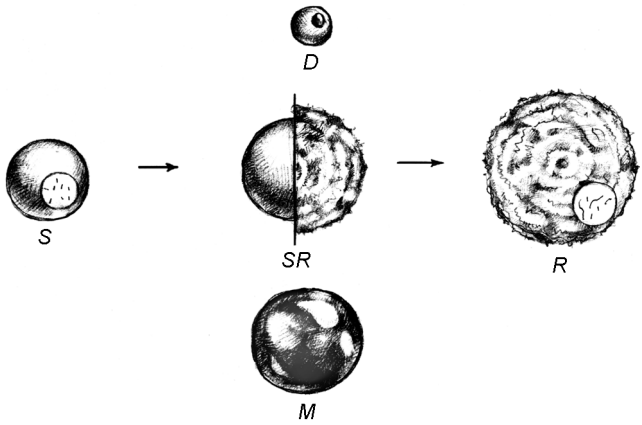


Рис. 47. Схема диссоциации у энтеробактерий

Таблица 2. **Свойства бактерий из S- и R-колоний**

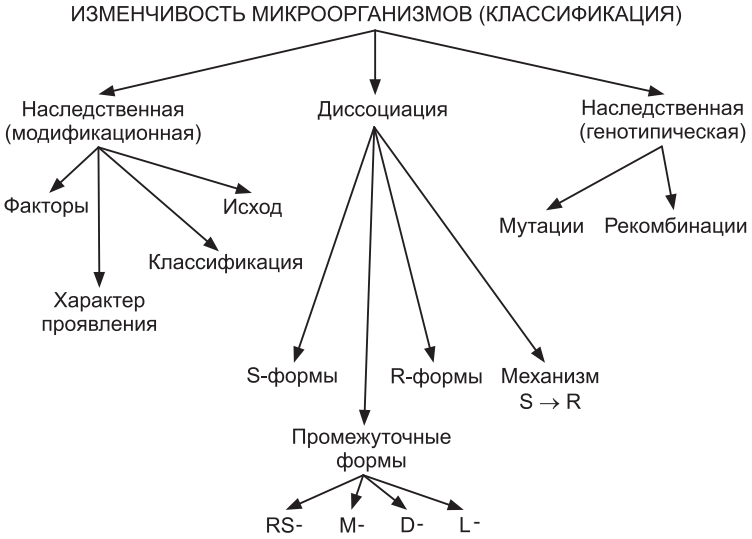
Признаки	S-форма	R-форма
Морфология	Клетки нормальной морфологии	Мелкие, кокковидные бактерии
	У капсульных видов – капсулы	Капсулы отсутствуют
	У подвижных видов – жгутики	Жгутики утрачены
Биохимические свойства	Активная фаза	Малоактивная
Антигенные свойства	Полноценны в антигенном отношении, содержат специфический полисахарид	Неполноценны, утрачивается специфичность антигенов
Вирулентность	Вирулентны	Слабовирулентны
Агглютинабельность в иммунной сыворотке	Вследствие наличия жгутиков дают хлопьевидный осадок	Агглютинат мелкозернистый
Чувствительность к:		
• фагу	Лизируется	Нечувствительна
• фагоцитозу	Фагоцитируется слабо	Легко фагоцитируется
Период выделения из организма	В острой стадии болезни	При хронических процессах и выздоровлении

(названные в честь Листера) – микроскопически мелкие с нежным кружевным краем и врастающим в среду центром, приобретающим при длительном хранении желто-коричневую пигментацию (см. рис. 108).

Свойства бактерий, составляющих два диаметрально разных типа колоний, возникающих в популяции патогенных энтеробактерий при диссоциации, представлены в табл. 2.

Механизм диссоциации. В основе диссоциативных изменений от S- к R-формам колоний лежит нарушение способности бактерий синтезировать боковые цепи липополисахарида клеточной стенки. При полной утрате синтеза поверхностных липополисахаридов возникают R-мутанты, при репрессии – R-варианты, реверсирующие в исходную S-форму. Механизм диссоциаций от R- к S-формам колоний изучен недостаточно.

Наследственная (генотипическая) изменчивость подразделяется на мутационную и рекомбинационную. Эти формы изменчивости играют важную роль в эволюции микробов, обусловливают пластичность, формирование новых видов и вариантов.



Граф 31

Мутации и репарации у бактерий

Классификация. Мутации (*mutatio* – изменение) – это стойкие наследственные изменения свойств микробов, связанные с реорганизацией нуклеотидов в молекуле ДНК (хромосоме, генах).

По локализации мутации делят на нуклеоидные (ядерные) и цитоплазматические. В свою очередь нуклеоидные мутации бывают хромосомные (геномные) и генные. Хромосомные мутации затрагивают структуру генома, сопровождаются макроизменениями генетического аппарата и, как правило, вызывают гибель микробов. Генные мутации представляют собой точечные микроизменения в отдельных генах, на основе которых возникают новые разновидности и варианты бактерий. Цитоплазматические мутации – это мутации структуры очень мелких, относительно автономных генетических элементов цитоплазмы, названных плазмидами.

По направленности изменений все мутации делят на прямые и обратные (реверсивные). Прямые мутации диких (природных) типов ведут к возникновению мутантов. Мутации, сопровождающиеся реверсией (возвратом) к дикому типу, называют *обратными*, полное восстановление первоначальной структуры генотипа – *истинной реверсией*, а возврат одного фенотипа при обратной мутации посредством компенсации нарушений в диком генотипе или подавления мутационных изменений в нем – *супрессией*. Исправление считывания генетической информации и восстановление дикого фенотипа микроба механизмом супрессии осуществляется: 1) вторичной мутацией в пределах уже мутированного гена на последующих его участках, не затронутых первичной мутацией (внутригенная супрессорная мутация); 2) мутацией в так называемых генах-мутаторах, которые обусловливают правильный порядок включения аминокислот в белки, формирующихся на иРНК с неправильным порядком нуклеотидов, или же изменяют и переводят на другой путь метаболизм микробов (внегенная супрессорная мутация).

Мутагены. Все мутации причинно обусловлены. Однако одни из них, возникающие в обычных условиях при воздействии на микроорганизмы случайных факторов внешней среды, называются спонтанными (самопроиз-

вольными), а другие, появляющиеся после обработки культуры известными агентами, – индуцированными.

Частоты спонтанных мутаций крайне низки – $1 \cdot 10^{-12}$ –$1 \cdot 10^{-4}$. Причины различий частот мутаций у бактерий не выяснены. По имеющимся данным, в их контроле участвуют особые гены-мутаторы. Характерной особенностью спонтанных мутаций является то, что они обнаруживаются не сразу, а через лаг-период, который продолжается в течение нескольких делений клеток.

Среди возможных причин спонтанных мутаций особое внимание заслуживает таутомеризм и, главное, транспозоны.

Таутомеризм (*tauto* – тот же самый, *meros* – часть) – ошибочное спаривание правильных азотистых оснований с их инертными формами, которые появляются в результате перераспределения электронов и протонов в молекулах ДНК.

Транспозоны – генетические элементы, способные к миграции в пределах одного репликона или мигрирующие из одной единицы репликации (генома) в другую (плазмиды). При этом могут занимать в них разные локусы, а при внедрении в регуляторные последовательности оперонов вызывать мутационные повреждения. У бактерий и других прокариот среди транспозонов различают *IS*-элементы (*insertion sequences* – вставочные последовательности), собственно транспозоны и некоторые бактериофаги, в частности фаг *Mu*, транспозиция генома которого сочетается с его процессом репликации.

IS-элементы состоят из 750–1500 пар азотистых оснований с идентичными на обоих концах инвертированными повторами небольшого числа пар азотистых оснований с зеркальной относительно друг друга последовательностью. В их составе содержатся гены, кодирующие белки, обеспечивающие процесс транспозиции.

Более сложны по структуре собственно транспозоны. Наряду с генами транспозиции, они содержат гены, детерминирующие лекарственную резистентность, токсинообразование, утилизацию определенного углевода и ограничивающие их инвертированные или прямые повторы, которые часто представлены *IS*- или *IS*-подобными элементами.

ДНК фага *Mu*, в отличие от *IS*-элементов и собственно транспозонов, не содержит концевых повторов. Правый ее

конец (*S*-конец) представлен длинными, а левый (*C*-конец) – короткими нуклеотидными цепями азотистых оснований, являющихся фрагментами ДНК хозяина, которые присоединяются к фаговому геному в ходе транспозиции при его репликации.

Индуцированные мутации вызывают физические, химические и биологические факторы окружающей среды. К физическим мутагенам относят ультрафиолетовые лучи и ионизирующее излучение, магнитные поля, температуру. Индуцирующий эффект УФ-лучей в основном зависит от длины волны; различных видов излучений – от дозы; а магнитных полей, как нами установлено, – от изменения напряженности Земного поля.

Среди химических веществ наиболее сильными мутагенами являются органические пероксиды, алкилирующие соединения, бензол, бензапирен, диоксины, нитраты, азотная кислота, аналоги азотистых оснований и др. К биологическим мутагенам можно отнести фаги, токсины бактерий и грибов, антибиотики.

Механизм мутаций. Единицей мутации является мутон, под которым понимают наименьший отрезок (участок) гена, состоящий из одной или нескольких пар нуклеотидов, всякое изменение в которых приводит к мутациям. При этом в мутонах могут происходить: 1) простые замены пурина на пурин, пиримидина на пиримидин (транзиции) или сложные замены пурина на пиримидин, пиримидина на пурин (трансверсии); 2) выпадение мутонов (делеции), их добавление (дупликации) или перестановки (транслокации); 3) образование внутри- и межцепочечных перекрестных сшивок в них, что индуцируется, например, УФ-излучением и ипритом; 4) разрывы, которые происходят под влиянием ионизирующей радиации, алкилирующих соединений и тимидинового голодания у бактерий. В основе мутаций могут лежать также механизмы репрессии и дерепрессии генов. Некоторые эндогенные и экзогенные факторы вызывают мутацию, нарушая процессы репликации ДНК, транскрипции и трансляции. Крупные индуцированные мутации, сопровождающиеся разрывами и множественными сшивками ДНК, делециями и инверсиями мутонов, ведут к гибели бактериальной популяции. Точечные, обычно спонтанные мутации, сопровождающиеся заменами в полипептидных цепях одной

аминокислоты, в основе которых лежат транзиции и трансверсии, связанные с таутомеризмом или внедрением в опероны транспозонов, нередко приводят к появлению жизнеспособных мутантов, которые приобретают определенные преимущества, становясь, например, антибиотико- и фагоустойчивыми. Чаще в результате мутаций в прототрофной популяции бактерий появляются ауксотрофные особи, утрачивающие способность синтезировать необходимые им факторы роста.

Получение ауксотрофных мутантов. Выявляют ауксотрофы, пересевая методом отпечатков (или реплик) 100–200 колоний опытной культуры из мясопептонного агара на глюкозо-солевую минимальную агаризованную среду, где они не растут. С этой целью 5 мл 18-часовой бульонной культуры *E. coli* центрифугируют, промывают 0,5 %-ным раствором натрия хлорида, вновь центрифугируют и ресуспензируют в 20 мл фосфатного буфера (1000 мл дистиллированной воды, 3 г KH_2PO_4, 7 г Na_2HPO_4, 4 г NaCl и 0,2 г $MgSO_4$). Затем взвесь бактерий наливают в чашки Петри слоем в 1 мл и помещают под лампу БУВ на расстоянии 10 см от нее. Облученную в течение 10–15 мин взвесь бактерий в количестве 0,1 мл высевают в чашки Петри с МПА, и выросшие на его поверхности колонии штампом переносят на минимальный агар. Через сутки, сопоставляя чашки, на минимальной среде находят негативные колонии или отпечатки мутантных колоний из МПА.

Для выяснения зависимости от аминокислот колонии ауксотрофов с полноценной среды засевают на минимальные пластинчатые среды, содержащие различные группы аминокислот, а получив их рост на одной из них, – в минимальный агар с одной аминокислотой этой группы.

Часто мутации приводят к изменению культуральных свойств, возникновению антибиотикоустойчивости, резистентности к фагам, физическим и химическим соединениям, реже – затрагивают антигенную структуру и сказываются на вирулентности бактерий.

Виды репараций. У бактерий открыты ферментные системы, которые способны реконструировать поврежденную ДНК. Процесс восстановления поврежденной ДНК называют *репарацией*. Репарационные системы находятся под контролем специальных генов. Мутации последних резко снижают способность бактерий к репарациям.

Среди наиболее простых механизмов репараций, восстанавливающих одноцепочечные повреждения ДНК, различают пять видов репараций: фото- и термореактивацию, темновую реактивацию, реактивацию хозяином, ультрафиолетовую реактивацию.

Лучше других изучена репарация повреждений ДНК ультрафиолетовыми лучами. Она осуществляется двумя путями: облучением бактерий мощным источником видимого света (фоторепарация) или помещением их в абсолютную темноту.

Репарирующее действие видимого света связано с активацией фотореактивирующего фермента, который разрывает пиримидиновые димеры.

Темновая репарация осуществляется поэтапно несколькими ферментами. На первом этапе они вырезают и удаляют поврежденный участок ДНК, затем вырезают фрагменты ДНК, прилегающие к области повреждения. На последующих этапах темновой репарации происходит ресинтез удаленного участка и интеграция нового фрагмента в молекулу ДНК. В вырезании и дезагрегации поврежденной нити ДНК принимают участие три фермента типа эндонуклеаз, в процессах синтеза и сшивания новых фрагментов – ДНК-полимераза и ДНК-лигаза.

Репарация хозяином – это реактивация повреждений ДНК фагов, вызванных ультрафиолетовым облучением, с помощью ферментов темновой репарации, которые принадлежат интактным бактериям.

Ультрафиолетовая репарация, как и репарация хозяином, является процессом восстановления повреждений фагов бактериями, активность которых повышается под влиянием малых доз УФ-лучей.

Терморепарация – процесс восстановления жизнеспособности поврежденных бактерий путем инкубирования культур при температуре 42–45 °С. Механизм терморепарации не выяснен.

В тесной связи с репаративными возможностями бактерий находится проблема антимутагенеза. Эта область науки начала развиваться совсем недавно, но в опытах на микроорганизмах уже обнаружены антимутагенные свойства у различных химических веществ, в том числе и у мутагенных (кофеин, гистидин, полиамины, акридины).

МУТАЦИИ И РЕПАРАЦИИ
Классификация
по локализации
Нуклеоидные
Цитоплазматические
Хромосомные
Генные
по направленности
Прямые
Обратные (реверсивные)
Истинные
Супрессорные
по происхождению
Спонтанные
Индуцированные
Мутагены
Механизм
Изменение мутона
транзиции
трансверсии
транслокации
делеции
дупликации
Нарушения
в цепях ДНК
репрессии и дерепрессии
Сшивы
Разрывы
Виды
фоторепарация
темновая
терморепарация
ультрафиолетовая
хозяином

Граф 32

Рекомбинационная изменчивость

Под рекомбинационной изменчивостью (*re* – вновь, *combino* – связывать) понимают наследственную изменчивость, возникающую при интеграции экзогенной ДНК (отдельных участков, целых генов) в геном клетки или вируса.

При рекомбинации наблюдается как замещение ДНК, так и ее добавление. По теории «разрыв – воссоединение», замещение участков ДНК реализуется в процессе кроссинговера с участием специальных *rec*-генов, детерминирующих репарационные процессы в клетке. Замещенный участок собственной ДНК вырезается и выбрасывается с помощью эндоклеточных нуклеаз. Встраивание нового фрагмента ДНК осуществляется ферментами типа лигаз.

Поскольку при рекомбинациях ДНК не разрушается, а лишь модифицируется, то перестройка генетических структур в отличие от мутации не вызывает летальных эффектов. Особенностью рекомбинационной изменчивости служит и то, что фенотипическое выражение нового признака (признаков) обнаруживается сразу же после интеграции экзогенной ДНК.

Рекомбинационная изменчивость возникает при трансформации, конъюгации, трансдукции, лизогенизации, фаговой конверсии. Частота рекомбинации различна (10^{-1}–10^{-9}). Она зависит от эффективности кроссинговера и механизма передачи экзогенной ДНК.

Механизмы передачи ДНК бывают низкочастотные (трансформация, трансдукция, конъюгация с передачей хромосомы) и высокочастотные (конъюгационная передача плазмид, лизогенизация и фаговая конверсия). В большинстве случаев передача генетической информации осуществляется бактериальными плазмидами.

Общая характеристика плазмид

Бактериальные плазмиды – это многочисленные внехромосомные (экстрахромосомные) детерминанты наследственности, способные к самоподдержанию и воспроизводству. Плазмиды и некоторые другие генетические элементы цитоплазмы, обособленные от хромосомы, в совокупности своей составляют плазмотип.

Виды. Известно несколько видов плазмид: 1) фактор F, обусловливающий конъюгацию у бактерий; 2) R-факторы, контролирующие лекарственную резистентность у бактерий; 3) факторы бактериоциногенности, детерминирующие образование бактериоцинов (антибиотиков); 4) плазмиды Ent и Hly, обеспечивающие соответственно синтез энтеротоксина и гемолизина; 5) *плазмиды*, определяющие устойчивость бактерий к физическим факторам, солям тяжелых металлов, контролирующие их метаболизм и утилизацию органических соединений. К плазмидам по ряду свойств близок умеренный дефектный фаг, который обусловливает трансдукцию.

Структура. Плазмиды представляют собой комбинированные циркулярно замкнутые двухтяжевые молекулы ДНК, в состав которых входят гены репликации, гены синтеза пилей и другие гены, детерминирующие нежизненно важные свойства (антибиотикоустойчивость, фагорезистентность и пр.), но в определенных условиях обеспечивающие клетке некоторые преимущества. Молекулярная масса плазмид колеблется от $1{,}5 \cdot 10^6$ до $30 \cdot 10^6$ дальтон и более. В клетке присутствуют 1–2 копии крупных плазмид и 10–30 мелких.

Свойства. Плазмиды обладают свойствами репликона, т. е. способностью к независимой репликации. Будучи автономными цитоплазматическими структурами, они могут интегрироваться с геномом бактерий. Потеряв автономность, плазмиды становятся составной частью хромосомы, делятся синхронно с ней и передаются дочерним клеткам, не теряя способности отщепляться и вновь существовать как независимый от хромосомы репликон.

Благодаря тому что многие плазмиды контролируют образование половых пилей, они обладают также конъюгативностью (трансмиссивностью, инфекциозностью). Способность конъюгационных плазмид передаваться от клетки к клетке через цитоплазматический мостик и выполнять функцию донора определяется наличием в них *tra*-оперона (***tra**nsfer* – перенос), ответственного за перенос ДНК.

Наличие плазмид в клетке создает иммунитет к суперинфекции гомологичными плазмидами.

Многие плазмиды утрачиваются. Элиминация их происходит спонтанно и под влиянием различных индукто-

ров (УФ-облучение, магнитное поле, температура, акридиновые красители, соли тяжелых металлов и др.).

Плазмиды, как и все генетические структуры, подвержены мутациям, что тоже нередко приводит к их элиминации. Утрата плазмид не сказывается на процессах роста и размножения бактерий, поэтому плазмиды часто называют дополнительными генетическими элементами.

Систематика плазмид не завершена, и число вновь открытых плазмид продолжает увеличиваться.

Классификация. По способности передаваться от одних клеток к другим бактериальные плазмиды делятся на конъюгационные и неконъюгационные. Конъюгационные плазмиды придают клеткам донорскую способность вступать в конъюгацию с другими клетками (реципиентами). Эти плазмиды обеспечивают собственный перенос (самотрансферабельность), перенос генов донора в клетку реципиента, а также мобилизуют на перенос неконъюгационные плазмиды.

По способности репрессировать половой фактор (F-плазмиды) конъюгационные плазмиды делят на репрессирующие (fi^+) и нерепрессирующие (fi^-).

В зависимости от свойств пилей различают F-подобные и I-подобные конъюгационные плазмиды. Первые контролируют синтез F-пилей, которые имеют рецепторы для адсорбции F-специфических фагов, вторые – образование I-пилей для адсорбции I-фагов.

По степени родства и возможности репликации в одной клетке плазмиды классифицируются на 20 групп несовместимости. В пределах группы содержатся близкородственные, но несовместимые в клетке плазмиды, что выражается в блокаде репликации и элиминации одной из них. Наоборот, неродственные плазмиды разных групп совместимы, так как между системами их репликации, по-видимому, нет никакой взаимосвязи.

Значение. Плазмиды имеют общебиологическое и медицинское значение. Осуществляя перенос генетического материала, они обогащают генофонд бактериальной популяции; являясь движущими силами эволюционного процесса, плазмиды играют важную роль в формировании новых видов, разновидностей и вариантов, что в практике бактериолога затрудняет идентификацию возбудителей инфекционных болезней. Конъюгационные плазмиды –

важный механизм защиты, противоборства и выживания бактерий в неблагоприятных условиях окружающей среды, в частности обеспечивающий множественную лекарственную резистентность к химиопрепаратам.

Наиболее изученными плазмидами являются F-, R-факторы и фактор бактериоциногенности. Все они могут обеспечить процесс конъюгации, однако чаще конъюгационная изменчивость обусловливается «чистым» некомбинированным и несаморепрессирующимся F-фактором, в состав которого входят только гены, обеспечивающие образование пилей.

Граф 33

Конъюгация и конъюгационные плазмиды

Общее понятие. Под конъюгацией (*conjugo* – соединяться) понимают непосредственную передачу генетического материала от одних бактерий к другим через конъюгационную трубку.

История открытия. Открытие конъюгации принадлежит Д. Ледербергу и Э. Тейтуму. Совместно культивируя два ауксотрофных штамма кишечной палочки К-12, они вначале получили независимые от факторов роста прототрофы, а затем доказали, что в основе этого явления лежит

рекомбинация генов, наступающая после переноса хромосомы от одной клетки к другой в результате их прямого контакта.

Впоследствии В. Хейс и Д. Ледерберг привели решающие доказательства тому, что при конъюгации происходит ориентированный (односторонний) перенос хромосомы, и рекомбинанты всегда формируются на основе одной клетки из каждой конъюгирующей пары. Клетку, передающую генетический материал, стали называть *донорской*, а воспринимающую – *реципиентной*.

Плазмиды F. Вскоре выяснилось, что клетки донора обладают фактором фертильности (фактор плодовитости, половой фактор, фактор конъюгации, фактор F), а реципиентные – лишены его. При этом было установлено, что половой фактор представляет собой типичную плазмиду, контролирующую образование половых ворсинок (пилей) и по отношению к хромосоме существующую в двух альтернативных состояниях – автономном и интегрированном. Клетки, имеющие фактор F в автономном состоянии, стали называть F^+-донорами; клетки, несущие его в интегрированном состоянии, Hfr-донорами (***H**igh **f**requency of **r**ecombination*** – высокая частота рекомбинации), а клетки, не имеющие полового фактора, – F^--клетками или реципиентными.

Частота конъюгации. Скрещивание F^+-доноров с F^--клетками сопровождается высокой частотой передачи полового фактора, и F^--клетки превращаются в F^+ (рис. 48, *а*). Рекомбинанты в таких смесях не возникают или появляются чрезвычайно редко (с частотой 10^{-6}–10^{-7}).

Наоборот, скрещивание Hfr-доноров с теми же реципиентными клетками обеспечивает высокую вероятность формирования рекомбинантов (с частотой 10^{-1}–10^{-3}), но не приводит к передаче полового фактора (рис. 48, *б*). Объясняется это следующим образом. В начале конъюгации в локусе прикрепления полового фактора происходит разрыв хромосомы, и она из циркулярной структуры превращается в линейную. Конец образовавшейся линейной структуры с половым фактором становится задним, а противоположный – передним. Участок хромосомы, внедряющийся первым в реципиентную клетку, называется О-точкой (*origin* – начало). Признаки (гены), расположенные на переднем конце хромосомы ближе к О-точке, обна-

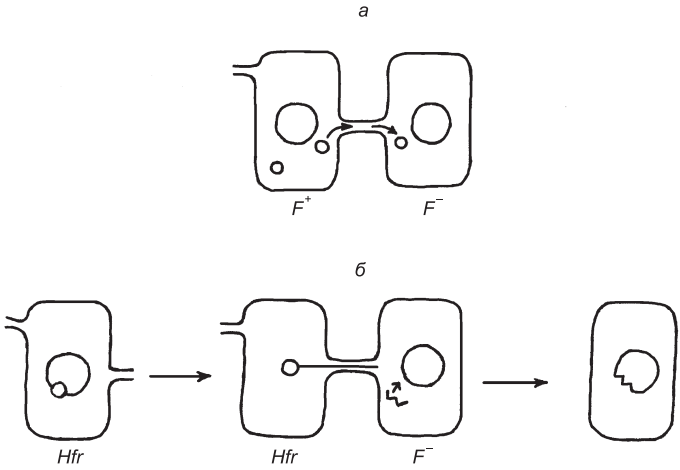


Рис. 48. Схема конъюгации с передачей полового фактора (*а*) и конъюгации с последующим формированием рекомбинантов (*б*)

руживаются у рекомбинантов с высокой частотой, а локализованные в дистальном отрезке, в том числе и фактор F – с низкой. Это связано с тем, что от донора к реципиенту переходит только часть хромосомы, ибо конъюгационный мостик легко разрывается при самых незначительных флюктуациях внешней среды. Естественно, что клетки-реципиенты почти никогда не становятся Hfr-донорами. Однако последние при высвобождении полового фактора из хромосомы могут превращаться в F^+-доноров, и наоборот. При очередном отщеплении фактора F из хромосомы в его состав могут включаться гены донора. Такой комбинированный половой фактор назван F′. Его скрещивание с F^--клетками приводит к возникновению в популяции реципиентных клеток, как рекомбинантов, так и F^+-клеток. Половой фактор F′ в отличие от фактора F легко интегрирует в геном донора, так как несет хромосомный сегмент, гомологичный с хромосомой бактерии.

Половые факторы независимо от их состояния, помимо F-пилей, контролируют формирование рецепторов для адсорбции фагов, поражающих мужские особи клеток, детерминируют образование особого f-антигена, изменяют зарядность клеток.

В автономном состоянии половые факторы реплицируются независимо от хромосомы, представлены 1–2 копиями, обладают трансмиссивностью и легко элиминируют под влиянием акридиновых красителей и других индуцирующих агентов. Элиминировать половой фактор в интегрированном состоянии не удается.

Стадии конъюгации. Процесс конъюгации условно подразделяют на пять последовательных стадий: 1) столкновение клеток; 2) установление эффективных контактов между ними; 3) мобилизация хромосомы на перенос (предзиготные стадии); 4) генетический перенос и образование зиготы; 5) формирование рекомбинантов и их экспрессия.

Первая стадия конъюгации определяется плотностью распределения смешиваемых клеток. Контакты между клетками устанавливаются в результате взаимодействия между концом пили донора и оболочкой реципиента, что приводит к образованию конъюгационной трубки. Сразу же происходит мобилизация хромосомы на перенос. Контакт двух различных в половом отношении клеток активирует систему репликации плазмиды F, что ведет к разрыву и репликации хромосомы. В реципиентную клетку передается одноцепочечная ДНК. Генетический перенос заканчивается достройкой второй нити ДНК, образованием зиготы (мерозиготы), после нескольких делений (3–9) которой возникает рекомбинант.

Условия конъюгации. На формирование рекомбинантов могут влиять различные факторы среды. Так, выход рекомбинантов на полноценной среде происходит намного чаще, чем на минимальной. Определенное значение имеет также pH среды, который влияет на заряд оболочек бактерий и, следовательно, на образование эффективных пар. Существенное значение имеет температура. Наибольшее количество зигот образуется при температуре 37 °C, наименьшее – при 4 °C.

Важное значение в конъюгации имеет соотношение F^-- и F^+-клеток. Самая большая частота появления рекомбинантов наблюдается в тех смесях, в которых число реципиентов превышает количество доноров, причем увеличение частоты рекомбинаций идет параллельно с нарастанием количества реципиентных клеток.

Виды конъюгации. Конъюгация среди бактерий – обычное явление, а применительно ко многим видам кишечно-тифозной группы – универсальное. Конъюгационной способностью обладают не только природные штаммы, но и гибриды. Как и другие виды рекомбинаций, конъюгация подразделяется на внутри- и межвидовую. Рекомбинанты чаще возникают при внутривидовом скрещивании бактерий, однако нередка и межвидовая рекомбинация. Так, конъюгация воспроизводится между кишечными палочками, шигеллами, сальмонеллами, клебсиеллами, холерным вибрионом, между сальмонеллами и шигеллами, другими родственными видами бактерий. Есть данные о скрещивании в пределах родов (*Shigella, Pseudomonas, Yersinia*). Имеются основания предполагать, что конъюгация происходит и в природе.

Схема воспроизведения конъюгации. Находящиеся в логарифмической фазе роста бульонные культуры стрептомициночувствительного донора-прототрофа смешивают со стрептомицинорезистентным реципиентом-ауксотрофом по треонину и совместно подращивают их в течение 20–24 ч. Смесь отмывают от бульона, ресуспензируют в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида и высевают по 0,1 мл на чашки Петри с минимальной средой, в которой содержится 250 мкг/мл стрептомицина. Через 48 ч при температуре 37 °С на среде вырастают бактерии-рекомбинанты, получившие от донора гены, детерминирующие синтез треонина. Параллельно на ту же среду раздельно высевают отмытые от бульона культуры прототрофа и ауксотрофа, которые роста не дадут, поскольку первый из них подавляется стрептомицином, а второй нуждается в треонине, который отсутствует в среде.

Плазмиды R. Плазмиды R (*resistance* – устойчивость), факторы множественной лекарственной резистентности, или R-факторы, представляют собой экстрахромосомные генетические структуры, которые детерминируют у бактерий устойчивость к одному или нескольким антибиотикам.

Классификация. R-плазмиды неоднородны. Многие из них обладают свойствами полового фактора. Такие R-плазмиды называют конъюгационными или трансмиссивными. Они контролируют образование специальных ворсинок (R-пилей) и обусловливают способность клеток

вступать в конъюгацию в качестве донора. Отдельные R-плазмиды неконъюгационны (нетрансмиссивны).

По способности репрессировать половой фактор R-плазмиды подразделяются на два типа: 1) R-плазмиды fi^+, ингибирующие функцию полового фактора, и 2) R-плазмиды fi^-, не подавляющие его.

Строение и свойства. В автономном состоянии R-плазмиды имеют вид замкнутых кольцевидных молекул ДНК и обнаруживаются в количестве 1–5 копий на хромосому (реже – в большем числе). Структура R-плазмид сложная. Они составлены из двух сцепленных единиц: 1) трансмиссивного фактора RTF *(resistance transfer factor)*, детерминирующего автономную репликацию и конъюгационный перенос генов множественной лекарственной устойчивости, и 2) генов резистентности (r). Обычно в виде такой комбинированной структуры и функционирует R-фактор, непрерывно инфицируя клетки хозяина. В некоторых случаях R-фактор может встраиваться в хромосому или диссоциировать на составные части – RTF и r. Находясь раздельно, фактор переноса и гены лекарственной резистентности способны к автономной репликации, так как каждый компонент является репликоном. В диссоциированном виде фактор переноса (RTF) – трансмиссивная единица. Гены резистентности (r) сами по себе в виде дискретных единиц не передаются. Их перенос обеспечивается вновь возникающей ассоциацией с трансмиссивным фактором или другими конъюгационными плазмидами. Последние способны мобилизовать на перенос также хромосомные гены и нетрансмиссивные R-плазмиды.

Механизм множественной лекарственной резистентности. Биохимические механизмы лекарственной резистентности, обусловленной плазмидами, полностью не изучены. Считают, что индуцированная R-факторами лекарственная устойчивость связана, во-первых, с пониженной проницаемостью поверхностных структур бактерий для антибиотиков и, во-вторых, с синтезом ферментов, разрушающих или модифицирующих антибиотики (пенициллиназа, ацетилирование хлорамфеникола).

Передача R-фактора в процессе конъюгации совершается в ближайшие 10 мин. Одна и та же донорская клетка может вступать в контакт и передавать гены резистентности более чем одной клетке. Передача R-фактора проис-

ходит с довольно высокой частотой и зависит от вида бактерий (у эшерихий, например, с частотой 1,5–7,6 %).

Распространение. Разнообразные конъюгативные R-факторы широко распространены в природе и присутствуют в бактериях многих патогенных и непатогенных видов. Особенно часто обнаруживаются среди шигелл, сальмонелл, эшерихий и стафилококков.

Способы элиминации и блокады плазмид R. Находясь в автономном состоянии, R-факторы спонтанно элиминируют, но с очень низкой частотой. Под влиянием многих ДНК-тропных веществ частота элиминации внехромосомной лекарственной резистентности резко возрастает. Такими свойствами обладают акридиновые соединения. Сходное действие обнаружено у аурантина, актиномицина, рифампицина. Нами установлено элиминирующее действие вариаций напряженности геомагнитного поля на экстрахромосомную стрептомицинорезистентность и пенициллиноустойчивость у золотистых стафилококков. Привлекают внимание антибиотики, блокирующие передачу R-факторов (неомицин, эритромицин, препараты налидиксовой кислоты). Найдено, что донорские клетки отличаются от реципиентных высокой чувствительностью к флавомицину, акрихину и некоторым другим препаратам. Поиски в этом направлении продолжаются.

Плазмиды бактериоциногении (бактериоциногенные факторы). Это экстрахромосомные генетические структуры, которые детерминируют синтез бактериоцинов – антибиотических веществ, ингибирующих бактерии.

История открытия. Впервые бактериоцины выделены от *E. coli*, поэтому они назывались колицинами, а контролирующие их плазмиды – колициногенными факторами или *Col*-факторами. Вскоре выяснилось, что многие бактерии способны выделять подобные колицинам вещества, которые по видовой или родовой принадлежности продуцентов вначале стали называть стафилококкцинами, пестицинами, корицинами, а затем – бактериоцинами или просто цинами.

Характеристика бактериоциногенного фактора. Бактериоциногенный фактор по структуре и основным свойствам относится к плазмидам. Однако в отличие от других плазмид он реже интегрирует в хромосому, редко элиминируется, многие бактериоциногенные факторы не

обладают конъюгационностью и, что особенно важно, являются потенциально летальными плазмидами, ибо их запуск сопровождается гибелью продуцента.

Конъюгационный бактериоциногенный фактор – самотрансферабельный, он может мобилизовать на перенос бактериальную хромосому и неконъюгативные плазмиды. Неконъюгационный фактор передается также F- и R-плазмидами.

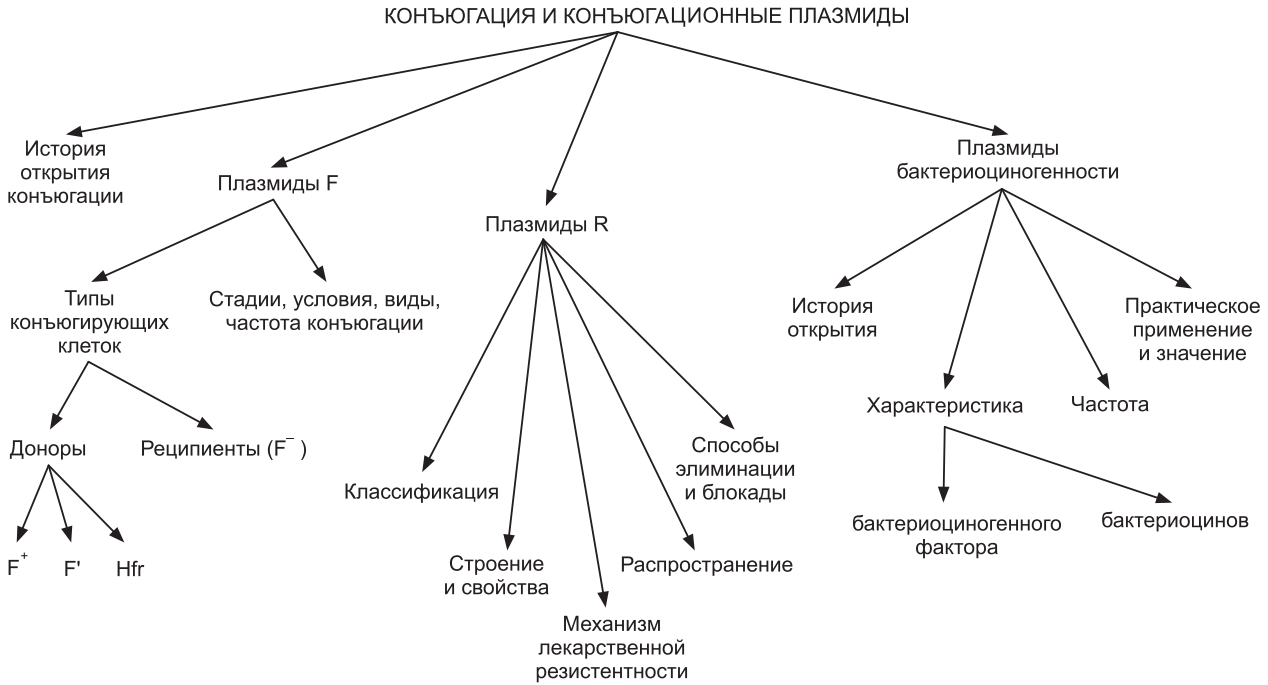
Характеристика бактериоцинов. Бактериоцины являются белками. Самые большие бактериоцины можно увидеть под электронным микроскопом, они напоминают фаговые корпускулы или отростки фага.

Бактериоцины имеют очень узкий спектр антимикробного действия, поскольку они адсорбируются лишь на тех клетках, которые имеют специфические к ним рецепторы. Бактериоцины вызывают гибель бактерий, но не лизируют их.

Механизм действия бактериоцинов изучен недостаточно. Полагают, что адсорбция бактериоцинов приводит к нарушению синтеза макромолекулярных компонентов. Бактериоцины не оказывают ингибиторного действия на клетки-мутанты, потерявшие специфические рецепторы. К ним иммунна бактериоциногенная популяция, если она продуцирует аналогичный бактериоцин.

Частота бактериоциногении. В бактериоциногенной культуре бактериоцины выделяются одной клеткой из 1000 ей подобных. Эту спонтанную продукцию бактериоцинов можно усилить воздействием на бактериальную популяцию УФ-лучей, митомицином и другими ДНК-тропными факторами. Бактериоциногения – стойкий признак бактерий, случаи ее утраты чрезвычайно редки.

Практическое применение. Способность выделять бактериоцины используется для типирования бактерий и при выявлении источников инфекции в эпидемических очагах. Так, при колицинотипировании, а точнее о*пределении чувствительности бактерий к колицинам*, в чашку Петри с 1,5 %-ным МПА уколом на некотором расстоянии друг от друга засевают суточную культуру эталонного штамма кишечной палочки, продуцирующего колицин. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 48 ч. Для инактивации выросших макроколоний в крышку чашки Петри помещают комочек ваты, смоченный хлоро-


КОНЪЮГАЦИЯ И КОНЪЮГАЦИОННЫЕ ПЛАЗМИДЫ
История открытия конъюгации
Плазмиды F
Плазмиды R
Плазмиды бактериоциногенности
Типы конъюгирующих клеток
Стадии, условия, виды, частота конъюгации
Доноры
Реципиенты (F^-)
F^+
F'
Hfr
Классификация
Строение и свойства
Механизм лекарственной резистентности
Распространение
Способы элиминации и блокады
История открытия
Характеристика
Частота
Практическое применение и значение
бактериоциногенного фактора
бактериоцинов

Граф 34

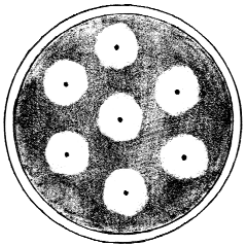


Рис. 49. Зоны ингибирования роста бактериальной культуры вокруг макроколоний, продуцирующих цины

формом, закрывают ее донной частью и выдерживают при комнатной температуре 30 мин. Сняв вату, чашку Петри переворачивают вниз дном и, для того чтобы испарился хлороформ, открывают крышку на 15 мин. Затем макроколонии заливают расплавленным и охлажденным до 45 °С полужидким 0,7 %-ным МПА, тщательно смешанным с 0,1 мл 4-часовой бульонной культуры испытуемого штамма кишечной палочки. После застывания агара чашки Петри помещают на 1 сут в термостат при температуре 37 °С. Колициночувствительность культуры определяют по величине зон задержки ее роста вокруг макроколоний, продуцирующих колицины. Чувствительным к колицину считается тот штамм, граница газона которого отстоит от края макроколонии не менее, чем на 5 мм (рис. 49).

Аналогичным образом можно установить способность продуцировать колицины у любого выделенного штамма кишечных палочек (колициногенотипирование). Для этого используют коллекцию штаммов, чувствительных к специфическим колицинам.

Значение в природе и иммунитете. Возможно, что бактериоциногенность микрофлоры обеспечивает равновесный баланс видов микробов в биоценозах, а нормальная микрофлора (кишечная палочка), выделяющая цины, – резистентность организма к возбудителям кишечных инфекций.

Трансдукция

История открытия. Трансдукция (*transductio* – перенос) – вид рекомбинации, при которой перенос генетического материала от одних клеток (доноров) к другим (реципиентам) осуществляют умеренные фаги или их мутанты. Трансдукцию бактерий открыли лауреаты Нобелевской премии Д. Ледерберг и Н. Циндер. Совместно культивируя два неодинаковых по факторам роста ауксотрофа сальмонелл мышиного тифа в разных коленах U-образного сосуда, разделенного у основания мелкопористым

фильтром, они отметили появление в одной культуре прототрофов. Далее выяснилось, что ауксотроф, на основе которого формировались прототрофы, был лизогенным и его умеренный фаг перенес к нему недостающие гены от другого, нелизогенного ауксотрофа.

Установлено, что за трансдукцию ответственны умеренные фаги, потерявшие способность лизогенизировать бактериальные клетки вследствие того, что часть их генома при неправильном отщеплении замещается фрагментом ДНК бактерии-донора (рис. 50). Такие мутанты фагов называют дефектными фаговыми корпускулами или дефектными фагами. Они всегда присутствуют в популяции фагов, освобождаемых клетками в среду после индукции или суперинфекции. С помощью трансдуцирующего фага могут передаваться многие признаки и свойства: способность сбраживать различные углеводы, синтезировать аминокислоты и витамины, резистентность к антибиотикам, вирулентность, токсигенность, жгутикообразование. При этом трансдуцирующие свойства фага не зависят от способности лизировать или лизогенизировать реципиентную клетку.

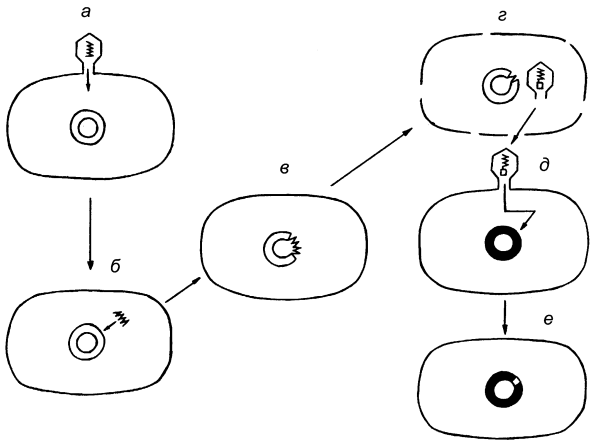


Рис. 50. Схема трансдукции:
а – введение ДНК умеренного фага в донорскую клетку; *б*, *в* – интеграция генома фага с геномом бактерии; *г* – отщепление профага с захватом клеточного гена; *д*, *е* – введение гена донора в реципиентную клетку с образованием трансдуктанта

Трансдуктанты. Образующиеся рекомбинанты называются трансдуктантами. Приобретенные в процессе трансдукции признаки стабильны и передаются по наследству. Часть клонов-трансдуктантов могут оказаться неустойчивыми и, становясь, например, гетерогенотами (клетками с неполным диплоидным набором хромосом), теряют в последующих пересевах трансдуцированные им свойства.

Виды трансдукции. По характеру передачи признаков различают три вида трансдукции – генерализованную (общую), ограниченную (специализированную) и абортивную.

Генерализованную трансдукцию осуществляют фаги с множественной локализацией на хромосоме бактерий. К ним, в частности, относится умеренный фаг *Ми-1*, содержащий линейную двухцепочечную ДНК. Геном этого фага с одинаковой легкостью включается в самые разные участки ДНК клетки, вероятно, во всевозможные, что может приводить к нарушению структуры бактериальных генов и, следовательно, к мутациям. Характерной особенностью фага *Ми-1*, отличающей его от фагов, вызывающих ограниченную трансдукцию, является то, что после включения в хромосому бактерий порядок его собственных генов в профаге сохраняется таким же, как и у внеклеточного вириона.

Фаги, участвующие в общей трансдукции, при исключении из различных участков хромосомы могут включать в свой состав и передавать клеткам-реципиентам практически любые гены донора. Размер поглощаемого сегмента хромосомы-донора определяется размером генома фага, который в 100 раз меньше хромосомы бактерии. Вследствие этого при генерализованной трансдукции передаются сравнительно небольшие участки ДНК донора. Обычно трансдуцируются единичные признаки, но возможна и множественная трансдукция, например, нескольких маркеров, контролирующих ростовые факторы и утилизацию углеводов. Следует также подчеркнуть, что трансдукция любого гена не зависит от трансдукции других генов, если между ними нет тесного сцепления. Генерализованная трансдукция возникает с низкой частотой – 10^{-4}–10^{-7} на одну фаговую частицу.

Ограниченную трансдукцию связывают с фагами, обладающими избирательной локализацией на хромосоме бактерий и способными переносить ограниченное число

генов, прилегающих к специфическим участкам интеграции. Этот вид трансдукции осуществляют умеренные фаги λ, P2, P22 и многие другие. Они передаются из клетки в клетку в процессе инфекции или из поколения в поколение, находясь в составе геномов размножающихся лизогенных бактерий. Здесь следует подчеркнуть, что лизогения очень распространена в природе, и практически все виды бактерий могут быть лизогенными по одному или нескольким фагам. Так, лизогения по фагам λ и P2 у эшерихий К-12 и по фагу P22 у эталонного штамма сальмонелл мышиного тифа стала известной только через десятки лет их использования в различных экспериментах. Все три умеренных фага, участвующих в специализированной трансдукции, – ДНК-вирионы. По строению подобны вирулентным колифагам. В частности, фаг λ имеет сперматозоидную форму с одной нитью на конце отростка.

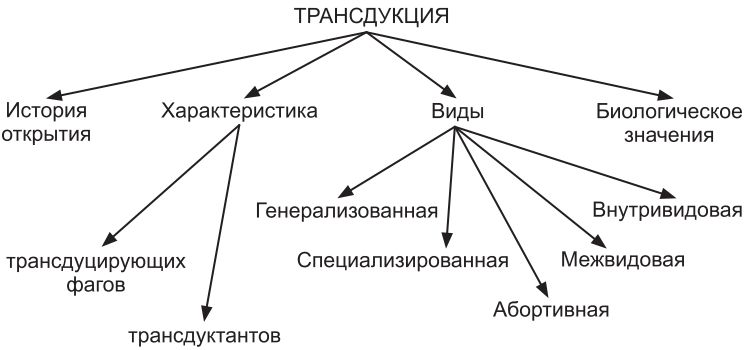
Проникнув в клетку, они обычно встраиваются в строго определенном локусе хромосомы естественного хозяина. Фаг λ, например, интегрирует с геномом эшерихий в районе галактозного локуса, контролирующего утилизацию галактозы. Естественно, что именно его чаще всего захватывает трансдуцирующий фаг.

Абортивная трансдукция отличается от первых двух тем, что перенесенный фагом фрагмент ДНК донора остается в цитоплазме реципиентной клетки в автономном состоянии. Не включаясь в хромосому клетки-реципиента, этот фрагмент ДНК в течение нескольких делений бактерий передается лишь одной клетке, а далее полностью исчезает. На протяжении указанного времени автономные гены непосредственно или через свои продукты, остающиеся в клетках, детерминируют определенные признаки (способность синтезировать вещества, подвижность и пр.). Однако выраженность перенесенных признаков крайне неотчетлива. За абортивную трансдукцию ответственны фаги, участвующие в генерализованной трансдукции. Встречается она в 10 раз чаще генерализованной.

Схема воспроизведения трансдукции. Фагочувствительный штамм бактерий-доноров инфицируется трансдуцирующим фагом. После лизиса бактерий фаговый лизат освобождается от клеток и концентрируется путем центрифугирования. Реципиентный штамм бактерий, тоже чувствительный к этому фагу, но генетически отлича-

ющийся от донорского, инфицируют полученным лизатом в условиях, благоприятных для лизогенизации. После адсорбции фага бактерии высевают на селективную среду, позволяющую дифференцировать родительские особи от трансдуктантов, которые унаследовали донорские гены, контролирующие соответствующие признаки.

Биологическое значение. Трансдукция обнаружена у многих видов бактерий: эшерихий, шигелл, сальмонелл, холерного вибриона, протея, палочек сине-зеленого гноя, стафилококков, энтерококков и др. Чаще удается внутривидовая трансдукция, т. е. фаговый перенос генетического материала в пределах определенного вида бактерий. Большой интерес представляют данные о межвидовой трансдукции и, особенно, – о возможности этого вида рекомбинаций в природных условиях. Трансдукция служит активным механизмом формирования культур с измененными свойствами и может играть большую роль в эволюции микробов.



Граф 35

Трансформация

История открытия. Трансформация – рекомбинационная изменчивость, при которой чужеродная ДНК как наследственная информация воспринимается и усваивается бактериями без участия конъюгационных плазмид и умеренных фагов.

Трансформацию открыл Ф. Гриффитс, который показал способность экстрактов капсульного пневмококка индуцировать капсулообразование и вместе с ним вирулентность у размножающихся бескапсульных пневмококков (рис. 51).

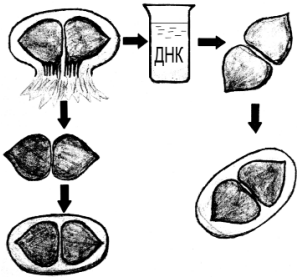


Рис. 51. Схема трансформации (работы Гриффитса и Эйвери с соавторами)

Стадии и частота трансформации. Процесс трансформации складывается из четырех основных стадий: 1) восприятие ДНК; 2) эклипс-период, в котором чужеродная ДНК как бы «исчезает»; 3) интеграция ДНК; 4) экспрессия, или фенотипическое выражение трансформантов.

Воспринимается только двухтяжевая ДНК. Процесс восприятия завершается в течение нескольких минут и даже секунд. В эклипс-периоде происходит распад двухцепочечной ДНК на одноцепочечные формы, образование синаптических связей между последними и реципиентной ДНК. Длится эклипс-фаза 10–15 мин. Интеграция осуществляется по принципу разрыв-воссоединение, причем в геном клетки включается лишь одна из цепей трансформирующей молекулы ДНК. Экспрессия донорских генов выявляется в зависимости от вида трансформируемого микроба через 1–2 ч.

При трансформации чаще всего передаются капсульные и поверхностно-соматические антигены, резистентность к лекарственным препаратам, способность синтезировать факторы роста и ферментировать углеводы.

Различные маркеры трансформируются с неодинаковой частотой. В общем, частота трансформации колеблется в пределах 0,004–0,47 %.

Условия трансформации. Формирование и фенотипическое проявление трансформантов зависят от: 1) компетентности клеток, или их готовности воспринимать чужеродную ДНК; 2) физико-химических свойств трансформирующей ДНК; 3) среды, в которой происходит трансформация.

Компетентность клеток связывают с особым состоянием структуры их клеточной стенки или с наличием на обо-

лочке бактерий специфических рецепторов для восприятия ДНК. Некоторые авторы считают, что компетентность клеток определяется экстраклеточным фактором компетентности, имеющим структуру полипептида. Готовность клеток воспринимать ДНК в наибольшей степени выражена в конце логарифмической фазы роста бактерий на протяжении очень короткого периода.

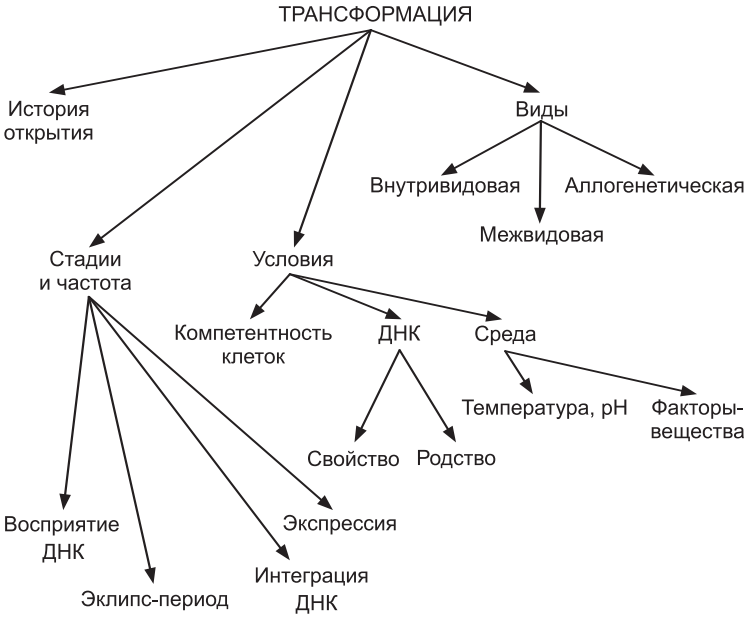
Значительную роль в трансформации играют физико-химические свойства поглощаемой ДНК. В частности, трансформирующей активностью обладают только высокополимерные, не измененные в структуре с большой молекулярной массой молекулы ДНК (не менее $5 \cdot 10^5$ дальтон). Появление трансформантов в наибольшей мере зависит от родства между нуклеотидным составом ДНК донора и реципиента.

На процесс трансформации оказывают влияние и другие факторы. Так, выход трансформантов увеличивается при температуре 29–30 °С на слабощелочной питательной среде. Частота трансформации зависит также от присутствия в среде ионов магния, бария, кальция, неорганических фосфатов. Повышает частоту трансформации альбумин, гидролизат казеина.

Схема воспроизведения трансформации. Для получения трансформантов необходима родственная в видовом отношении ДНК. В опыте используют ауксотрофный штамм-реципиент, который предварительно высевают на среду с глюкозой, гидролизатом казеина и тем метаболитом, в котором он нуждается. Выращивают его 4–12 ч при 37 °С в условиях хорошей аэрации, после чего переносят в свежую среду и подращивают еще 1,5 ч. К подготовленной таким путем культуре, в которой могут оказаться компетентные («подготовленные») особи бактерий, на 30 мин добавляют чужеродную ДНК из расчета 0,2–2,0 мкг/мл, выдерживая смесь при температуре 37 °С. Не включившуюся в реципиентные клетки ДНК устраняют ДНК-азой. Число образовавшихся трансформантов выявляют на минимальной агаровой среде путем подсчета выросших на ней колоний после засева подопытной взвеси бактерий.

Виды. Трансформация открыта у многих видов бактерий. Чаще всего она происходит между различными штаммами и вариантами микробов одного и того же вида. Такую трансформацию называют внутривидовой. Транс-

формирующую активность проявляет ДНК родственных видов микробов. Осуществить межвидовую трансформацию, использовав ДНК далеких видов, не удается. Трансформанты чаще всего приобретают один или два признака донора, реже – больше. Изредка среди трансформантов появляются клетки с необычными для донора свойствами. Такая трансформация называется аллогенетической.



Граф 36

Репродуктивные типо-варианты вирусов

Наряду с полными вирионами в процессе репродукции формируются необычные по структуре и функции вирусные частицы, которые можно объединить в три группы: псевдовирусы, вирусы-гибриды и вирусы-рекомбинанты. Псевдо- и гибридные вирионы возникают в чистых и смешанных культурах вирусов, а рекомбинантные – только в смешанных.

Псевдовирусы. Псевдовирусы представлены вирусными капсидами, но одни из них – полые, без вирусного генома, можно сказать – вирусные тени, или вирусы-пустышки, а другие – вместо вирусного генома содержат НК клетки-хозяина. Образование неполных псевдовирионов объясняют перепроизводством вирионных белков, а псевдовирионов с НК клетки – нарушением белок-нуклеинового механизма «узнавания» при сборке вирусных частиц, т. е. их возникновение обусловлено случайными обстоятельствами. В отличие от случайных, можно сказать, кажущихся вирионов, в репродуктивных циклах вирусов закономерно появляются вирусные гибриды-мутанты, по структуре и фенотипу отличающиеся от родительского (дикого) типа, но имеющие его генетическую основу, и немутационные гибриды.

Мутантные гибриды. К появлению вирусов-мутантов приводит спонтанный мутагенез, в основе которого лежит «ошибочное» спаривание во время репликации вирусов правильного азотистого основания с основанием в таутомерной форме. Скорость спонтанного мутагенеза в геномах ДНК-вирусов составляет 10^{-8}–10^{-11} на каждый включенный нуклеотид, а в вирусных РНК-геномах – 10^{-3}–10^{-4}. Более высокие скорости накопления мутаций у РНК-содержащих вирусов, вероятно, связаны с меньшей корректирующей активностью РНК-полимераз, чем у ферментов, реплицирующих ДНК. Появляющиеся при этом мутанты, как правило, являются делеционными (*deletio* – выпадение), т. е. утрачивающими определенный участок генома родительского вируса. Вирусные частицы с таким дефектным геномом сохраняют свою активность, но для репликации и созревания нуждаются в продуктах вирусного генома родителя – обычно в структурных и неструктурных белках. Такой характер воспроизводства вирусов называют негенетическим типом взаимодействия или односторонней комплементацией (дополнением); родительский вирус, стимулирующий репродукцию мутанта, – вирусом-помощником, а репродуцирующийся с его помощью мутант – вирусом-сателлитом (спутником).

В соответствии с этим различают четыре класса вирусов-мутантов: 1) вирусы с условно-дефектными геномами; 2) ДИ-частицы, т. е. **д**ефектные **и**нтерферирующие; 3) интеграционные вирусы с дефектными геномами; 4) вирусы-сателлиты.

Условно-дефектные вирусы несут мутантные геномы, дефектные в определенных условиях. Среди них чаще всего встречаются температурочувствительные *ts*- и холодочувствительные *tc*-мутанты, мутанты по спектру хозяев и мутанты по морфологии бляшек.

У *ts*-мутантов нуклеотидная последовательность в геноме изменяется таким образом, что образованный ими белковый продукт не способен сохранять функционально активную конформацию при непермиссивной (высокой температуре порядка 39–42 °С), при более низкой (пермиссивной) температуре 36–38 °С – мутант размножается. То же можно сказать о *tc*-мутантах, размножающихся при более низкой, чем оптимальная, пермиссивной для них температуре.

В меньшей мере обоснован механизм мутации по спектру хозяев и морфологии бляшек, связанный с какой-то особенностью их метаболизма. Мутации по спектру хозяев чаще идут в направлении его сужения, но некоторые мутанты приобретают способность к репродукции в несвойственных для дикого типа клетках.

Столь же разнообразны мутации по морфологии бляшек: мутанты аденовирусов с большими бляшками, например, быстрее, чем дикий тип, освобождаются из клетки, а синцитиальный мутант вируса простого герпеса вместо типичного цитопатического действия приобретает способность индуцировать образование многоядерных клеток.

Дефектные интерферирующие вирусы, или *ДИ-частицы*, представляют собой вирионы, у которых отсутствует некоторая часть геномной РНК или ДНК, но структурные белки остаются такими же, как у родительских вирусов. Как правило, длина нуклеокапсидов и размеры ДИ-частиц у них меньше родительских диких вирусов. Репликация ДИ-частиц без родительских вирионов не происходит, но при совместном заражении клеток теми и другими она восстанавливается вследствие использования генных продуктов дикого типа, которые они сами по себе не вырабатывают. Таким образом, для ДИ-частиц родительский вирус с полноценным геномом является вирусом-помощником (хелпером). Утилизируя для своей репликации продукты генов хелпера, ДИ-частицы вместе с тем угнетают репродукцию вируса-помощника, что в вирусологии называют интерференцией (*inter* – взаимно, *ferio* – подавлять), а отсюда – и само их название – «дефектные-интерферирующие».

Интеграционные вирусы с дефектным геномом – это, прежде всего, саркомные вирусы-гибриды (или виды) ретровирусов подсемейства онкорнавирусов, содержащие клеточные *onc*-гены (*oncoma* – опухоль), которые они приобрели, как предполагают, в процессе эволюции. Интегрируя с клеточным геномом, ДНК-транскрипты саркомных вирусов привносят в него *onc*-гены и если они подпадают под действие определенной регуляции клеток, то после короткого латентного периода вызывают злокачественное их перерождение. С другой стороны, при отщеплении саркомных ДНК-транскриптов клетки регулируют их репликацию. Истинными же помощниками в репликации саркомных вирусов являются лейкозные ретровирусы, которые, не имея *onc*-генов, тоже могут вызывать опухолевую трансформацию, но лишь в том случае, когда при интеграции с клеточной ДНК ее естественный онкоген попадает под контроль промотора транскрипции, расположенного в провирусе (см. «Бактериофаги» и «Онкогенные вирусы»).

Особое место среди мутантов с дефектным геномом занимают *вирусы-сателлиты*, во многом сходные с ДИ-частицами. Так же как ДИ-частицы, они паразитируют на генных продуктах вирусов-помощников и часто интерферируют с ними, примерами чему могут служить: 1) вирус-сателлит некроза табака, полностью зависящий в своей репликации от одновременного заражения клеток табака его инфекционным вирусом-помощником, и 2) вирусы-сателлиты, ассоциированные с родственными им вирусами растений, имеющими сегментированные геномы.

Часто, однако, вирусы-сателлиты используют генные продукты неродственных им вирусов-помощников с негомологичными геномами. К таким сателлитным вирусам относятся, в частности, одноцепочечные ДНК-содержащие аденоассоциированные парвовирусы, репликацию которых обеспечивают аденовирусы с двухцепочечным ДНК-геномом или ассоциированный с ДНК-содержащим вирусом гепатита В дефектный сателлитный дельта-агент с РНК-геномом, покрытый поверхностным *HBs*-антигеном своего хелпера (см. «Вирусы гепатитов»). В таких случаях невозможно доказать, от какого вируса-родственника отщепляется сателлит.

Немутационные гибриды. Среди немутационных вирусов-гибридов различают вирусы-гетерозиготы и «вирусы-

химеры». Вирусы-гетерозиготы (*heteros* – иной, чужой, *zygoo* – соединять) представляют собой вирусные частицы, в состав которых входит не один, а два различных генома вирусов или один полный с некоторой частью второго. «Вирусы-химеры» – это вирусные частицы, содержащие полный геном, заключенный в капсид, состоящий из белка другого вируса, что происходит при так называемом фенотипическом смешивании, или транскапсидизации. Образование гетерозигот – сравнительно редкое явление. Фенотипическое смешивание довольно широко распространено у близкородственных безоболочечных вирусов, таких, например, как вирусы полиомиелита типов 1 и 2, вирусов ЭКХО и Коксаки, других пикорнавирусов. Нуклеокапсиды сложных вирионов, заключенные в оболочку другого вируса, получили название *«псевдотипов»*. Таким образом, немутационные вирусы-гибриды – полноценные вирионы. Как и вирусы-мутанты, возникают путем комплементации, а не путем скрещивания геномов, как рекомбинанты.

Гетерозиготность и транскапсидизация вирусов – неустойчивые и быстро исчезающие при пассажах состояния. Биологическое значение гетерозигот не выяснено. Что касается транскапсидизации, то она может обеспечить вирусам-гибридам широкий круг хозяев и преодоление межвидовых барьеров.

Вирусные рекомбинации и вирусные рекомбинанты. Вирусной рекомбинацией называют обмен генетическим материалом (отдельных участков и целых генов) между двумя вирусами с разными геномами или же вариантами одного и того же вируса, отличающимися некоторыми структурными особенностями их генома.

Внутримолекулярные рекомбинации у вирусов, так же как и у других микроорганизмов, реализуются механизмом разрыв – воссоединение, а у РНК-вирусов с сегментированным геномом – перемешиванием генов.

В общем, у вирусов различают две группы рекомбинаций – рекомбинацию у ДНК-вирусов и рекомбинацию-пересортировку у РНК-вирусов с сегментированными геномами.

Среди генетических рекомбинаций ДНК-вирусов выделяют: рекомбинацию между двумя дикими типами вирусов с интактными (*intactus* – нетронутый) геномами; ре-

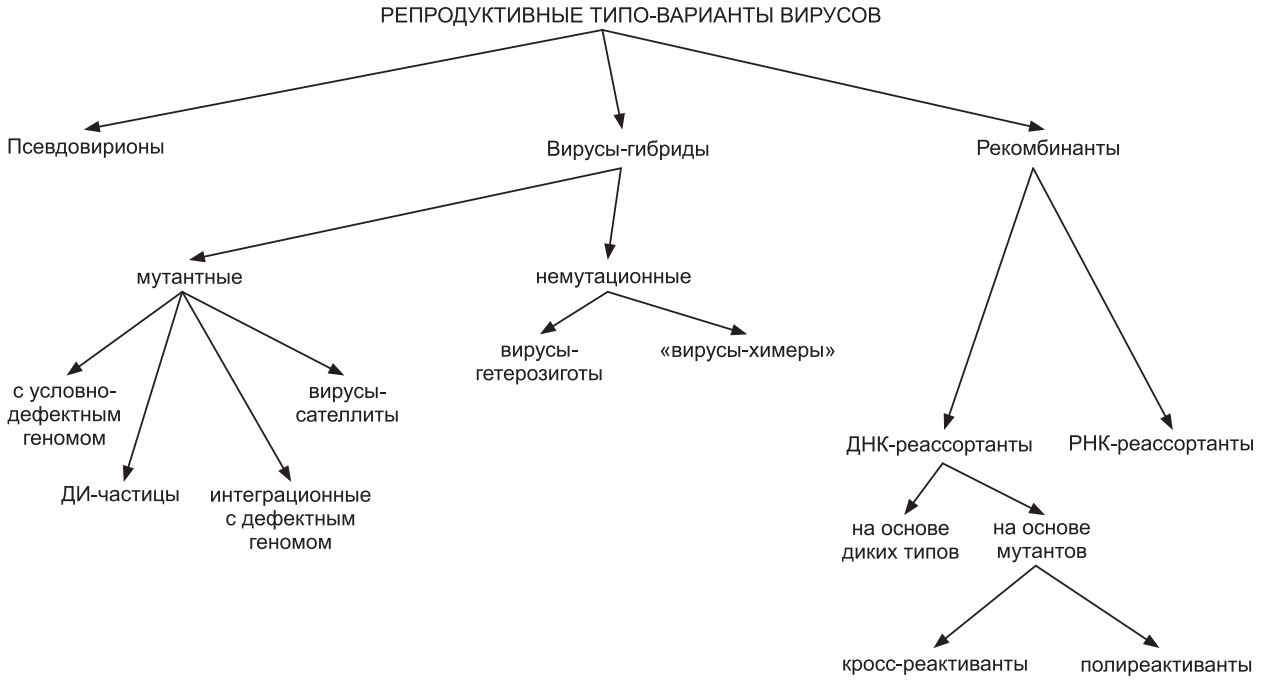
комбинацию между диким типом и его мутантным вариантом; рекомбинацию между вариантами мутантов дикого типа вируса.

Рекомбинации между дикими типами могут быть межгенными, с передачей генов, и внутригенными, с обменом отдельных участков гена. При этом образующийся вирус-рекомбинант наследует свойства обоих типов вирусов. Два других вида рекомбинаций, происходящих у ДНК-вирусов, по обменам генетического материала аналогичны с первым, но формирование рекомбинантов при них происходит на основе мутантов. В частности, рекомбинация между интактным (полным) геномом дикого типа и дефектным геномом его мутанта устраняет повреждение, т. е. восстанавливает (реактивирует) первоначальную структуру генома. Поскольку такая реактивация достигается скрещиванием полного и дефектного геномов вирусов, то ее называют перекрестной или кросс-реактивацией, а так как при ней восстанавливается утраченный признак-свойство (маркер), то ее нередко именуют феноменом «спасения маркера». Такая же реактивация повреждений геномов наблюдается в клетке при репродукции в ней нескольких мутантов вируса, но так как ее эффективность всецело зависит от количества и тесного кооперативного взаимодействия между рекомбинирующими вирусами, то ее называют не перекрестной, а множественной реактивацией.

В рекомбинационном процессе между вирусами, имеющими полный сегментированный геном, происходит перетасовка (пересортировка) их фрагментов и образование рекомбинантов, содержащих родственные, но несвойственные для дикого типа гены, например гены гемагглютининов и нейраминидаз других сероваров гриппа типа А (см. «Ортомиксовирусы»).

При парных скрещиваниях мутантов с сегментированным геномом формирующиеся на их основе рекомбинанты приобретают полный геном дикого типа лишь в том случае, когда дефектные гены у них находятся в разных фрагментах. Если же обе мутации располагаются на идентичных фрагментах – полноценных рекомбинантов не возникает.

Как предполагается, в любых случаях скрещивания РНК-вирусов с сегментированным геномом пересортировка его фрагментов происходит на стадии сборки вирионов при упаковке капсидов.


РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТИПО-ВАРИАНТЫ ВИРУСОВ
Псевдовирионы
Вирусы-гибриды
Рекомбинанты
мутантные
немутационные
с условно-дефектным геномом
ДИ-частицы
интеграционные с дефектным геномом
вирусы-сателлиты
вирусы-гетерозиготы
«вирусы-химеры»
ДНК-реассортанты
РНК-реассортанты
на основе диких типов
на основе мутантов
кросс-реактиванты
полиреактиванты

Граф 37

Таким образом, в клетке, зараженной смешанной культурой родственных вирусов с интактными генами, возникают вирусы-рекомбинанты и реассортанты, а при одновременном ее инфицировании диким типом с его мутантом или несколькими мутантами – реактиванты.

Генетического взаимодействия между биологически и эволюционно далекими вирусами в природе не происходит вследствие их высокой специфичности по спектру клеток-хозяев и интерференции, т. е. в естественных условиях из гетерологичных вирусных геномов гибридов не возникает. Долгое время невозможно было их получить *in vitro* искусственным путем. Впервые это удалось П. Бергу. В 1972 г. в Станфордском университете (США) он сконструировал рекомбинантную (гибридную) ДНК из неполного генома вакуолизирующего клетки обезьяньего вируса SV-40 и части генома умеренного фага λ, открыв тем самым путь дальнейшего исследования структуры и функции генетического аппарата вирусов и широкую дорогу к становлению и развитию генной инженерии.

Генная инженерия

Генная инженерия – это раздел молекулярной генетики, но, главное, – ветвь биотехнологии по созданию рекомбинативных ДНК (рекДНК) из различных видов организмов и вирусов, способных размножаться в реципиентной клетке или в организме и детерминировать образование биологически активных веществ, обеспечивающих потребности народного хозяйства, биологии и медицины.

Генную инженерию образно называют иногда «индустрией ДНК». Имеется твердая убежденность, что уже в ближайшие годы она должна создать новые мощности в микробиологической промышленности по производству ферментов, незаменимых аминокислот, витаминов, гормонов, антибиотиков, вакцин и других веществ. Индустрия рекомбинативных ДНК открывает практическую возможность эффективного лечения наследственных болезней обмена веществ путем реконструкции дефектных генов. Под нее разрабатываются программы получения новых разновидностей высокопродуктивных мясных и молочных пород животных, высокоурожайных сортов растений, устойчивых к вредителям и способных усваивать ат-

мосферный азот, что позволит сократить использование пестицидов и химических удобрений и тем самым оздоровить экологическую обстановку на Земле.

Конструирование генов

Конструирование комбинативных генетических структур, детерминирующих образование биологически активных веществ, других продуктов, необходимых народному хозяйству, основано на использовании двух методов – выделения (вырезания) генов и их синтезе.

Выделение генов. Гены выделяют из геномов про- и эукариот, вирионных геномов и плазмид. При этом используют особые ферменты рестриктазы (*restrictio* – разрыв), или эндодезоксирибонуклеазы, рассекающие молекулы ДНК на отдельные сегменты с липкими концами, к которым легко присоединяются другие рестриктазные фрагменты.

Первые рестриктазы получил Г. Смит, а применил их как «молекулярные ножницы» для получения генов и составления генных карт Д. Натанс, за что они совместно с В. Арбером, открывшим механизм рестрикции, в 1978 г. были удостоены Нобелевской премии.

В настоящее время генные инженеры располагают сотнями рестриктаз. Каждая из них расщепляет ДНК независимо от ее происхождения по строго определенным сайтам (участкам) узнавания нуклеотидных последовательностей. Величина получаемых при этом фрагментов зависит от их размещения в молекуле ДНК и ее длины. Так, если сайт узнавания составляет 4 пары нуклеотидов (пн), то он обычно повторяется через 256 пн, при длине 5 – через 1024, 6 – 4096, 7 – 16 384, 8 – через 65 536 пн. С учетом этого для получения фрагментов ДНК, по величине соизмеримых с генами, естественно, выбирают рестриктазы с редко встречаемыми сайтами узнавания нуклеотидных последовательностей. Такой рестриктазой, в частности, является EcoR1, образование которой детерминируется в кишечной палочке плазмидой R1. Специфически распознаваемые ею нуклеотидные последовательности встречаются в молекулах ДНК не чаще, чем через 4000–16 000 пн. Следовательно, фрагмент ДНК, образующийся под действием EcoR1, может включать два и более генов (один ген в среднем содержит 1000–1500 пн).

Полученные гены, однако, не всегда соответствуют функционирующим ввиду того, что сайты расщепления рестриктаз в исходных молекулах ДНК оказываются в их пределах. Это приводит к дроблению структурных генов или утрате ими регуляторных последовательностей. В этих случаях выделенные гены подключают к промоторам или прибегают к процедуре наращивания к ним других недостающих олигонуклеотидов. Плохо функционирующий ген активируют дополнительными вставками аналогичных ему генов, что называют тандемной амплификацией (*tandem* – один за другим, *amplificatio* – увеличение), а к генам со сдвигом рамки считывания информации добавляют линкеры (*link* – связующее звено), чтобы подстроить их под рамку считывания предшествующего гена или его фрагмента.

Успешное использование выделенного гена определяет, прежде всего, реципиентная клетка. Так, гены эукариот, в составе которых, как известно, имеются не содержащие информации интроны, не экспрессируются в клетках прокариот, так как в них не происходит процессинг и сплайсинг и к тому же недеятельными оказываются промоторы. Напротив, экспрессия генов прокариот в бактериях достигается без особых трудностей.

Синтез генов. Таким образом, выделить функционирующие гены рестриктазным дроблением генного материала микробов, клеток животного и растительного происхождения очень трудно, а получить их из геномов РНК-содержащих вирусов – невозможно по самой технике метода, ибо рестриктазы – эндодезоксирибонуклеазы. Поэтому для получения генов эукариот и РНК-вирусов был разработан метод синтеза ДНК-копий (транскриптов) на матрицах клеточной иРНК и вирионной РНК с помощью фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы, или обратной транскриптазы (ОТ), открытой, как уже упоминалось, в 1970 г. лауреатами Нобелевской премии Х.М. Теминым и Д. Балтимором. При этом ОТ получают из ретровирусов, в частности вирионов птичьего миелобластоза, саркомы Рауса, мышиной лейкемии, и с ее помощью поэтапно катализируют на РНК синтез одной, а затем и другой нити ДНК. Полученные таким искусственным путем ДНК-транскрипты на иРНК клеток часто тоже не имеют регуляторных нуклеотидных последовательностей, ибо уже изначально просто

не воспроизводятся при их транскрипции. Иначе обстоит дело с вирионными РНК. Синтезированные на них ДНК-транскрипты полностью комплементарны РНК-генам и кодируют аналогичные им генные продукты.

Передача и клонирование генов

На втором этапе генно-инженерных работ выделенные и синтезированные гены с помощью рестриктаз вводят в кольцевые специализированные молекулы ДНК-векторы (*vector* – несущий, везущий) и сшивают (лигируют) их ДНК-лигазой в единую рекДНК, способную проникать в соответствующие клетки и благодаря наличию в векторах специфических для них ДНК-репликаторов, промоторов и терминаторов размножаться и избирательно накапливать генные продукты, что называют *клонированием* молекул ДНК. Выбор вектора определяется также его безвредностью для реципиентной клетки, а системы вектор – хозяин в целом – взаимным сродством.

В зависимости от того, в каких клетках реплицируются векторы, их делят на векторы прокариот, эукариот и челночные, содержащие репликаторы генетически неродственных организмов. В генной инженерии их получают от естественных репликонов: плазмид, бактериофагов, фаго-плазмид и вирусов.

Большую часть векторов прокариот получают из плазмид бактерий, особенно тех, которые дают не 4–6 копий, как плазмида pSC101 кишечной палочки, в которую С. Коэн впервые ввел фрагмент ДНК из ооцитов шпорцевой лягушки, контролирующей синтез рибосомных РНК, и участок ДНК морского ежа, детерминирующий синтез белков-гистонов, а многократно реплицирующиеся и образующие в одной клетке несколько тысяч копий. Примером такой плазмиды может служить ColE1, контролирующая синтез колицина. К ней удалось присоединить R-плазмиды, умеренные фаги и даже гены биосинтеза триптофана, резко увеличив продукцию детерминируемых ими белков-ферментов.

Удобными векторами для бактерий и других прокариот являются умеренные фаги. Так, *in vitro* в структуру фага λ включают бактериальные гены, ДНК других фагов, ДНК мухи-дрозофилы.

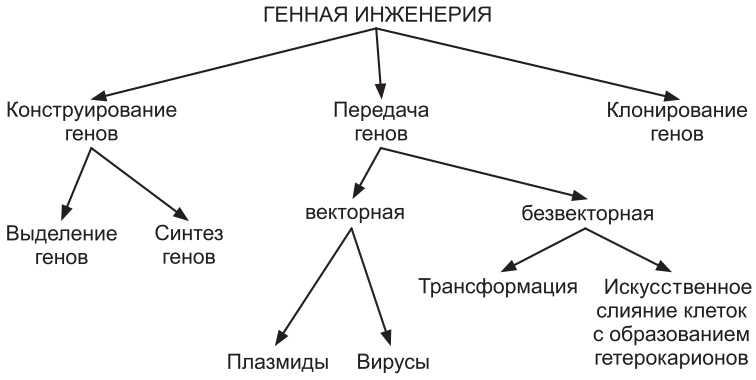
В клетки животных гены вносят при помощи векторов, сконструированных на основе полиома-, папилома-, герпес-, адено-, ретровирусов и особенно вируса SV-40 и поксвируса осповакцины, в геном которого встраивают около 10 % чужеродного генетического материала от его общей массы.

Для растительных клеток вектором могут служить плазмиды **Ti** *Agrobacterium tumofaciens*, вызывающие опухоли на корнях растений.

В тех случаях, когда подобрать вектор невозможно, прибегают к безвекторной передаче генов путем трансформации. Правда, передать гены таким образом с наибольшим успехом удается бактериям, вводя их в питательную среду. Частота трансформации бактерий прежде всего определяется степенью родства нуклеотидного состава ДНК донора и реципиента, на основе которого формируется трансформант, но зависит также от фактора компетентности, pH, ионного и белкового составов питательной среды, температуры культивирования. Компетентность бактерий, дрожжей, растительных клеток можно увеличить с помощью ферментов, разрушающих полисахаридный каркас оболочек и превращающих их в сферо- и протопласты. Эффективность трансформации у бактерий возрастает при использовании хлорида кальция и теплового удара, а у эукариот – полиэтиленгликоля, литиевых солей и высоковольтных импульсных электроразрядов, парагриппозного вируса Сендай.

И, наконец, некоторые возможности в передаче генов открывает микрохирургия, позволяющая вводить чужеродную ДНК в ядра клеток.

В результате интенсивного развития генной инженерии всего лишь за последнюю четверть XX в. получены клоны многих генов пептидных гормонов, инсулина, интерферона человека, овальбумина, коллагена, глобина, транспортных и рибосомальных РНК, гистонов и многих других. Особый интерес для биологии и профилактической медицины представляют вакцины будущего на основе безвредных рекомбинантных вирусов, в геномы которых введены гены широко распространенных инфекционных вирусов, кодирующих один или несколько специфических антигенов. Все это явилось предпосылкой для создания «банков генов» про- и эукариот на основе эталонных штаммов эшерихий и винных дрожжей.



Граф 38

АНТИБИОТИКИ

Антибиотики (*anti* – против, *bios* – жизнь) – химиотерапевтические вещества с избирательным спектром этиотропного (паразитотропного) действия, которые в ничтожно малых концентрациях подавляют размножение или вызывают гибель патогенных микробов и опухолевых клеток.

В лечебных дозах они не оказывают органотропного (токсического) влияния на организм. Эффективность (ценность) этиотропных препаратов вычисляется по химиотерапевтическому индексу. Определяют его двояким образом: делением степени паразитотропности на органотропность или наоборот. Лучшими препаратами в первом случае вычисления считаются те из них, у которых индекс бесконечно велик, а во втором – бесконечно мал. Кроме лечения инфекционных болезней (химиотерапия), антибиотики применяются для их профилактики (химиопрофилактика) и в борьбе с микробоносительством (химиосанация).

История химиотерапии. Специфически действующие на патогенные микробы лекарственные вещества были случайно найдены задолго до бактериологической эры. Так, хинную кору как лечебное средство против малярии с незапамятных времен использовали индейцы Перу, ртуть как антисифилитическое средство – арабы, а корень ипекакуаны как препарат против амебной дизентерии – древние жителя Бразилии.

Основателем научной и практической химиотерапии является немецкий ученый П. Эрлих, плодотворные исследования которого завершились в 1909 г. синтезом сальварсана, а затем – менее токсичного новарсенола, составивших эпоху в лечении сифилиса, фрамбезии, возвратного тифа и сибирской язвы. Вслед за мышьяковистыми препаратами, созданными Эрлихом на основе атоксила, в первой четверти XX в. были синтезированы атебрин, препараты сурьмы, висмута, обладающие протистоцидными свойствами.

Знаменательным в истории химиотерапии явился 1932 г., когда Г. Домагк доказал, что красный пронтозил обладает не просто ингибирующим, а бактерицидным (губительным) действием на гноеродные кокки.

Бурное развитие антибиотикотерапии бактериальных инфекций началось после того, как в 40-х гг. XX в. Х. Флори и Э. Чейн из зеленой плесени, полученной А. Флемингом (1929), выделили кристаллический бензилпенициллин, и после исследований С. Ваксмана, который из актиномицетов выделил стрептомицин. Намеченные ими пути поисков антибиотиков и предложенные Эрлихом способы их синтеза завершились созданием целого арсенала антимикробных средств в химиотерапии практически всех инфекционных болезней и лечении многих опухолей.

Классификация антибиотиков. По источнику и способу получения антибиотики подразделяют на природные, синтетические и полусинтетические, а по объекту действия – на антибактериальные, антигрибковые, антипаразитарные, антивирусные. При этом основным природным источником их получения являются почвенные микроорганизмы. Сравнительно редко используются антибиотики животного происхождения, в качестве которых можно привести интерфероны (см. «Принципы иммунотерапии»), и антибиотики растений (фитонциды), большинство из которых, являясь летучими эфирными соединениями, при изготовлении и хранении быстро утрачивают антимикробную активность.

По химической структуре различают 12 групп антибиотиков: β-*лактамы,* основой молекул которых является 4-членное β-лактамное кольцо; *полиены* (нистатин, леворин, амфотерицин В, антимикоин); *аминогликозиды*, в которых аминосахара соединены гликозидазной связью с агликоновым фрагментом; *тетрациклины*, в основе

структуры которых лежит 4-циклическая углеводородная (тетрациклиновая) система; *макролиды*, молекулу которых составляет макроциклическое лактоновое кольцо; *левомицетин* (левовращающая фракция хлорамфеникола); *антибиотики сборной группы* (рифамицины, линкосамиды, актиномицины, полимиксины и др.); *сульфаниламиды* (производные парааминобензолсульфамида); *изониазиды* (гидразиды изоникотиновой кислоты); *хинолоны* (налидиксовая кислота, циноксацин) и *фторхинолоны* (пефлоксацин, профлоксацин и др.); *нитрофураны* (фурацилин, фурагин).

Механизм антимикробного действия антибиотиков

β-лактамы, включающие бензилпенициллин с его многочисленными аналогами, цефалоспорины, полученные из грибов рода *Cephalosporium*, а также устойчивые к микробным β-лактамазам карбопенемы и монобактамы избирательно угнетают синтез пептидогликана. Лишившись основного компонента клеточной стенки, бактерии погибают от осмотического шока, а при образовании L-форм – приобретают к ним высокую степень резистентности вследствие утраты рецепторов. Аналогично проявляется антимикробное действие полимиксинов и других антибиотиков бактериального происхождения. Ванкомицин и близкие ему по природе антибиотики, имеющие трубчатую структуру, «перфорируют» стенку бактерий.

Полиены тоже нарушают целостность клеток, ингибируя, правда, не бактерии, а грибы, микоплазмы и, в меньшей степени, простейшие. Связываясь с их мембранными стеринами, они повышают проницаемость мембран, что ведет к утрате жизненно важных метаболитов цитоплазмы. Полиены ингибируют также опухолевые клетки, содержащие намного большее количество стеринов, чем у микоплазм, грибов и простейших. Установлено, что полиены снижают токсическое действие цитостатиков и в комбинации с актиномицинами усиливают их противоопухолевый эффект. Полиены можно применять для связывания свободных стеринов крови при нарушении холестеринового обмена.

Аминогликозиды всех трех поколений (кана- (1-е), гента-, сизо- (2-е), амика-, нетилмицин (3-е) и близкий им

стрептомицин), **тетрациклины** (тетра- и окситетрациклин), **макролиды** (эритро- и олеандомицин), **левомицетин** нарушают синтез белка. При этом левомицетин реагирует с пептидилтрансферазным центром рибосом в 50S субъединице, инактивируя энзиматическую систему, катализирующую образование пептидных связей белков. Макролиды и линкомицин фиксируются вблизи левомицетина и тетрациклина, аминогликозиды – на 30S субъединице рибосом. Кроме того, аминогликозиды и тетрациклины ингибируют синтез НК.

Антибиотики сборной группы – рифамицины, рифампицин – вызывают элиминацию R-плазмид, а эритромицин, полимиксины – блокируют их передачу; актиномицины и другие антибиотики с противоопухолевым и антивирусным эффектом действия так же, как митомицин, проникая в опухолевую клетку, образуют поперечные или перекрестные связи между комплементарными нитями ДНК.

Сульфаниламиды (сульфатиазол, сульфадимидин, сульфадиметоксин, сульфален и др.), будучи антиметаболитами парааминобензойной кислоты, захватываются бактериями и блокируют образование фолиевой кислоты, являющейся коферментом в реакциях биосинтеза аминокислот, азотистых оснований и витаминов, а **изониазиды** (фтивазид, метазид, опиниазид), проникнув в клетки, трансформируются в изоникотиновую кислоту, которая замещает никотиновую в коферменте 1, что приводит к ингибированию синтеза НК, белков и липидов у микобактерий туберкулеза.

Хинолоны связывают ионы металлов (в том числе Fe), необходимые для активации ферментных систем бактерий, амеб и некоторых грибов, а **фторхинолоны** – блокируют фермент ДНК-гиразу, в результате чего происходит сверхскручивание ДНК, гидролиз АТФ, нарушение проницаемости мембраны и лизис микробов. Таким же эффектом действия обладают **нитрофураны**, но клеточную стенку микробов они повреждают, блокируя НАД·Н, цикл трикарбоновых кислот и ряд других биохимических процессов.

Полусинтетические антибиотики. Расшифровав структуру антибиотиков, химики разработали ряд синтетических способов их получения, но самым надежным из них оказался уже испытанный в прошлом при синтезе сальварсана и новарсенола «принцип химических вариаций»

Эрлиха, основанный на частичном изменении исходной молекулы путем замещения в ней соответствующих радикалов на такие, которые повышают паразитотропность и снижают органотропность. Особенно большие успехи в этом направлении были достигнуты при получении полусинтетических аналогов бензилпенициллина. Заменяя в нем бензильную группу на остатки молекул других органических соединений, химики создали многие десятки полусинтетических пенициллинов, отличающихся от природного более широким спектром антимикробного действия, устойчивостью к бактериальным β-лактамазам (пенициллиназе), соляной кислоте и ферментам желудочно-кишечного тракта. В частности, пенициллиназоустойчивые оксациллин, клоксациллин, флуклоксациллин незаменимы при лечении гнойных инфекций, вызванных антибиотикорезистентными стафилококками. Ампициллин, карбенициллин, карфециллин, бакампициллин, ампиокс-натрий (оксациллин с ампициллином) и другие их комбинации в отличие от бензилпенициллина подавляют не только грамположительную, но и грамотрицательную микрофлору (синегнойную палочку, эшерихии, протей, гемофильные бактерии). Подобно этому на основе аминоцефалоспориновой кислоты были синтезированы цефалоспорины всех трех поколений, в частности цефалоридин и цефалексин (I), цефуроксим и цефокситин (II), цефтизоксим и цефоперазон (III).

Большими преимуществами обладают также производные тетрациклинов. Так, метациклин и доксициклин характеризуются лучшей всасываемостью, пролонгированным действием, большой лечебной эффективностью и практически не вызывают побочных реакций. Из рифампицина SV был получен рифампицин более активный, чем исходный препарат, в отношении грамотрицательных бактерий, а главное, один из самых эффективных туберкулостатических средств.

По конечному эффекту действия на бактерии антибиотики классифицируются на *бактериостатики* и *бактерицидные препараты*, т. е. угнетающие развитие бактерий и вызывающие их гибель. Бактерицидными свойствами обладают пенициллин и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины и аминогликозиды. Другие группы антибиотиков оказывают бактериостатическое действие.

При этом их активность выражается в международных единицах. *За единицу действия пенициллина принимают антибактериальную активность, которой обладает 0,6 мкг стандартного бензилпенициллина. Единица действия других антибиотиков, которые вводятся парентерально, равнозначна 1 мкг сухого препарата.*

Терапевтическая эффективность антибиотиков. Антимикробная эффективность антибиотиков определяется пролиферативной активностью культуры. Наиболее чувствительны к ним микробы в экспоненциальной фазе развития. В лаг-фазе и стационарной фазе, в изотоническом растворе, при низких температурах, когда задерживаются процессы метаболизма, антибиотикочувствительность бактерий резко снижается. В организме действие антибиотиков зависит от их связи с белками крови и тканевой жидкостью. Обратимые комплексы не утрачивают терапевтической активности и часто имеют положительное значение, так как, постепенно диссоциируя, обеспечивают пролонгированный эффект. В недиссоциированных связях антибиотики полностью инактивируются и могут проявлять токсическое влияние на организм или вызывать аллергию.

Антимикробное действие антибиотиков определяется также локализацией микроорганизмов. При внутриклеточном их расположении антимикробный эффект антибиотиков ничтожно мал. Это объясняется плохой диффузией антибиотиков через оболочку фагоцита и биологическую мембрану фагосомы. Внутри фагоцита и особенно в фагосоме, где снижены содержание кислорода и pH среды, активность антибиотиков резко падает, а аминогликозиды, наделенные основными свойствами, полностью инактивируются. При оценке этиотропного действия антибиотиков *in vivo* надо также учитывать, что у бактерий, находящихся внутри клеток, понижен метаболизм, и поэтому они обладают «физиологической устойчивостью». Такой механизм лекарственной резистентности, в частности, присущ всем персистирующим бактериям.

Наконец, терапевтическая эффективность антибиотиков зависит от степени чувствительности к ним патогенных бактерий, которая определяется их видовыми особен-

ностями, в частности проницаемостью клеточной стенки, мутационной способностью, наличием у них хромосомных генов резистентности и R-плазмид. Так, клеточная оболочка грамотрицательных бактерий для большинства антибиотиков менее проницаемая, чем у грамположительных, особенно когда они проявляют выраженную гидрофильность (тетрациклины, аминогликозиды, макролиды). В такой же мере проницаемы для антибиотиков *S*- и *R*-формы бактерий, отличающиеся тем, что у первых содержится большое количество липополисахаридов, а вторые – в процессе модификации или мутации утрачивают значительную их часть. Проникновение ряда антибиотиков может также зависеть от переноса электрона к атому кислорода, вследствие чего аминогликозиды, например, малоэффективны в отношении анаэробов. Отдельные виды патогенных бактерий снижают активность антибиотиков посредством связывания их с муреингидролазами. Кодируемые хромосомными генами ферменты бактерий инактивируют антибиотики. В частности, β-лактамазы, продуцируемые стафилококками и грамотрицательными бактериями, разрушают β-лактамные кольца в молекулах пенициллинов и цефалоспоринов, а R-плазмиды, обеспечивающие множественную лекарственную устойчивость бактерий, кодируют синтез ферментов, модифицирующих другие группы антибиотиков (см. «Плазмиды»). Вышеприведенное диктует необходимость в определении антибиотикочувствительности патогенных бактерий, выделенных из патологических материалов, для выбора наиболее эффективного способа лечения инфекционных больных.

Методы определения лекарственной чувствительности бактерий

Испытание на чувствительность бактерий к антибиотикам проводят, используя серийные разведения препаратов в жидких и плотных питательных средах и методы их диффузии в агаровые среды. При этом определяют минимальную ингибирующую (бактериостатическую) концентрацию (МИК) и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) лекарственных веществ.

Методы серийных разведений антибиотиков в мясопептонном бульоне и мясопептонном агаре

Метод разведений в МПБ (табл. 3). В ряд пробирок, кроме первой, наливают по 0,5 мл бульона. В первую и вторую вносят 0,5 мл раствора антибиотика, содержащего 50 ЕД. Разведенный в 2 раза антибиотик из второй пробирки в количестве 0,5 мл переносят в третью и таким же «перекатом» – во все последующие, а из последней – лишние 0,5 мл удаляют. Сделав двукратные разведения антибиотика, бульоны засевают 1,5 мл разведенной 1:1000 бульонной культуры испытуемого штамма бактерий. Посевы помещают в термостат при температуре 37 °С и через 10–18 ч учитывают МИК и МБК, т. е. наименьшую концентрацию препарата, вызвавшую полную задержку роста бактерий, и такую же его концентрацию, которая привела к их гибели.

Таблица 3. **Определение антибиотикочувствительности бактерий в МПБ**

Ингредиенты	Номера пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Контроль
МПБ	–	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5 →	0,5	0,5
50 ЕД антибиотика	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5↓	–
Бульонная культура, 1:1000	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Разведение антибиотика, мкг	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,10	–

Метод разведений в МПА. Подготовив по 1 мл двойных разведений препарата от 1:10 000 до 1:320 000, поочередно вносят их в 9 мл расплавленного и охлажденного до 45–50 °С питательного агара и, быстро смешав, выливают в чашку Петри. После застывания агара дно чашки делят на сегменты, которые засевают испытуемыми видами (штаммами) бактерий, а один из них – культурой с известной антибиотикочувствительностью. Одновременно ими можно засевать контрольную чашку Петри без препарата. Среды помещают в термостат при температуре 37 °С на 18–20 ч и затем определяют бактериостатическую концентрацию препарата.

Методы диффузии антибиотиков в агаровые среды

Классический метод диффузии. Свежеприготовленная и подсушенная в течение 20 мин при 37 °С среда засевается равномерным слоем свежевыросшей культуры. После ее впитывания пробойником или горлышком агглютинационной пробирки в ней делают лунки, в которые вносят по 0,1 мл раствора испытуемых антимикробных препаратов и чашку, не переворачивая вверх дном, осторожно переносят в термостат. Спустя 18 ч определяют активность антибиотиков по диаметру зон подавления роста тест-микроба вокруг тех лунок, в которых они содержались.

Метод диффузии препаратов из бумажных дисков. Свежевыросшую исследуемую культуру бактерий (2 млрд м. т./мл) газоном высевают на питательный агар в чашках Петри, избыток отсасывают пастеровской пипеткой. Среду подсушивают и на ее поверхность стерильным пинцетом на расстоянии 2 см друг от друга накладывают стандартные бумажные диски, пропитанные различными антимикробными препаратами. Результаты учитывают после 16–18 ч выращивания при температуре 37 °С, измеряя диаметры зон задержки роста бактерий вокруг бумажных дисков. Сравнивая их величины с прилагаемыми к дискам инструктивными указаниями, определяют, к каким препаратам тест-микроб чувствительный, умеренно чувствительный и резистентный, т. е. может расти даже у края дисков (рис. 52).

Комбинированная антибиотикотерапия. Сочетанное применение антибиотиков преследует решение двух основных целей – усиление этиотропного действия при одновременном снижении токсического влияния препаратов на больной организм. При этом комбинации бактерицидных антибиотиков-синергистов и бактериостатиков, обладающих аддитивным (дополнительным) действием, позволяют повысить антимикробную эффективность каждого из них, расширить спектр действия и предотвратить развитие лекарственно-устойчивых популяций микробов. Антагонизм проявляет-

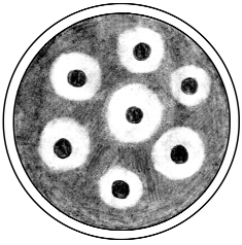


Рис. 52. Зоны торможения роста бактериальной культуры вокруг бумажных дисков, пропитанных антибиотиками

ся лишь в сочетаниях бактерицидных антибиотиков с бактериостатиками, ввиду того что последние, угнетая обмен веществ микробной клетки, снижают ее чувствительность по отношению к первым.

Побочное действие антибиотиков. Различают прямое и косвенное побочное действие антибиотиков. Прямое побочное действие обусловлено органотропностью антибиотиков и выражается в структурных и функциональных изменениях со стороны различных органов и тканей. Так, некоторые из них неблагоприятно влияют на нервную систему, слуховой аппарат, почки, вызывают хромосомные аберрации в соматических и половых клетках. Многие люди отличаются повышенной чувствительностью к антибиотикам и реагируют на их введение крапивницей, отеком слизистых и кожных покровов, другими аллергическими реакциями, а иногда – анафилактическим шоком. Косвенное побочное действие, связанное с паразитотропностью препаратов, проявляется подавлением иммунного ответа на антиген, что ведет к формированию малонапряженного иммунитета, не обеспечивающего устойчивости к реинфекции. Длительное применение антибиотиков приводит к образованию в организме больного лекарственнорезистентных, антибиотикозависимых и атипичных форм микробов, что затрудняет бактериологическое подтверждение диагноза и процесс лечения. Самым неблагоприятным косвенным побочным действием считается дисбактериоз как следствие ингибирования антимикробным препаратом нормальной микрофлоры.

Противовирусные препараты

К избирательно действующим на вирусы веществам можно, прежде всего, отнести препараты, ингибирующие их адсорбцию на клетках, процессы проникновения и раздевания вирионов. К ним, в частности, относятся дизоксарил, препятствующий высвобождению вирусных нуклеокапсидов в результате взаимодействия с суперкапсидами, и производные адамантана ремантадин и амантадин, ингибирующие репродукцию вирусов кори, краснухи, везикулярного стоматита, вирус гриппа, особенно – типа А.

Более широко используются аналоги нуклеотидов (аномальные нуклеозиды), сходные с пуриновыми и пири-

АНТИБИОТИКИ
Свойства (химиотерапев-тический индекс)
История химиотерапии
Классификация
по способу получения
по объекту действия
по химической структуре
Механизмы антимикробного действия
Полусинтетические антибиотики
Эффективность
Определение антибиотико-чувствительности
Комбинированная терапия
Побочное действие
Противовирусные препараты

Граф 39

мидиновыми основаниями. Среди них чаще всего применяют йодоксиуридин и трифторидин (пиримидиновые аналоги) и цитозинарабинозид, ациклогуанозин (ацикловир), ганцикловир, фамцикловир, видарабин (пуриновые аналоги), ингибирующие ДНК-полимеразы вирусов. Особое место среди аномальных нуклеозидов занимает аналог гуанозина рибавирин, отличающийся от других тем, что обладает универсальной способностью подавлять как ДНК-, так и РНК-полимеразы вирусов.

Близкими к аномальным нуклеозидам по конечному эффекту антивирусного действия являются производные тиосемикарбазонов, в особенности N_1-метилизатин-β-тиосемикарбазон (метисазон), который ингибирует синтез поздних иРНК, что нарушает сборку дочерних популяций поксвирусов, а также саквинавир, ритонавир, индинавир и другие синтетические пептиды, которые конкурентно подавляют протеазы вирусов. В инфицированных ими клетках постепенно накапливаются нерасщепленные предшественники *gag*-полипротеина, проявляющие цитотоксическое действие. Угнетают вирусы также антифолиевые препараты (аминоптерин и метатрексат) и виналкалоиды (винкристин и винбластин).

Ведутся поиски ингибиторов обратной транскриптазы. К такого рода препаратам относятся зидовудин (азидотимидин) и его аналоги залцитабин, ставудин, диданазин, встраивающиеся вместо тимина в нуклеотидную цепь гена, контролирующего образование обратной транскриптазы. Синтезированы также препараты, обладающие способностью ингибировать обратную транскриптазу и ДНК-полимеразу. К ним, в частности, относится фоскарнет.

Примечание. Противогрибковые и антипротозойные препараты представлены в соответствующих главах раздела «Частная микробиология».

ИНФЕКЦИЯ (ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ)

Инфекцией (*infectio* – заражение) в медицине часто называют микроб, болезнь и даже акт заражения, но в микробиологии и инфекционной патологии под этим термином понимают эволюционно сложившуюся антагонистическую форму симбиоза между болезнетворными микро-

бами и макроорганизмом, проявляющуюся в виде инфекционного процесса (явной и скрытой болезни) или микробоносительства. При этом оба конкурента равноценны, и совершенно неправильно выделять одного из них в качестве основы инфекции. Различные формы проявления инфекции, или инвазии, как ее называют в протозоологии, обусловливаются биологическими и социальными факторами окружающей среды.

Свойства патогенных макроорганизмов

Группу микробов, вызывающих инфекционные болезни, называют патогенными или условно-патогенными, противопоставляя их неболезнетворным сапрофитам. Патогенность – генетически детерминированный признак, но под воздействием факторов окружающей среды она может подвергаться фенотипической изменчивости. Для обозначения степени патогенности и ее количественного выражения введено понятие *вирулентность*, под которой понимают показатель болезнетворной активности штамма, биовара, вида микроорганизма (например, золотистый стафилококк более вирулентен, чем другие виды, то же можно сказать об американской и европейской разновидностях возбудителя туляремии).

Факторы патогенности. К основным факторам вирулентности микробов относят их способность заражать (инфекциозность), внедряться в организм (инвазивность), колонизировать (заселять) очаги локализации и продуцировать токсины. Инвазивность, или способность к распространению, обусловлена: 1) адгезией (прикрепление), в основе которой лежит наличие у микробов адгезинов, или факторов колонизации, – специализированных молекул (в основном белков и липополисахаридов), взаимодействующих с рецепторным аппаратом чувствительных клеток; 2) особыми веществами-инвазинами (*invasio* – проникать), способствующими проникновению внутрь клеток посредством эндоцитоза; 3) ферментами инвазивности, повышающими проницаемость тканей, в частности гиалуронидазой (муциназой), расщепляющей гиалуроновую кислоту, в результате чего снижается вязкость соединительной ткани; нейраминидазой, отщепляющей от гликопротеидов, гликолипидов и полисахаридов сиаловую

(нейраминовую) кислоту; фибринолизином, растворяющим сгустки фибрина; коллагеназой, разрушающей тканевые белки. Колонизируя очаг инфекции, одни микробы размножаются на поверхности клеток, а другие, обладающие большей инвазивностью, – в их цитоплазме.

Выживание и размножение микробов в каждом отдельном случае могут обеспечивать вырабатываемые ими *протеазы*, расщепляющие антитела; *каталаза*, нейтрализующая токсические пероксиды, вырабатываемые макрофагами; *лецитовителлаза*, расщепляющая лецитин, содержащийся в оболочках эритроцитов, мышечных волокон и других клеток; *коагулаза*, свертывающая плазму крови с выделением фибрина, который, обволакивая бактерии, защищает их от фагоцитоза и действия антител; *уреаза*, гидролизующая мочевину с образованием аммиака; *аминокислотные декарбоксилазы*, катализирующие процессы отщепления от них карбоксильных групп с образованием диоксида углерода; *ДНК-азы*, вызывающие деполимеризацию ДНК. Факторами защиты у бактерий, предохраняющими их от быстрого распознавания иммуноцитами и поглощения фагоцитами, являются капсулы, но если они все-таки фагоцитируются, то капсульное вещество защищает микробы от разрушающего действия лизосомальных ферментов и токсических оксидантов, продуцируемых фагоцитами.

Среди структурных элементов и продуктов метаболизма бактерий отчетливо выраженной патогенностью обладают капсульные полисахариды пневмококков и полипептид Д-глутаминовой кислоты сибиреязвенных бацилл; белки шипов нейссерий, фимбрий стрептококков и других бактерий, ингибирующих фагоцитоз; белки типа А наружной стенки стрептококка, блокирующие действие антител.

Самыми мощными и лучше всего изученными факторами патогенности бактерий являются экзо- и эндотоксины.

Экзотоксины представляют собой белки разнообразной молекулярной массы, отличающиеся резко выраженной ядовитостью. Многие из них обладают свойствами ферментов и способностью усиливать фармакологическое действие других токсических веществ, некоторые наделены свойствами гемолизинов и лейкоцидинов. Экзотоксины стафилококков и стрептококков, обладая сродством к рецепторам Т-лимфоцитов, вызывают вначале их гиперактивацию, а затем – массовую гибель, что нередко обус-

ловливает развитие иммунодефицита. В зависимости от прочности связи с бактериальной клеткой различают три группы экзотоксинов: А – секретируемые во внешнюю среду (холероген, стафилококковый, дифтерийный, сибиреязвенный); В – частично секретируемые (токсины бактерий коклюша, клостридий столбняка, ботулизма, газовой гангрены); С – прочно связанные с микробной клеткой (экзотоксины энтеробактерий, «мышиный токсин» возбудителя чумы). По специфическому характеру их действия на органы, ткани и клетки выделяют нейротоксины, энтеротоксины, дерматонекротоксины, гемолизины, лейкоцидины, а по механизму действия – мембранотоксины, повреждающие мембраны клеток, цитотоксины, или антиэлонгаторы, нарушающие элонгацию (удлинение) полипептидных цепей при их синтезе на рибосомах, и функциональные блокаторы, нарушающие, например, передачу импульсов (нейротоксин столбнячной палочки) или же обмен веществ (энтеротоксины). Будучи белками, экзотоксины лабильны к действию факторов окружающей среды, легко разрушаются под влиянием пищеварительных ферментов и при нагревании до 60–80 °С в течение 10–60 мин. Под действием 0,3–0,4 %-ного формалина и температуры 37–39 °С спустя 30 дней экзотоксины превращаются в безвредные анатоксины, используемые как вакцины. Образование бактериальных экзотоксинов детерминируется генами токсигенности умеренных фагов, лизогенезирующих коринебактерии дифтерии и золотистый стафилококк, генами плазмид у эшерихий и даже генами, ответственными за спорообразование у клостридий газовой гангрены.

Эндотоксины – это комплекс протеиновых, липидных и полисахаридных остатков, прочно связанных со структурами бактерий и выделяющихся после их разрушения. В небольших дозах они относительно малотоксичны, но в высоких концентрациях вызывают тяжелую интоксикацию или даже эндотоксинный шок, обычно заканчивающийся смертью больного. В отличие от экзотоксинов, не обладают избирательностью действия на отдельные органы и ткани. Отличаются высокой термоустойчивостью; многие из них выдерживают не только кипячение, но и автоклавирование. Мало чувствительны к химическим веществам и под влиянием формалина не переходят в анатоксины. Образование эндотоксинов кодируют хромосомные гены.

Определение вирулентности микроорганизмов. О вирулентности микробов в целом и ее составляющих (токсичность, токсигенность) судят по их способности вызывать гемолиз, протеолиз, разрушать НК, некротизировать кожу у лабораторных животных, а чаще – по результатам их выживания, определяя *Dlm* (*Dosis letalis minima*) или LD_{50}, т. е. минимальное количество бактерий, вызывающих полную или частичную (50 %) их гибель. С этой целью исследуемые бактерии выращивают на плотных питательных средах. Выросшие культуры смывают и, подобрав по оптическим стандартам мутности определенную концентрацию микробов, разводят в пептонной воде, получая десятикратно уменьшающиеся дозы. Для этого в ряд пробирок наливают по 1,8 мл пептонной воды. В первую вносят 0,2 мл исходной бульонной взвеси бактерий и, смешав ее, тот же объем переносят во вторую, из второй – в третью и т. д. (табл. 4).

Таблица 4. **Определение Dlm Streptococcus pneumoniae на мышах**

Метка мыши	Способ заражения	Разведение	Результаты		
			Выживаемость	Бактериоскопия	Бактериологическое исследование
1	По 0,2 мл внутрибрюшинно	10^{-2}			
2	-«-	10^{-3}			
3	-«-	10^{-4}			
4	-«-	10^{-5}			
5	-«-	10^{-6}			

Полученные разведения бактерий по 0,2 мл вводят внутрибрюшинно 2–3 белым мышам массой 18–20 г. Стрептококки относят к вирулентным, если мыши погибают через 36–48 ч.

Более информативный как показатель вирулентности – LD_{50}, так как в отличие от *Dlm* в малой степени зависит от индивидуальной чувствительности животных. Поскольку трудно подобрать точную дозу, которая бы вызвала гибель 50 % взятых в опыт животных, несколькими 10-кратными разведениями культуры заражают по 5–7 мышей; подсчитывают количество погибших животных в каждой группе и при помощи специальных таблиц определяют LD_{50} методом статистического учета.

Методы изучения инфекционного процесса

К экспериментальному заражению животных прибегают также при невозможности выделения чистых культур микроорганизмов на питательных средах, при определении терапевтической эффективности химиопрепаратов и изучении патогенеза инфекционной болезни.

Для заражения используют белых мышей, морских свинок, крыс, кроликов, реже – хорьков, хлопковых крыс, птиц и обезьян. В научных исследованиях предпочтение отдают линейным животным, выведенным путем родственного скрещивания (инбридинга).

Инфицируют животных накожно, подкожно, внутрикожно, внутримышечно, внутривенно, в мозг, на слизистые оболочки, через рот, нос.

Подготовка животных к заражению и техника их инфицирования. В опыт отбирают подвижных и хорошо поедающих корм здоровых животных.

Мелких животных маркируют анилиновыми красителями или нанесением маркерных знаков, выбривают, выстригают, удаляют депиляторами шерсть, кожу дезинфицируют спиртом или йодной настойкой.

Выполняя подкожные и внутрикожные инъекции, кроликов и морских свинок кладут на бок, одной рукой держат задние конечности, а другой – обхватывают грудную клетку, вводя пальцы в подмышечные впадины. При взятии крови из сердца животных кладут на спину, растягивая в стороны и немного вверх передние конечности. Мышей берут правой рукой за хвост, опускают на стол, двумя пальцами левой руки прижимают туловище и, передвигая их по спине животного, захватывают кожу над головой, правой рукой растягивают туловище за хвост, фиксируя его между мизинцем и ладонью левой руки (рис. 53).

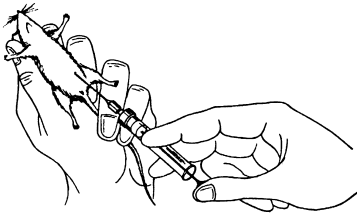


Рис. 53. Техника заражения белой мыши

Заражают животных материалом или взвесью микроорганизмов, удалив из шприца воздух в комочек стерильной ваты, наложенный на поднятое вверх острие иглы. Инфи-

цированную вату снимают пинцетом и погружают в дезинфицирующий раствор.

Подкожные инъекции вводят, по возможности, глубже, преимущественно в складки кожи, образующиеся при захватывании ее двумя пальцами. Кроликов и морских свинок удобнее инфицировать, если они находятся в положении на спине или животе, а крыс и мышей – на спине, у корня хвоста.

При внутрикожном введении необходимы полное удаление шерсти и наличие тонких и острых игл. Кожу животного растягивают двумя пальцами левой руки. Иглу вводят острием кверху в поверхностный слой эпидермиса. На месте инъекции 0,1–0,2 мл жидкости появляется четко отграниченное возвышение («лимонная корочка»), которое не исчезает в течение 3–5 мин.

Накожное заражение выполняется путем втирания материала стеклянной палочкой в неповрежденную или скарифицированную кожу спины, ближе к голове, чтобы животное не могло это место вылизывать.

При *внутрибрюшинном заражении*, опустив животное головой вниз, иглу вводят в левую нижнюю треть живота, чтобы не повредить кишечник.

Для *внутривенного заражения* кроликов используют краевую ушную вену; край уха смазывают ксилолом или, зажав его у основания, поколачивают щелчками, что улучшает ее кровенаполнение. Мышам и крысам инъекции делают в хвостовые вены. Для их выявления сдавливают корень хвоста или на него накладывают комочек ваты, смоченный горячей водой. Морских свинок заражают в отсепарированную вену внутренней поверхности бедра, после чего на рану накладывают швы.

При *внутрисердечном заражении* (*взятии крови*) кролика или морскую свинку фиксируют, как описано выше. Шерсть с левой стороны груди выстригают, кожу дезинфицируют. Большим пальцем левой руки легко надавливают на правую сторону грудной стенки животного, а указательным – нащупывают толчок сердца и одновременно определяют положение ребер. Иглу вводят в место толчка в межреберный промежуток перпендикулярно грудной клетке. Сигналом нахождения иглы в полости сердца служит толчками поступающая в шприц кровь. При взятии большого количества крови от животного ему под кожу

вводят тот же объем стерильного изотонического раствора натрия хлорида.

Другие способы заражения животных применяются реже, в частности интрацеребральное и субдуральное инфицирование – при выделении и дифференциации вирусов; интратестикулярное – при определении видовой принадлежности риккетсий; интраокулярное и пероральное – при идентификации энтеробактерий.

Зараженных животных содержат в теплом и сухом помещении в клетках или высоких стеклянных банках, закрывающихся сверху металлической сеткой. Регулярно кормят полноценной пищей.

Бактериологическое исследование павших животных. Основная цель бактериологического исследования погибших животных – обнаружение и определение локализации микроорганизма, вызвавшего гибель животного, и выделение его в чистой культуре. При этом вскрывать их необходимо как можно скорее после гибели, так как кишечная флора даже при температуре холодильника проникает уже через 20–24 ч во все ткани и органы.

Трупы вскрывают, фиксируя животных на хорошо выструганной окрашенной доске (рис. 54) стерильными инструментами, предварительно смочив шерсть дезинфицирующим раствором.

Данные вскрытия протоколируют с указанием даты заражения и характера введенного материала или вида микроорганизма.

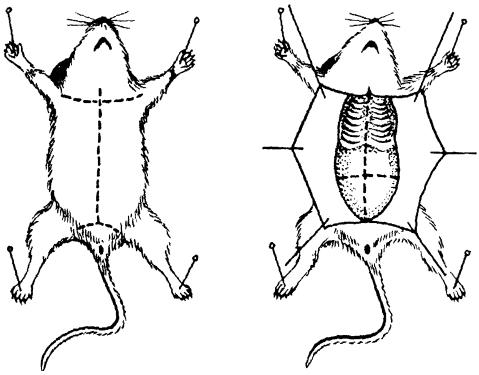


Рис. 54. Фиксация трупа животного для вскрытия

Вскрытие начинают с продольного разреза кожи от нижней челюсти до лобка. Кожу отсепаровывают, делая надрезы по направлению к конечностям. Лоскуты откидывают в стороны, обнажая переднюю поверхность трупа. Отмечают состояние подкожной клетчатки и лимфатических узлов. Если последние изменены, делают посевы на питательные среды и препараты-отпечатки. Использованные инструменты погружают в дезинфицирующий раствор.

При вскрытии *грудной полости* участок в ее проекции смачивают спиртом и поджигают его. Пинцетом захватывают мечевидный отросток, делают поперечный разрез под ним и два продольных, перерезая ребра в местах их соединения с хрящами. Лоскут в виде треугольника отбрасывают кверху и изучают органы грудной клетки, отмечают наличие экссудата, производят посев крови и делают препараты-отпечатки из ткани легких. *Кровь из сердца* берут пастеровской пипеткой; предварительно разрезают сердечную сорочку и прижигают поверхность мышцы сердца, прикладывая раскаленный скальпель. Вслед за этим в область желудочка или предсердия вводится капилляр пипетки. Поступившую в нее кровь высевают на питательные среды, а из остатка делают мазки.

При вскрытии *брюшной полости* следует избегать повреждения кишечника. Для этого пинцетом приподнимают брюшную стенку и разрезают ее ножницами от диафрагмы до лобка с двумя поперечными разрезами к конечностям. Отвернув мышечные лоскуты, иссследуют органы брюшной полости, обращая особое внимание на размеры, цвет и консистенцию селезенки, печени, надпочечников.

Высевают брюшной экссудат, ткань селезенки и печени. Поверхность органа прижигают раскаленным скальпелем, и на этом участке выполняют разрез, после чего бактериальной петлей делают соскоб из него. Для приготовления мазков вырезают небольшой кусочек ткани, берут его пинцетом и прикасаются к поверхности стекла (препарат-отпечаток) или распределяют тонким слоем.

После вскрытия трупы мелких животных сжигают или автоклавируют. Все инструменты, кювету и доску для фиксации обрабатывают дезинфицирующими растворами.

Резистентность и восприимчивость макроорганизма

Основными свойствами макроорганизма, которые определяют возникновение, течение и исход инфекции, являются генетически детерминированные резистентность и восприимчивость. Резистентность – это устойчивость организма, которая обусловливается неспецифическими факторами антиинфекционной защиты и, в первую очередь, – ареактивностью клеток. Восприимчивость – способность организма реагировать на внедрение патогенных микробов развитием носительства или инфекционного заболевания. Различают видовую и индивидуальную восприимчивость. Будучи мерой чувствительности вида или индивидуумов к определенным микроорганизмам, выраженной в количественном отношении, восприимчивость может быть полной, высокой, умеренной, слабой или же совсем не проявляться.

Резистентность и восприимчивость макроорганизма зависят от возраста, пола, физиологического состояния и характера обмена веществ. Сильное влияние на них оказывает питание, ионизирующая радиация, санитарно-гигиенические условия труда и быта, соматические заболевания. Резистентность и восприимчивость изменяются в процессе фило- и онтогенеза. Факторы, ослабляющие защитные функции организма, способствуют распространению инфекции, повышающие резистентность – препятствуют ей. В сохранении постоянства внутренней среды организма большое значение имеют центральная нервная и гуморальная системы, поскольку с их деятельностью связаны степень проницаемости барьеров (слизистых, кожи, лимфоузлов), активность фагоцитоза и процесс выработки антител.

Окружающая среда как индуктор инфекции. Биологические, или природные, факторы среды и социальные условия жизни людей являются движущими силами эпидемического процесса. Это указание находит свое выражение в общей систематике эпидемических заболеваний (социальные, биологические, социально-биологические).

Классификация инфекционных болезней

Инфекционные болезни вызываются патогенными микроорганизмами и отличаются от соматических: 1) контагиозностью (заразительностью); 2) эпидемичностью (тенденцией к распространению); 3) специфичностью локализации возбудителя в определенных органах и тканях, в которых возникают характерные патологические изменения, свойственные определенной болезни; 4) передачей посредством специфического механизма; 5) неповторяемостью болезни (устойчивостью к повторному заболеванию, или реинфекции).

Вероятность развития инфекционной болезни определяется видовыми особенностями патогенного микроба, его вирулентностью, инфицирующей дозой (количеством) возбудителя, путями заражения и входными воротами, или местом его проникновения в организм. Так, возбудители чумы, желтой лихорадки, других особо опасных геморрагических лихорадок, отличающихся высокой вирулентностью, вызывают заболевания даже в тех случаях, когда инфицирующая доза составляет десятки особей, в то время как дизентерия и сальмонеллезы у людей возникают после инфицирования их десятками и сотнями тысяч микробных тел. Касаясь входных ворот, следует подчеркнуть, что патогенные микробы отличаются высокой степенью тропизма к тканям, вызывая болезни только в том случае, когда проникают в организм через соответствующие им места. Например, холерный вибрион вызывает болезнь, попадая в организм перорально. Исключение составляет около полутора десятков патогенных бактерий и вирусов, проникающих в организм через кожу, слизистые оболочки дыхательных путей и кишечника, посредством укуса – в кровоток, но ворота их вхождения определяют тяжесть течения и исход болезней (см. «Возбудители чумы, туляремии, бруцеллеза, туберкулеза, сибирской язвы»).

Инфекционные заболевания протекают циклически. В инкубационном (латентном) периоде явных признаков заболевания не отмечается. Следующий за инкубационным периодом продром (*prodromus* – предвестник) сопровождается повышением температуры, общим недомоганием,

слабостью, головной болью. Продром сменяется периодом развития основных клинических симптомов, специфических для каждого инфекционного заболевания. При благоприятном течении болезнь заканчивается постепенным восстановлением нарушенных функций и выздоровлением (реконвалесценцией). При низком уровне иммунитета возможны рецидивы, т. е. повторные приступы заболевания. Рецидивы может вызвать суперинфекция, или повторное инфицирование. Полное выздоровление приводит к развитию прочного и длительного иммунитета, исключающего реинфекцию.

Все инфекционные болезни по механизму передачи делятся на четыре группы: кишечные, инфекции дыхательных путей (респираторные), кровяные, инфекции кожных покровов и слизистых оболочек.

Кишечные инфекции передаются фекально-оральным механизмом, при котором основными факторами передачи являются пища (алиментарный путь), вода, посуда, грязные руки и мухи.

Инфекции дыхательных путей распространяются воздушно-капельным, реже – воздушно-пылевым путем.

Для *кровяных инфекций* характерен трансмиссивный путь передачи через кровососущих насекомых (вшей, блох, клещей, комаров и пр.).

В механизме заражения *инфекциями кожных покровов* и *слизистых оболочек* главными факторами передачи служат предметы обихода и производственной обстановки, но некоторые – передаются прямым контактом без участия факторов окружающей среды, например посредством укуса (бешенство, содоку) или половым путем (венерические болезни). Особого внимания заслуживает трансплацентарный (вертикальный) путь заражения плода в организме беременной матери, инфицированной некоторыми видами микроорганизмов, обладающих тератогенным (*teras* – урод) действием. Как правило, внутриутробное заражение эмбриона заканчивается абортами, мертворождениями, но если новорожденные остаются жизнеспособными, то у них выявляют пороки развития в разных органах и тканях.

По источнику (резервуару) все инфекционные заболевания делят: 1) на антропонозные (*anthropos* – человек,

nosos – болезнь), возбудители которых паразитируют в организме человека (корь, холера); 2) зооантропонозные (*zoon* – животное), циркулирующие среди животных, но поражающие также людей (бруцеллез, чума, туляремия); 3) сапронозные (*sapros* – гнилой), вызываемые свободноживущими в окружающей среде или на теле человека и животных сапрофитами (эшерихии, пеницилловые и аспергилловые грибы).

По тяжести проявления различают тяжелые, средние, легкие и латентные (скрытые, бессимптомные) инфекционные болезни, по течению – острые, внезапно начинающиеся и сравнительно быстро разрешающиеся, и хронические, приобретающие затяжное течение, а по локализации – региональные (очаговые) и генерализованные, возникающие в результате проникновения возбудителей из локализованного очага в лимфу и кровоток. При этом развивается бактериемия, вирусемия, фунгемия, паразитемия, т. е. циркуляция в крови (*haima*) бактерий, вирусов, грибов и простейших. Подобные состояния, при которых микробы размножаются в кровотоке, называют *сепсисом*, а если сепсис к тому же сопровождается гнойным воспалением в тканях и органах (вторичных очагах) – *септикопиемией* (*pyon* – гной). Интоксикацию, связанную с поступлением в кровь экзо- и эндотоксинов, определяют термином *токсинемия*. Особый вид инфекции представляет *персистенция* (*persisto* – постоянно пребывать), отличающаяся длительным нахождением в организме человека вирусов, микобактерий туберкулеза, токсоплазм, плазмодия малярии и других возбудителей. Чаще всего она проявляется в виде бессимптомной или периодически обостряющейся хронической инфекции, но может принимать неуклонно прогрессирующий характер с тяжелыми дегенеративными поражениями центральной нервной системы и внутренних органов, названную медленной инфекцией (см. «Медленные инфекции»).

По характеру возникновения выделяют экзогенные инфекции, вызываемые проникающими извне патогенными микробами, и эндогенные, проявляющиеся при активации нормальной микрофлоры тела человека или персистирующих микробов под влиянием факторов, снижающих общую резистентность организма (охлаждение, переутомление, облучение, менструация).

Своеобразной формой инфекции служит микробоносительство. Наиболее полно изучено реконвалесцентное носительство. Обычно оно возникает у переболевших с низким уровнем постинфекционного иммунитета и может продолжаться от нескольких недель и месяцев (коринебактерии дифтерии, холерный вибрион, вирус полиомиелита) до нескольких лет и десятилетий (сальмонеллы брюшного тифа, паратифов А и В). У здоровых людей микробоносительство возникает как следствие контакта с больными. Полагают, что здоровые носители отличаются сравнительно высокой резистентностью к патогенным микробам, приобретенной в результате многократного инфицирования или искусственной иммунизации (иммунное носительство привитых). Здоровое микробоносительство – кратковременное (транзиторное) и исчезает в течение нескольких дней без каких-либо неблагоприятных последствий для носителя и окружающих его лиц.

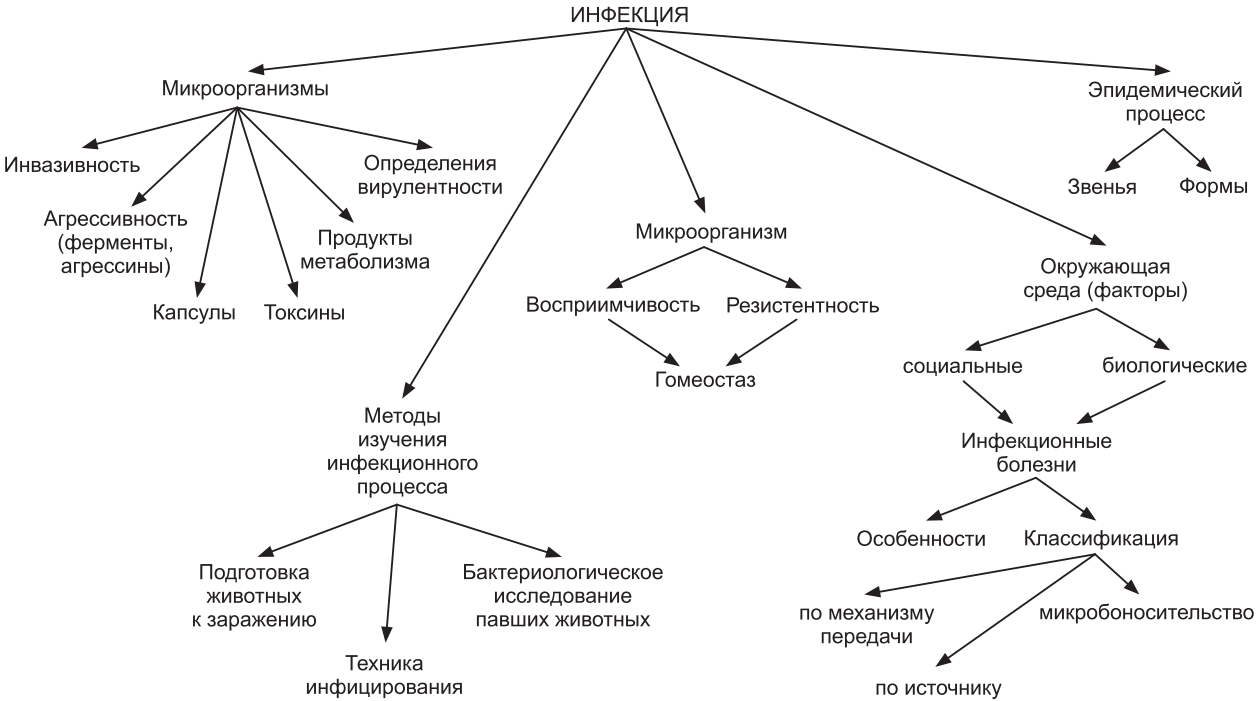
Понятие об эпидемическом процессе и его формах

Эпидемический процесс – это процесс взаимодействия возбудителя-паразита и организма людей на популяционном уровне. Возникает он при наличии источника и резервуара инфекции (больные люди и животные, микробоносители, окружающая среда), восприимчивых лиц и активации соответствующего механизма передачи инфекции, которые в совокупности своей являются главными движущими силами эпидемического процесса. Различают три его формы: спорадическую заболеваемость, эпидемии и пандемии.

Спорадической называют заболеваемость, свойственную для определенной местности и болезни в данный период.

Под эпидемией понимают необычно высокий уровень заболеваемости людей, во много раз превышающий спорадическую. Очень интенсивные эпидемии, сопровождающиеся массовой заболеваемостью на обширных территориях, именуют пандемиями.

Привязанность инфекционного заболевания к определенному региону называют эндемией.


ИНФЕКЦИЯ
Микроорганизмы
Инвазивность
Агрессивность (ферменты, агрессины)
Капсулы
Токсины
Продукты метаболизма
Определения вирулентности
Микроорганизм
Восприимчивость
Резистентность
Гомеостаз
Методы изучения инфекционного процесса
Подготовка животных к заражению
Техника инфицирования
Бактериологическое исследование павших животных
Эпидемический процесс
Звенья
Формы
Окружающая среда (факторы)
социальные
биологические
Инфекционные болезни
Особенности
Классификация
по механизму передачи
по источнику
микробоносительство

Граф 40

ИММУНИТЕТ (ОСНОВЫ ИММУНОЛОГИИ)

Слово «иммунитет» происходит от лат. *immunitas* – невосприимчивость. Наука об иммунитете называется иммунологией. Она зародилась и сформировалась в последней четверти XIX в. в недрах медицинской микробиологии благодаря выдающимся исследованиям Л. Пастера, И.И. Мечникова, П. Эрлиха и многих других ученых. Развитие других направлений иммунологии, в частности общей иммунологии и иммунопатологии предопределили открытия изоантигенов эритроцитов человека системы АВ0 (К. Ландштейнер, 1901) и резус-фактора (К. Ландштейнер, А. Винер, 1940).

Задачи иммунологии. *Инфекционная иммунология* изучает способы профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней; *общая* – регуляцию иммунитета на молекулярном, клеточном и организменном уровнях, эволюцию и генетику иммунитета, способы пересадки аллотрансплантатов; *иммунопатология* – извращенные реакции на антигены, в частности – аллергию, аутоиммунные патологические процессы, влияние на иммунную систему факторов окружающей среды, иммунодефициты и новообразования, иммунопатологические процессы в системе «мать – плод», другие важнейшие проблемы.

Содержание и объекты изучения иммунологии. Современная иммунология является биологической наукой, изучающей физиологию и патологию иммунной системы. У человека и животных ее основу составляют тимус, или вилочковая железа, и костный мозг (центральные органы иммунитета); лимфоузлы, селезенка и лимфатические скопления в слизистых оболочках и внутренних органах (периферические органы). Иммунитет обеспечивают находящиеся в этой системе особые популяции иммуноцитов, которые по их происхождению и функциональным различиям подразделяют на А-, В- и Т-клетки и нередко называют *иммунокомпетентными клетками* (иммунитет и *competentis* – подходящий, соответствующий).

А-клетки (*accessory* – вспомогательный) – это моноциты крови и образующиеся из них макрофаги тканей (гистиоциты), отростчатые клетки лимфоузлов, селезенки и кожи. *В-клетки* (*bursa Fabricii*) и морфологически сходные с ними *Т-клетки* (*thymus*) – малые лимфоциты фабрициевой бурсы (выроста клоаки птиц) и тимуса (рис. 55).

Важнейшей особенностью клеток иммунной системы является их способность распознавать и элиминировать (разрушать, обезвреживать, удалять) генетически чужеродные вещества, которые могут вызывать нарушение гомеостаза в организме человека и животных. В этом уточнении *иммунология* – это наука о механизмах взаимодействия и функционирования иммунокомпетентных клеток в норме и патологии.

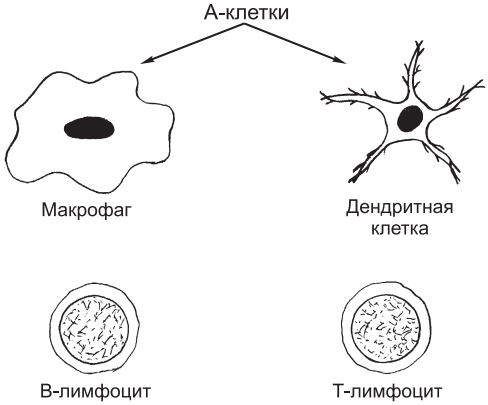


Рис. 55. Имуннокомпетентные клетки

Определение иммунитета. Существует несколько определений иммунитета, и все они исходят из того, что невосприимчивость – явление гомеостатического порядка. В соответствии с этим под иммунитетом понимают способность организма человека: 1) обеспечивать целостность и биологическую индивидуальность; 2) создавать невосприимчивость к чужеродным эндогенным и экзогенным веществам, агентам инфекционной и неинфекционной природы; 3) реагировать на вредные воздействия биологических и физических агентов, нарушающих нормальную жизнедеятельность, и нейтрализовать их.

Факторы иммунитета. Иммунитет обеспечивается клеточными и гуморальными (*humor* – влага) факторами крови, лимфы и межтканевой жидкости. Это было установлено И.И. Мечниковым и П. Эрлихом. В 1908 г. им была присуждена Нобелевская премия по физиологии и меди-

цине за открытие того, что иммунитет к патогенным микробам обусловлен фагоцитами и антителами. В последующие годы были описаны и апробированы иммунологические реакции и тесты с фагоцитами и антителами, уточнялся механизм их взаимодействия с антигенами (чужеродными веществами-агентами). В 1948 г. А. Фагреус доказала, что антитела синтезируются плазмоцитами. Иммунологическую роль В- и Т-лимфоцитов установили в 1960–1972 гг., когда было доказано, что под влиянием антигенов В-клетки превращаются в плазмоциты, а из недифференцированных Т-клеток возникает несколько разнообразных субпопуляций. В 1965 г. открыты цитокины Т-лимфоцитов, обусловливающих кооперацию (взаимодействие) иммунокомпетентных клеток. Таким образом, клеточно-гуморальная теория иммунитета Мечникова – Эрлиха получила всестороннее обоснование, а иммунология – базу для глубокого изучения специфических механизмов отдельных видов иммунитета.

Виды и формы иммунитета. Виды иммунитета многообразны. Выделяют наследственный и приобретенный антимикробный иммунитет.

Наследственный иммунитет передается по наследству в ряду многих поколений. Поскольку он обусловлен генотипом, его называют также *генотипическим*. В связи с этим у разных животных и у человека он неодинаков, но в популяциях одного вида по напряженности и характеру проявления – однотипный и отличается только степенью индивидуальной выраженности. Общим свойством любого наследственного иммунитета является то, что по напряженности он превосходит приобретенный, незначительно меняется в процессе жизни и в этом смысле его можно считать абсолютно устойчивым.

Как генотипическое явление наследственный иммунитет обусловливает биологическую индивидуальность организма. Кроме того, он обеспечивает гомеостаз, т. е. постоянство химического и клеточного состава внутренней среды. При этом поддержание органо-тканевой целостности определяется способностью иммунной системы различать «свое» и «чужое» в борьбе с «чужим». В филогенезе наследственный иммунитет сформировался как природный механизм защиты организма от клеток-мутантов (главным образом, – опухолевых) и образующихся в организме субстанций с чуже-

родной меткой, или аутоантигенов. Этот антимутагенный механизм выживания запускается и при трансплантациях (пересадках) тканей. У человека он обеспечивает абсолютную невосприимчивость ко многим зоонозным болезням, а у животных – к антропонозным. Так, человек не болеет чумой крупного рогатого скота или инфекционной анемией лошадей, а животные нечувствительны к брюшному тифу или кори. Впервые связь наследственного иммунитета с генотипом была доказана Т. Вебстером, которому удалось вывести линию мышей, резистентных к *Salmonella enteritidis*.

По направленности действия на генетически чужеродную метку (клетки, молекулы) наследственный иммунитет можно подразделить на три вида: противоопухолевый, антимикробный и трансплантационный как частное, искусственное проявление антимутагенного механизма выживания.

Приобретенный антимикробный иммунитет вырабатывается в процессе жизни в природных условиях или вызывается искусственным путем. Самой ранней формой естественного иммунитета является *врожденный*. Обеспечивается он, прежде всего, тканевой ареактивностью. Ввиду того что антимикробная устойчивость ребенка обусловлена также пассивно переданными от матери через плаценту антителами, титр которых ежедневно пополняется с молоком при грудном вскармливании, врожденный иммунитет часто называют *плацентарным* и *материнским*. Его продолжительность определяется длительностью кормления ребенка грудью, но редко превышает 6 мес. Эпидемиологи считают, что «устойчивость» детей грудного возраста к инфекционным болезням в большой степени обеспечивается разобщенностью их с источниками инфекций.

Другой вид приобретенного в естественных условиях иммунитета – *постинфекционный* – возникает у человека в результате заболевания или неприметного инфицирования (проэпидемичивания). Этот вид иммунитета предохраняет организм от *реинфекции*. Появляется он на второй неделе после инфицирования и продолжается в течение нескольких месяцев или лет, а иногда и всю жизнь. Развитие постинфекционного иммунитета сопровождается гибелью патогенных микробов и выведением продуктов их распада из организма. Такой вид иммунитета называют *стерильным*. Если иммунологическая перестройка организма не вызывает гибели возбудителя, а лишь затормаживает его развитие, иммунитет именуют *нестерильным*.

Нестерильный иммунитет обусловливает невосприимчивость к новому заражению (суперинфекции) и существует до тех пор, пока в организме остается микроб. Чаще нестерильный иммунитет формируется при хронических инфекциях, сопровождающихся аллергизацией организма (туберкулез, сифилис, бруцеллез). Нередко встречается при риккетсиозах и вирусных инфекциях.

Приобретенный искусственный иммунитет подразделяют на активный и пассивный. Активный создается вакцинами, а пассивный – иммунными сыворотками и иммуноглобулинами.

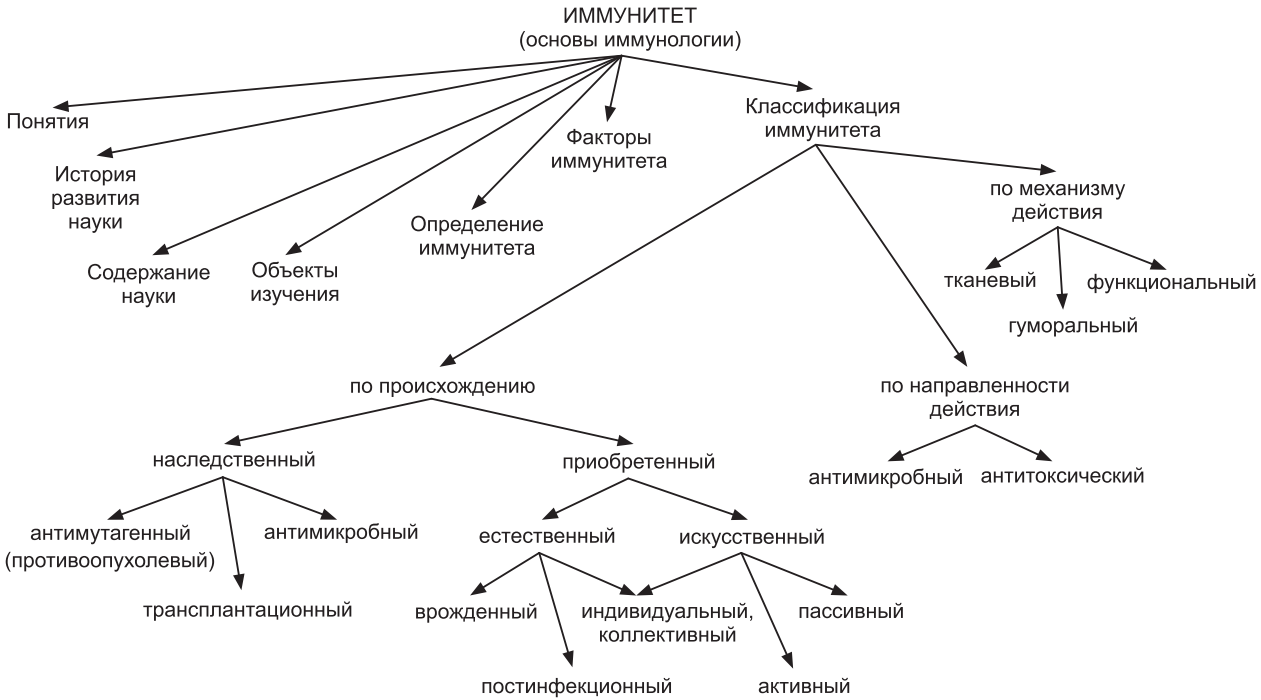
Поствакцинальный иммунитет возникает через 10–14 дней и сохраняется в зависимости от качества вакцины и индивидуальных особенностей организма от нескольких месяцев (дизентерия, грипп) до 5 и более лет (оспа, туляремия).

Сывороточный иммунитет создается через несколько часов, самое позднее – спустя сутки и в зависимости от путей введения сывороток и иммуноглобулинов в организм сохраняется в течение месяца (практически 2–3 недели). К пассивной иммунизации прибегают, главным образом, с лечебной целью.

Индивидуальному иммунитету противопоставляется *коллективный*. Тот и другой вырабатываются в результате перенесенных болезней и микробоносительства. С коллективным иммунитетом связано представление о цикличности возникновения, возможности управления и ликвидации инфекции. Решающее значение в формировании коллективного иммунитета имеют социальные условия.

По направленности действия на различные группы микробов или их токсины иммунитет делят на *антимикробный* и *антитоксический*. В свою очередь, антимикробный иммунитет подразделяют на антибактериальный, антипаразитарный, противогрибковый и т. д. В качестве самостоятельного выделяют *антивирусный иммунитет*, отличающийся от других многими иммунологическими особенностями развития.

Каждый вид иммунитета обусловлен клеточными (тканевыми) и гуморальными факторами, а также рефлекторными защитно-адаптационными реакциями (функциональный иммунитет). В зависимости от спектра антимикробного действия, вида и характера иммунитета, который они создают, различают конституциональные (врожденные) и индуцибельные (приобретенные) факторы.


ИММУНИТЕТ
(основы иммунологии)
Понятия
История развития науки
Содержание науки
Объекты изучения
Определение иммунитета
Факторы иммунитета
Классификация иммунитета
по механизму действия
тканевый
гуморальный
функциональный
по происхождению
наследственный
антимутагенный (противоопухолевый)
трансплантационный
антимикробный
приобретенный
естественный
врожденный
постинфекционный
индивидуальный, коллективный
искусственный
пассивный
активный
по направленности действия
антимикробный
антитоксический

Граф 41

Конституциональные факторы естественной резистентности

Конституциональные факторы естественной резистентности организмов формировались в процессе длительной эволюции. Отличаются эти факторы защиты широким спектром антимикробного действия, элиминируя многочисленные виды микробов и их токсины. Более того, они обеспечивают не только антиинфекционный, но и противоопухолевый иммунитет, гомеостаз в целом.

Тканевые факторы

Среди тканевых факторов антиинфекционной защиты самую важную роль выполняют: ареактивность клеток; кожа, слизистые оболочки, лимфатические узлы как иммунологические барьеры; фагоциты и нормальные киллеры.

Клеточная ареактивность. *Видовая реактивность клеток* к патогенным микробам и токсинам обусловлена генотипом, который детерминирует образование на поверхности клеток соответствующих рецепторов. При их отсутствии адсорбция и проникновение инфекционного агента или яда в клетку будут невозможными. Генотипическая ареактивность связана также с дефицитом необходимых для микроба веществ, особым химическим составом отдельных структур и макромолекул клеток, избирательной специфичностью действия микробных ферментов. Клеточная ареактивность является очень стабильным видовым признаком, но все-таки может изменяться с возрастом или под действием различных факторов окружающей среды. Так, например, Л. Пастер показал наличие ареактивности птиц к сибиреязвенной инфекции, но при погружении их лапок в ледяную воду зараженные птицы заболевали вследствие резкого охлаждения организма. В другом классическом опыте И.И. Мечникова была отмечена природная нечувствительность лягушек, черепах, ящериц к столбнячному токсину. Развитие столбняка у пойкилотермных животных достигалось помещением их в термостат и повышением температуры тела.

Видовая ареактивность клеток постепенно развивается в процессе выздоровления от инфекционного заболевания или после вакцинации. В отличие от генотипической,

приобретенная ареактивность носит специфический характер, сочетаясь с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток.

Иммунологические барьеры. Кожные покровы и слизистые оболочки обеспечивают невосприимчивость как механические защитные барьеры и вследствие выделения антимикробных веществ широкого диапазона действия. Так, в отделяемом потовых и сальных желез кожи находят различные ингибиторы, молочные и жирные кислоты, угнетающие многие виды патогенных бактерий. Слизистая желудка секретирует соляную кислоту, в которой быстро инактивируется холерный вибрион. Многие слизистые оболочки продуцируют муколитический фермент лизоцим, вызывающий лизис или гибель ряда бактерий в результате разрушения клеточной стенки. В наибольших концентрациях лизоцим обнаруживается в секретах конъюнктивы и носа, в слюне и слизи кишечника.

Мощным естественным барьером являются лимфатические узлы. Проникновение в них патогенных бактерий приводит к возникновению воспалительного процесса, сопровождающегося освобождением из тканей биологически активных веществ, под влиянием которых происходит активация лейкоцитов, скапливающихся вокруг патогенных микробов и препятствующих их распространению в кровоток, подлежащие ткани и внутренние органы. Наряду с этим в очаге воспаления активируется фагоцитарная реакция.

Фагоциты и фагоцитоз. Защитную функцию клеток, способных поглощать и переваривать микробы, впервые показал И.И. Мечников, назвав их *фагоцитами*. Среди них он различал *микрофаги* – нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, и *макрофаги* – моноциты крови, гистиоциты, эндотелиальные и ретикулярные клетки внутренних органов и костного мозга.

Различают завершенный и незавершенный фагоцитоз. Фагоцитарная реакция осуществляется поэтапно.

Завершенный фагоцитоз, заканчивающийся полным разрушением микроба, происходит в несколько этапов: 1) положительный хемотаксис, или приближение фагоцита к микробу; 2) адгезия, или прилипание фагоцита к нему; 3) инвагинация (впячивание) мембраны фагоцита с последующим формированием фагосомы и ее слияние с лизосомой; 4) киллинг-инактивация микроба в фаголизосоме,

проявляющаяся набуханием, фрагментацией и его лизисом до низкомолекулярных соединений (рис. 56). Если микробные антигены разрушаются частично, вслед за фагоцитозом начинается антителообразование.

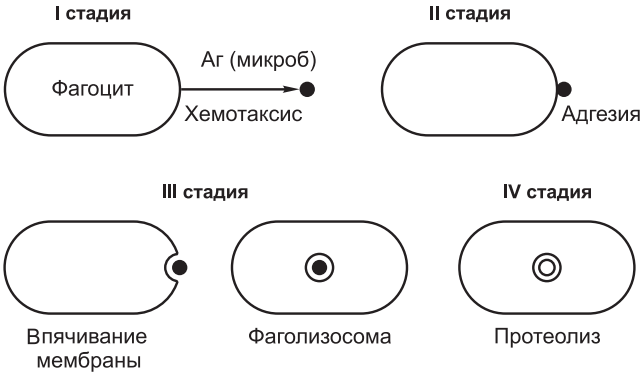


Рис. 56. Стадии завершенного фагоцитоза

Некоторые виды микроорганизмов и особенно поглощенные вирусы проявляют большую устойчивость к лизосомальным антимикробным веществам или даже размножаются внутри фагоцитов (рис. 57). Такой *незавершенный вид фагоцитоза* чаще наблюдается в нейтрофилах и заканчивается их гибелью или фагоцитированные микробы выталкиваются из них. Нередко гранулоциты с размножившимися в них бактериями становятся объектом фагоцитоза для макрофагов. Следует подчеркнуть, что в отличие от нейтрофилов, которые поглощают и переваривают в основном истинные бактерии, макрофаги фагоцитируют спирохеты, актиномицеты, грибы, простейшие, вирусы, атрофирующиеся, омертвевшие или злокачественно перерожденные клетки.

Рис. 57. Незавершенный фагоцитоз

Переваривающая способность фагоцита определяется наличием большого набора лизосомальных антимикробных веществ и широким спектром их действия. Активность фагоцитоза, однако, может зависеть от видовых свойств мик-

роба. Так, с трудом фагоцитируются и перевариваются бактерии, которые образуют капсулы и продуцируют ферменты агрессивности. Наоборот, легко расщепляются авирулентные штаммы. Стимулируют фагоцитоз ингибиторы микробов и активаторы фагоцитов. К ним относятся нормальные антитела, специфические иммуноглобулины, цитокины, вызывающие положительный хемотаксис и повышающие метаболизм фагоцитов. Факторами, ускоряющими фагоцитоз, являются соли кальция, магния и другие электролиты, адреналин, гистамин, пирогенные вещества, анаболические гормоны. Угнетают фагоцитоз ацетилхолин, серотонин, антигистаминные вещества, такие как, например, димедрол, кортикостероиды, алкалоиды, катаболические гормоны.

Нормальные (естественные) **киллеры.** NK-клетки – специализированные большие лимфоциты с рыхлым почковидным крупным ядром, содержащие в обильной цитоплазме митохондрии, свободные рибосомы с элементами шероховатого эндоплазматического ретикулума, аппарат Гольджи и электронно-плотные гранулы с большим количеством цитотоксических веществ (рис. 58). Основным их отличием является то, что на внешней мембране они не имеют присущих B- и T-клеткам маркеров (специфических молекул) и антигенраспознающих рецепторов (см. «Иммунная система»). Специфическими маркерами NK-клеток являются молекулы *CD*56 и *CD*57 (***c**laster **d**esignatio*), выявляемые с помощью кластера (группы) моноклональных антител. Ее субфракцию К-клеток, осуществляющих лизис клеток-мишеней, обработанных антителами, маркирует молекула *CD*16 или *Fcγ*, являющаяся рецептором иммуноглобулина G. Кроме этого, на NK-клетках определяются адгезивные молекулы и С-лектин – белок-рецептор, распознающий углеводные остатки на клетках-мишенях, которыми служат разного рода трансформированные и быстро пролиферируемые клетки. Их цитолиз осуществляется на основе взаимодействия с углеводными детерминантами делящихся клеток (лектиновое распознавание) с последующим выделением из гранул NK-клеток бел-

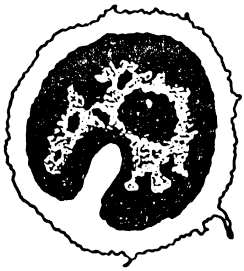


Рис. 58. Нормальные киллеры

ков-перфоринов и гранзимов (сериновых протеиназ), которые, проникая через поры в клетках-мишенях, запускают программированную гибель клеток (апоптоз) с сегментацией ДНК и отделением хроматиновых фрагментов, окруженных оболочкой. В крови NK-клетки составляют 12 % от общего количества лимфоцитов. Особенно много их в селезенке (36 %), которая считается местом завершения развития NK-клеток. Имеются они также в легких (5 %), лимфоузлах (3 %) и лимфоидных образованиях кишечника.

Гуморальные факторы

Гуморальные факторы иммунитета, обеспечивающие врожденную резистентность организма, очень многочисленны. Большинство из них обладают антимикробной активностью. Концентрация их в крови и лимфе здоровых людей невелика, но при инфицировании может резко возрастать. Обладают широким спектром действия, некоторые – синергическим и аддитивным, усиливающими микробоцидные эффекты. Природа их многообразна, но, как правило, они являются полипептидами. Механизм антимикробного действия – многосторонний. Вырабатываются разнообразными клетками, главным образом Т-лимфоцитами и макрофагами, и нередко являются их активаторами.

Среди гуморальных факторов антиинфекционной защиты основное значение придают комплементу; действующим в сочетании с ним пропердину и интерлейкину-1 (ИЛ-1); белкам острой фазы воспаления и интерферону I типа.

Комплемент. Структурно сформированного комплемента (*complementum* – дополнение) как гуморального фактора иммунитета в организме здоровых людей и животных нет. В их крови циркулируют его компоненты (фракции, молекулы) – C1q, C1r, C1s, C2, C3 ... C9, B, или C3-проактиватор, и ряд других. Находясь в дискретном (разобщенном) состоянии, они являются инертными белками-предшественниками комплемента.

Формирование комплемента в единое целое происходит при внедрении в организм болезнетворных микробов или других антигенов. При этом на основе его инертных субстанций создаются ферментоподобные соединения, вызывающие цепную реакцию образования комплемента, способного лизировать клетки (бактерии, эритроциты) или, чаще, просто элиминировать генетически чужеродную метку. Так как сборка

комплемента сопровождается трансформацией белков-предшественников в активные промежуточные продукты, то процесс его формирования правильнее называть *активацией*.

Пути активации комплемента. Различают классический и альтернативный пути. Первый из них инициируется иммунным комплексом антитело + антиген; другой, более редкий, – некоторыми полисахаридами и липополисахаридами бактерий без участия антител.

Поскольку комплемент – прежде всего, неспецифический фактор резистентности организма, то вначале рассмотрим активацию комплемента по альтернативному пути.

Альтернативный путь активации комплемента начинается с того, что на внешней мембране бактерии, проникшей в организм, адсорбируется комплексное соединение C3bBb, всегда присутствующее в очень небольших количествах в крови. Ввиду того что оно обладает исключительно высокой реакционной способностью расщеплять инертную C3-фракцию комплемента до активных субфракций C3a и C3b, ее называют также C3-конвертазой (рис. 59, *а*).

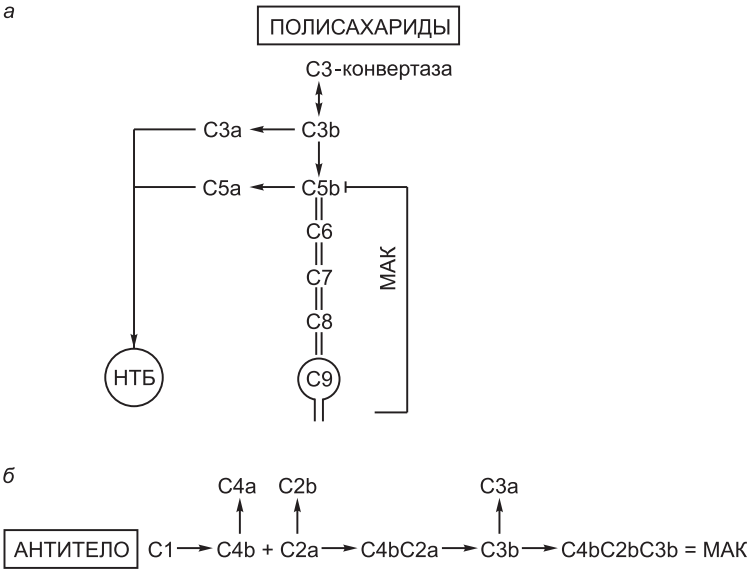


Рис. 59. Пути активации комплемента:
а – альтернативный; *б* – классический; МАК – мембраноатакующий комплекс; НТБ – соответственно нейтрофилы, тучные клетки и базофилы

Образованию следовых концентраций С3-конвертазы предшествует поэтапная диссоциация протеолитическими ферментами крови С3-фракции комплемента до С3b-субфракции, а после присоединения к ней фактора В и последующего его расщепления до Bb инертное соединение С3bВ превращается в С3bBb-конвертазу.

Связывание конвертазы углеводами мембраны бактерии защищает ее от распада, что быстро происходит в крови. После дополнительной стабилизации защитным белком пропердином она расщепляет С3-фракцию комплемента. При этом к С3-конвертазе, связанной с мембраной микроорганизма, присоединяются реакционноспособные большие молекулы С3b (малые С3а-пептиды отщепляются), сообщая ей свойства С5-конвертазы.

На втором этапе с ними взаимодействуют молекулы С5, которые под влиянием С5-конвертазы тоже диссоциируют на С5b и маленькие пептиды С5а. На конечной стадии конструирования комплемента происходит образование мембраноатакующего комплекса (МАК). Начинается это с последовательного присоединения к полипептиду С5b фракций С6, С7, С8. Образовавшийся комплекс своей реакционной массой ориентирует проникновение в липидный бислой мембраны бактерии двух (нескольких) фракций С9. Заканчивается формирование МАК полимеризацией молекул С9 в кольцевую структуру, через канал которой в бактерию проникает вода и электролиты, что может приводить к ее лизису. Чаще комплемент не разрушает бактерии, а лишь ингибирует их, способствуя быстрому фагоцитозу, в частности обеспечивает адгезию, так как у фагоцитов имеются рецепторы к полипептидам С3b, которые покрывают поверхность микробов. Кроме того, комплемент стимулирует фагоцитоз косвенным путем: посредством отщепляющихся при его активации пептидов С3а и С5а, которые непосредственно воздействуют на нейтрофилы, усиливая их метаболизм и особенно – хемотаксис. Одновременно с этим они вызывают выброс из тучных клеток тканей и базофилов крови различных медиаторов, повышающих в очаге инфекции проницаемость сосудов для фагоцитов и ускоряющих фагоцитоз.

Классический путь активации комплемента инициируется антителом, вступающим в специфическую взаимосвязь с бактерией (рис. 59, *б*). Процесс сборки его ком-

понентов начинается на антителе с последовательных объединений Clq, Clr и Cls в одну стабилизированную ионами Ca^{2+} молекулу C1, обладающую протеолитической активностью в отношении C4-фракции комплемента. Ее расщепление ведет к образованию пептидов C4a+C4b и формированию в присутствии ионов Mg^{2+} соединения C4bC2, а после ферментативной диссоциации C2 – C4bC2a, аналогичного C3-конвертазе, вызывающей при диссоциации фракции C3 образование комплекса C4bC2aC3b, или C5-конвертазы классического пути. Последующие этапы активации комплемента вплоть до окончательного формирования МАК, такие же, как при альтернативном пути. Идентичны также механизмы прямого и опосредованного влияния комплемента на связанные с антителами бактерии, фагоцитоз и воспалительный процесс в целом.

Содержание комплемента в сыворотках колеблется в зависимости от вида и возраста животных, сезона и даже времени суток. Наиболее постоянный и высокий его титр регистрируется у морских свинок, поэтому именно их сыворотка используется как комплемент для постановки реакции связывания комплемента (РСК). У здоровых людей уровень комплемента варьирует незначительно, но у больных может резко повышаться или снижаться. Изучение титра комплемента в динамике позволяет составить представление о резистентности организма человека и прогнозе заболевания.

Система комплемента очень лабильна. Инактивация комплемента происходит в течение 2–4 дней даже при хранении сывороток в холодильнике, где температура не превышает 5 °С. Быстро разрушается комплемент под действием протеаз, на свету, особенно – при УФ-облучении, в слабых растворах кислот и щелочей. Исчезает комплементарная активность сывороток после прогревания при 56 °С в течение 20–30 мин.

Методы определения общей гемолитической активности комплемента. Действуя на микробы как литический фактор, комплемент повышает бактерицидную активность сыворотки крови. О содержании комплемента в сыворотке крови судят по его гемолитической активности в отношении эритроцитов барана, обработанных гемолизинами (см. РСК). Титр комплемента чаще всего выражают в минимальном количестве сыворотки, которое в нор-

мальных условиях лизирует 50 % оптимально сенсибилизированных гемолизинами эритроцитов.

Определяя активность комплемента классического пути, исследуемую сыворотку крови разводят 1:10 изотоническим раствором хлористого натрия и в объемах от 0,05 до 0,5 мл вносят в 10 пробирок. Затем все объемы сывороток доводят электролитом до 1,5 мл, добавляя в каждый из них по 1,5 мг гемолитической системы (смесь равных объемов 3 %-ной взвеси бараньих эритроцитов и гемолитической сыворотки). Пробирки инкубируют при 37 °С 45 мин, охлаждают при 4 °С для остановки реакции и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин, после чего определяют объем сыворотки, вызвавший лизис 50 % сенсибилизированных эритроцитов (условную гемолитическую единицу активности комплемента – СН 50). Затем рассчитывают количество СН 50 на 1 мл цельной сыворотки, которое у здоровых людей составляет 40–60 СН 50, что и является титром комплемента.

Точно так же определяют активность альтернативного пути комплемента, но вместо сенсибилизированных бараньих эритроцитов используют несенсибилизированные кроличьи эритроциты и изотонический раствор, содержащий Mg^{2+} без ионов Ca^{2+}, что блокирует классический путь активации комплемента.

Активность комплемента и его компонентов определяют также методом радиального гемолиза в агаровом геле. При этом гемолитическую систему смешивают с расплавленным агаром в соотношении 1:7 и быстро выливают в стерильные чашки Петри. После застывания агара в геле проделывают несколько лунок диаметром 4 мм и заполняют их испытуемыми сыворотками, помещая чашки в холодильник при 4 °С на 24 ч, а затем – в термостат на 60 мин для проявления зон гемолиза. Критерием активности комплемента служит квадрат диаметра зон гемолиза.

Белки острой фазы (БОФ). Это белки сыворотки крови, которые продуцируются в основном клетками печени в острой фазе воспаления под влиянием воспалительных цитокинов и, прежде всего, интерлейкина 1 (ИЛ-1), вызывающего повышение температуры тела (см. «Цитокины»). К ним относятся фибриноген, амилоидный протеин, а главное, С-реактивный (ЦР) и маннозосвязывающие (МН) белки. При этом, накапливаясь в крови, ЦРБ и МНБ акти-

вируют комплемент – первый по классическому и альтернативному пути, связываясь с фосфорилхолином грамположительных бактерий и обнажая в нем участки, способные взаимодействовать с отдельными фракциями комплемента, а второй – только по классическому пути, приобретая свойство расщеплять С4 и С2 фракции комплемента после связывания с остатками маннозы.

Интерферон I типа. Различают две серологические группы ИФН I типа (*interfere* – препятствую) – α и β. *ИФН*α – это семейство 20 гликопротеидов с молекулярной массой около 18 кД, *ИФН*β – гликопротеид 20 кД. Отличаясь по структуре, они обладают одинаковым механизмом действия. В норме α-ИФН продуцируется мононуклеарными фагоцитами, а β-ИФН – фибробластами. Под воздействием инфекционного начала секретируются многими клетками, и в месте входных ворот инфекции их концентрация в считанные часы многократно возрастает. При этом интерферонообразование определяется некоторыми системами активации комплемента, в частности, пирогенное действие ИЛ-I и понижение pH в межклеточной жидкости на фоне повышения температуры усиливают продукцию ИФН. Механизм антивирусного действия ИФН I типа – многообразный. Под его воздействием в клетках индуцируется синтез двух ферментов: олигоаденилатсинтетазы и протеинкиназы. При этом первая катализирует 2,5-олигоадениловую кислоту, активирующую клеточные нуклеазы и разрушение вирусных иРНК, а вторая – фосфорилирует α-субъединицу инициирующего фактора трансляции и блокирует его, в результате чего вирионная иРНК утрачивает способность связываться с рибосомой. Антивирусный эффект интерферона посредством блокады трансляции проявится и в отношении клеточной иРНК, так как на фоне ингибирования пролиферации клеток репродукция вирусов замедляется или же прекращается. Кроме того, ИФН I типа усиливает литическое действие нормальных киллеров на клетки-мишени, индуцирует экспрессию антигенов МНС I класса и тем самым способствует распознаванию инфицированных вирусами клеток.

Другие микробоцидные факторы крови. Кроме комплемента, сыворотка крови человека содержит ряд других микробоцидных веществ различной природы. Так, ее бак-

терицидность, прежде всего, определяется концентрацией *лизоцима* – фермента с молекулярной массой около 15 кД. Наиболее чувствительны к нему грамположительные бактерии. Лизоцим вызывает гидролиз β(1–4)-гликозидазной связи в молекуле пептидогликана, который является основным компонентом их клеточной стенки. При частичном разрушении пептидогликанового слоя эти бактерии (сферопласты) погибают, при полном (протопласты) – лизируются. Основной источник лизоцима в крови – макрофаги.

Таким же широким спектром действия, как лизоцим, обладают сывороточный фактор β-*лизин* и *лейкины*, освобождающиеся из лейкоцитов. Каждый из них и все вместе по эффектам антимикробного действия уступают комплементу и лизоциму.

Методы определения активности лизоцима и β-*лизина.* Микробоцидное действие лизоцима определяют по отношению к *Micrococcus lysodeikticus*, а β-*лизина* – к *Bacillus subtilis*. Тест-микробы смешивают с расплавленным и охлажденным до температуры 45–50 °С агаром и быстро выливают его в чашки Петри. В застывших слоях агара выбивают лунки, которые заполняются сывороткой. Диффундируя из лунок, лизоцим и β-*лизин* вызывают радиальный лизис тест-культур вокруг лунок. Их активность определяют по калибровочному графику в зависимости от квадрата диаметра зон бактериолиза.

Незначительный вклад в бактерицидную активность сыворотки крови вносят ингибиторы бактерий с узким спектром антибактериального действия, как-то: эритрин, ингибирующий коринебактерии дифтерии, туберкулостатический фактор и др. Антивирусное действие проявляют сывороточные термолабильные β-ингибиторы – *липопротеины*, которые активируются специфическим микроглобулином. Уровень содержания всех этих гуморальных факторов антиинфекционной защиты в основном определяется питанием. Однако есть неспецифические антимикробные факторы крови, концентрация которых отчетливо повышается под воздействием инфекционных агентов. К ним относятся пропердин и нормальные антитела.

Пропердин. Как и комплемент, пропердин – сложный белок, обладающий антибактериальной активностью (*pro*

и *perde* – подготовлять, разрушать). Состоит из пяти компонентов, три из них – специфические, а два – С3- и В-фракции – такие же, как у комплемента. Стабилизируя комплемент, пропердин обусловливает альтернативный, или, иначе, пропердиновый путь его активации. Действуя совместно с комплементом, он вызывает лизис бактерий (клеток), усиливает фагоцитарную реакцию и воспалительный процесс.

Нормальные антитела. Уже давно было известно, что в сыворотке крови новорожденных могут содержаться антитела к различным видам микроорганизмов. По структуре они ничем не отличаются от иммунных, приобретенных в процессе инфекции, идентичны с ними и по механизму взаимодействия с микробами, т. е. реагируют по закону строгой специфичности. Их близкое сходство с иммуноглобулинами вызывало острые дискуссии по проблеме нормальных антител. Установлено, что образование нормальных антител генетически запрограммировано, они экспрессируются на поверхностных мембранах незрелых В-лимфоцитов в виде рецепторов. Будучи цитофильными, нормальные антитела обнаруживаются в крови новорожденных в очень низких титрах, как правило, в цельной сыворотке. Уровень свободноплавающих нормальных антител в крови возрастает в результате повышения их продукции В-лимфоцитами под воздействием микроба как пускового сигнала.

Факторы саморегуляции. В основе антиинфекционного иммунитета лежит также способность организма к саморегуляции. Эта форма иммунитета, прежде всего, проявляется повышением температуры тела, губительно сказывающейся на жизнедеятельности многих бактерий и, особенно, вирусов в результате непосредственного влияния или изменения окислительно-восстановительного потенциала и pH пораженных тканей. Большое значение в обеспечении естественного иммунитета имеет усиление выделительных функций организма, выведение микробов и токсинов с мокротой, испражнениями, мочой и другими экскретами. Эти и другие, еще не учтенные факторы и механизмы общефизиологического характера находятся под регулирующим влиянием нейрогуморальных и гормональных функций организма.

КОНСТИТУЦИОНАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
тканевые
гуморальные
саморегуляции
Ареактивность клеток
Иммунологические барьеры
Кожа
Слизистые оболочки
Лимфоузлы
Фагоцитоз
Фагоциты
Стадии фагоцитоза
Активаторы
завершенного
незавершенного
Нормальные киллеры
Комплемент
Состав
Пути активации
Функции, свойства
Определение активности
БОФ
ИФН I типа
Нормальные АТ
Другие микробоциды (определение)
лизоцима
β-лизина

Граф 42

Факторы приобретенного иммунитета

Приобретенный постинфекционный иммунитет создается в онтогенезе и по наследству не передается. Этот вид иммунитета обусловлен гуморальными и тканевыми факторами высокой специфичности – иммуноглобулинами и иммунокомпетентными клетками. Его образование индуцируется антигенами.

Антигены

Общее понятие. Термин антиген (*anti* – против и *genes* – порождающий) на заре развития инфекционной иммунологии имел буквальное толкование, выражая способность патогенных микробов, продуктов их распада и жизнедеятельности индуцировать в организме образование иммуноглобулинов и вступать с ними в специфическую реакцию взаимодействия. Далее выяснилось, что антигенными свойствами обладают чужеродные белки (сыворотки, экстракты тканей), другие высокомолекулярные и более простые соединения. Правда, низкомолекулярные вещества сами по себе вызывать образование антител не могут, но вступают в реакцию взаимодействия с иммуноглобулинами, которые выработались под воздействием конъюгированных с ними высокомолекулярных соединений (белков). Высокомолекулярные соединения, индуцирующие антителообразование и взаимодействующие с иммуноглобулинами, назвали *иммуногенами*, а низкомолекулярные, только реагирующие с антителами, – *гаптенами* (*hapto* – схватываю).

После того как стало известно, что вещества, обладающие антигенными свойствами, являются стимуляторами клеточных факторов приобретенного иммунитета (иммунокомпетентных клеток), термин *антиген* получил научно обоснованную трактовку.

В современной иммунологии *антигенами* (Аг) называют иммуногены и гаптены, которые, активируя иммунокомпетентные клетки, вызывают образование иммуноглобулинов и развитие многих других иммунологических (защитных) процессов. Антигенами по-прежнему называют микробы, другие чужеродные клетки, тканевые экстракты, биологические жидкости, содержащие иммуногены и гаптены.

Природа иммуногенов. Сильными иммуногенами являются чужеродные протеины, гликопротеиды, липопротеиды и другие белки, конъюгированные с гаптенами, сложные полисахариды капсул пневмококка, липополисахариды энтеробактерий, НК соматических клеток, многие искусственные высокополимерные соединения.

Свойства иммуногенов и гаптенов. Иммуногенность обусловлена молекулярной массой, и поэтому наибольшей способностью индуцировать продукцию антител обладают чужеродные белки. Наименьшая молекулярная масса у иммуногенов составляет приблизительно 10 кД. Иммуногенность белка определяется также содержанием аминокислот (не менее 10) и общей его конфигурацией. При недостатке незаменимых аминокислот антигенность белка снижается или полностью утрачивается. Существенную роль в иммуногенности играет коллоидальное состояние вещества. Лучше всего это доказывается на примере нативного белка, который, образуя устойчивый коллоид, является наиболее активным иммуногеном. Иммуногенность может быть усилена конъюгацией вещества с макромолекулами, снижена или утрачена при его деструкции; проявляется только при парентеральном введении иммуногенов.

Та часть иммуногена, которая взаимодействует с иммуноглобулином, называется *эпитопом* или *детерминантной группой*. В естественных белках-антигенах эпитопом являются аминокислотные остатки, в полисахаридных антигенах – молекулы гексозы, в более сложных антигенах – антипирин, антибиотики, азокраски, липиды, низкомолекулярные полисахариды, химические элементы и другие гаптены. В липопротеидах, гликопротеидах, бромированных, йодированных протеидах белок несет функцию шлеппера (носителя), или индуктора продукции антител, а гаптен – детерминантной группы. При этом на поверхности антигена может находиться несколько различных детерминантных групп, и в таком случае под его воздействием в организме сформируется соответствующее им по специфичности число видов антител. Введение в молекулу белка гаптена сообщает соединению новую специфичность. Антитела не реагируют на этот конъюгированный гаптен с белком-носителем.

Аналогичное изменение специфичности иммуноглобулинов происходит при индуцировании антителообразова-

ния высокополимерными полисахаридами, конъюгированными с низкомолекулярными гаптенами.

По происхождению различают антигены микроорганизмов, животных и растений.

Антигены микроорганизмов. Антигенная структура микроорганизмов очень разнообразна. Так, в антигенной мозаике семейства энтеробактерий различают соматические О-антигены, оболочечные, капсульные (К), жгутиковые (Н), протективные и рибосомальные Аг, а у некоторых патогенных видов – антигены вирулентности (Vi). Исключая Н-Аг, являющиеся жгутиковыми белками, все они – сложные соединения. В частности, О- и Vi-Аг тесно связаны с липополисахаридами; оболочечные, образующиеся за счет О-Аг, состоят из термолабильных и термостабильных фракций. К-Аг представлены протеиновыми субстанциями (сибиреязвенная палочка) или сложными полисахаридами (пневмококк, клебсиеллы), рибосомальные и протективные – комплексными соединениями белков и НК.

Отдельно взятые виды микроорганизмов содержат видо- и типоспецифические антигены, но могут содержать и групповые, общие с родственными и даже отдаленными видами, т. е. в их составе могут находиться гомологичные и гетерогенные Аг.

Впервые гетерогенные межвидовые Аг открыл Дж. Форссман. Иммунизируя кролика водной вытяжкой из почек морской свинки, он вызвал образование в его сыворотке групповых антител, реагировавших с эритроцитами барана. Далее выяснилось, что форссмановский антиген является липополисахаридом и встречается в органах лошадей, кошек, собак, черепахи. Общие антигены обнаружены у эритроцитов человека и гноеродных кокков, энтеробактерий, вирусов оспы, гриппа и других микроорганизмов. Групповая общность антигенной структуры у различных видов клеток получила название *антигенной мимикрии*. В случаях антигенной мимикрии иммунная система человека утрачивает способность быстро распознавать чужеродную метку и вырабатывать иммунитет, в результате чего патогенные микробы некоторое время могут беспрепятственно размножаться в организме. Антигенной мимикрией пытаются обосновать длительное выживание патогенных микробов в организме больного, или персистенцию; резидентное (устойчивое) микробоносительство и даже поствакцинальные осложнения.

Особую разновидность микробных антигенов составляют *суперантигены* и *толерогены*.

К *суперантигенам* относятся экзотоксины бактерий и ряд белковых компонентов микроорганизмов, не подвергающихся процессингу (переработке) и действующих как целая молекула. Реакция организмов на суперантигены не клоноспецифична, как на обычные антигены, а поликлональная. В нее вовлекаются много клонов Т-лимфоцитов, численность которых может достигать 20–30 % от общего их пула, что сопровождается гиперпродукцией цитокинов, апоптозом клеток и интоксикацией организма. В поликлональную активацию могут также вовлекаться Т-клетки, способные распознавать аутоантигены, что приводит к развитию аутоиммунных реакций (см. «Иммунный ответ»).

Толерогены – микробные вещества, которые в организме одного индивидуума вызывают иммунную толерантность (т. е. подавляют иммунные реакции), а будучи введенными другому, – действуют как иммуногены. Это можно объяснить лишь генетическим разнообразием людей. Правда, один и тот же антиген может проявлять себя как толероген или иммуноген в зависимости от пути его введения в организм.

Знание антигенной структуры микробов дало возможность создать ряд химических вакцин из соматических, оболочечных и протективных антигенов, диагностических и лечебных сывороток для идентификации видовой принадлежности возбудителя инфекционной болезни и ее терапии.

Антигены животных. Многочисленные виды антигенов животного происхождения условно подразделяют на экзогенные и эндогенные.

Экзогенными антигенами являются гетерологичные белки, чужеродные сыворотка и кровь, клетки, взвеси органов и тканей. Парентерально введенные в организм, они, обладая свойствами иммуногенов, вызывают образование антител и активируют клеточные факторы иммунитета независимо от вида и иммуногенности донора.

Эндогенные изо- и аутоантигены – организменные антигены. Природа и свойства их различны.

Изоантигены (*isos* – одинаковый) определяют индивидуальную специфичность организма. Являются специфическими белками, углеводами и различными соединения-

ми клеток, органов и тканей. Обычно не антигенны для организма, в котором находятся и синтезируются. Естественная толерантность (терпимость) организма к изоантигенам объясняется тем, что в эмбриональном периоде развития плода происходит элиминация (разрушение) всех клонов лимфоидных клеток, способных реагировать с ними. Для других особей даже одного и того же вида изоантигены являются иммуногенами. Так, эритроцитарные, лейкоцитарные, тромбоцитарные изоантигены проявляют антигенность в организме индивидуумов, не содержащих их или имеющих разноименную по отношению к ним структуру. То же можно сказать о еще недостаточно изученных органоспецифических изоантигенах.

Аутоантигены (*autos* – свой) – нормальные для организма (обычные, естественные) или образующиеся в нем патологические антигены.

Нормальные аутоантигены – это комплексные белки органов и тканей человека, отделенные от кровотока и иммунокомпетентных клеток гематоэнцефалическим, гематотестикулярным и другими барьерами. К числу таких забарьерных органов относят мозг, семенники, хрусталик глаза, паращитовидные железы. Аутоантигены забарьерных органов способны распознаваться иммунной системой собственного организма как экзогенные чужеродные белки, но так как в норме они не поступают в кровь, то иммунные лимфоциты и не реагируют с ними. Иммунные реакции с нормальными аутоантигенами чаще всего происходят при травматических повреждениях забарьерных органов или повышении степени проницаемости барьеров.

Патологические аутоантигены – тоже сложные белки. Возникают в организме при некоторых инфекционных и соматических заболеваниях. Различают, например, «вирусные трансплантационные антигены», накапливающиеся на мембране клеток, «ожоговые», «лучевые» аутоантигены. Во многих случаях их формированию, вероятно, предшествует появление гаптенов, которые, соединяясь с гомологичными белками, преобразуют их в чужеродные. В результате появляются аутоантитела к собственным клеткам, что приводит к развитию аутоиммунных болезней (тироидит, ревматоидные артриты и др.).

Антигены главного комплекса гистосовместимости. Кратко антигены главного комплекса гистосовместимости называют антигенами МНС (***M**ajor **H**istocompatibility*

Complex), так как они контролируются кластерами (группами) генов главной системы гистосовместимости, которой принадлежит решающая роль в детерминировании тканевой несовместимости при пересадках органов и тканей между особями одного вида. Расположен МНС у мышей на 17-й хромосоме (система Н-2 – *Histocompatibility*), а у человека – на 6-й (система HLA – *Human Leucocyte Antigenes*), включающей многие миллионы пар оснований.

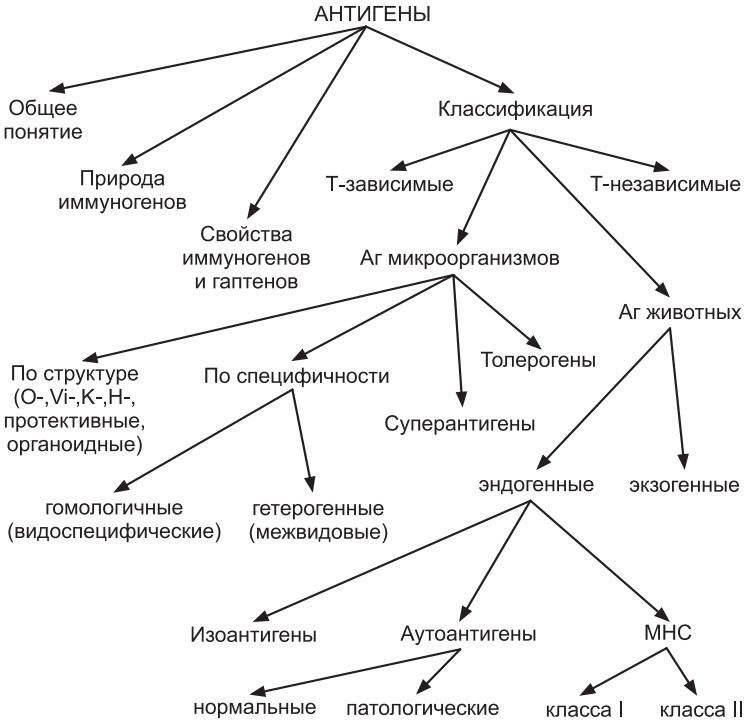
Различают три класса антигенов МНС. Антигены класса I и класса II кодируются генами, расположенными соответственно в 3′- и 5′-участках комплекса, а гены, детерминирующие антигены МНС класса III, – в средней его части. По химической структуре все три класса антигенов являются трансмембранными гликопротеинами, выступающими над поверхностью клеток и проникающими внутрь их цитоплазмы. Структура их разнообразна. Антигены класса I состоят из тяжелой полипептидной цепи (44 кД), нековалентно связанной с β-микроглобулином (12 кД), а антигены класса II – из α- и β-полипептидных цепей с молекулярной массой 33 кД и 29 кД соответственно. Антигены МНС класса III в своем составе содержат С4, С2 и В-фракции комплемента, фактор некроза опухолей и белки теплового шока.

Антигены МНС содержатся во всех органах и тканях. Самыми распространенными из них являются антигены класса I. Они экспрессированы (представлены) на всех клетках, имеющих ядро; чаще – на цитомембранах лимфоидных клеток, редко – на клетках мозга и скелетных мышц (их нет на ворсинчатом трофобласте зародышевых клеток, что предотвращает опасность отторжения плода). Антигены МНС класса II экспрессируются на дендритных клетках, активированных макрофагах и В-лимфоцитах, но под воздействием γ-интерферона (цитокина) появляются на эндотелии капилляров и многих эпителиальных клетках. Детерминирующие их гены отличаются необычайно высокой полиморфностью. Так, например, для одного гена HLA A класса МНС I известно 60, для HLA B – 136, а для гена HLA C – 38 аллельных вариантов, что, естественно, определяет вариабельность их продуктов (антигенов).

Антигены МНС выполняют в организме разнообразные функции. Так, антигены класса III определяют образование конвертаз и, следовательно, участвуют в активации комплемента. Более важную функцию выполняют антиге-

ны классов I и II. Они, в частности, служат объектом отторжения аллотрансплантатов, распознавания, разрушения и удаления из организма всех других антигенов; индуцируют процессы пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток; входят в состав рецепторов тимоцитов.

Антигены, распознающиеся тимоцитами, называются Т-зависимыми, не распознающиеся ими – Т-независимыми. Первых намного больше, чем вторых. К Т-независимым антигенам относятся бактериальные липополисахариды, сложный полисахарид стрептококков, полимеризованные белки жгутиков бактерий, которые в отличие от Т-зависимых не деградируют в лизосомах фагоцитов. Т-зависимые антигены индуцируют разнообразные иммунные процессы, а Т-независимые – лишь антителообразование, происходящее без участия Т-клеток.



Граф 43

Иммунная система

Материальным субстратом иммунной системы является инкапсулированная (лимфоузлы) и диффузно рассеянная лимфоидная ткань. Ввиду этого иммунную систему нередко отождествляют с лимфоидной системой. В иммунной системе выделяют центральные (первичные) и периферические (вторичные) органы иммунитета. *Центральными* называют те органы, в которых происходит формирование и созревание В- и Т-клеток, способных распознавать антиген, а *периферическими* – органы, где эти клетки затем функционируют.

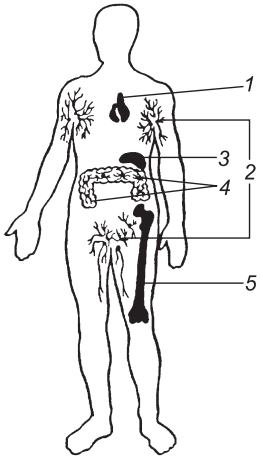


Рис. 60. Органы иммунитета:
1 – вилочковая железа; *2* – лимфоузлы; *3* – селезенка; *4* – скопления лимфоидной ткани кишечника; *5* – костный мозг

Центральными органами иммунитета являются тимус и фабрициева бурса (сумка) у птиц, а у млекопитающих – костный мозг; периферическими – лимфатические узлы, селезенка, а также скопление лимфоидной ткани слизистых оболочек (рис. 60).

Функционирующей основой иммунной системы являются Т-, В-клетки, макрофаги, дендритные и другие вспомогательные антигенпрезентирующие клетки (АПК).

Структура, формирование и происхождение клеток иммунной системы

Т- и В-клетки. Являются эффекторными клетками иммунной системы. По форме, структуре и размерам покоящиеся Т- и В-клетки в отсутствие контакта с чужеродными веществами напоминают собой обычные лимфоциты крови диаметром 7–9 мкм с круглым или бобовидным ядром и узким ободком цитоплазмы, бедной цитоплазматическими гранулами (см. рис. 55). Их характерной особенностью является наличие на внешней мембране уникаль-

ного рецептора для распознавания одного антигена, которые у Т-клеток сокращенно обозначают TCR (***T*** ***c****ell* ***r****eceptor*), а у В-клеток – BCR (***B*** ***c****ell* ***r****eceptor*).

TCR зрелой Т-клетки является белковым гетеродимером, главная часть которого у одного типа рецептора представлена полипептидными цепями α и β, а у другого – γ и δ – с молекулярными массами соответственно 27 и 32, 35 и 45 кД. В их составе имеется по два домена (глобул): прилежащие к поверхности мембраны, константные, и выступающие кнаружи от нее – вариабельные. Константными доменами рецептор нековалентно связан с CD3, в состав которого входит пять полипептидных цепей γ, δ, ε, ζ, η, являющихся трансмембранными белками, передающими внутрь клетки сигналы о связывании антигена.

Кроме комплексов TCR-CD3, число которых на мембране зрелых клеток может составлять 30–40 тыс. молекул, находятся молекулы-корецепторы CD4 и CD8, играющие вспомогательную роль при распознавании антигенных пептидов. По их наличию выделяют две основные популяции Т-лимфоцитов – $CD4^+$-клетки, или Т-хелперы (помощники), распознающие комплексы антигенных пептидов на молекулах МНС класса II макрофагов, дендритных клеток и В-лимфоцитах, и $CD8^+$-клетки, или Т-киллеры (убийцы), часто называемые цитотоксическими лимфоцитами (ЦТЛ), которые распознают пептиды на молекулах МНС класса I всех ядерных клеток. Большое участие в процессе распознавания антигена Т-клетками имеют еще две дополнительные молекулы-корецепторы, в частности однотипная CD28 и различные изоформы (варианты) CD45. Самая крупная изоформа CD45RA с молекулярной массой 220 кД, свойственная ранее не контактировавшим с антигеном «наивным» Т-лимфоцитам, при антигенной дифференциации последовательно преобразуется в другие изоформы вплоть до формирования CD45RO, специфичной клеткам памяти (см. «Иммунный ответ»). Что касается CD28, то она присутствует на всех $CD4^+$-клетках и на 60–70 % $CD8^+$-лимфоцитах, но связывается с рецепторным комплексом только в процессе распознавания ими антигена.

BCR имеет иммуноглобулиновую природу и в зрелой покоящейся В-клетке представлен мономерным IgM (сывороточный IgM пентамер) в комплексе с IgD и дополнительными молекулами Igα и Igβ, участвующими в передаче сигнала о связывании антигена в клетку.

Помимо иммуноглобулиновых рецепторов для распознавания антигена, число которых может составлять около 150 000 молекул, зрелые В-лимфоциты располагают мембранными молекулами CD80, CD86 и CD40, эффективно контактирующими с Т-хелперами, а также рецепторами для Fc фрагмента IgG, C3b фракции комплемента, интерлейкинов 1 и 4, интерферона γ. К тому же на их мембранах экспрессированы антигены МНС классов I и II, позволяющие В-лимфоцитам выполнять функцию антигенпрезентирующих клеток.

Т- и В-клетки происходят от кроветворной стволовой клетки. Начальные этапы своего развития в эмбриональном периоде, основой которого является формирование рецепторного аппарата, Т-клетки проходят в желточном мешке и печени, а В-клетки у птиц – в костном мозге. Появляющиеся предшественники Т-клеток, приобретающие маркерные молекулы CD7 или CD4, мигрируют в тимус, а преВ-клетки, на которых экспрессируются CD19 молекулы, – в фабрициеву сумку, где те и другие дифференцируются в зрелые Т- и В-лимфоциты с полноценными TCR и BCR. У млекопитающих созревание рецепторного аппарата В-лимфоцитов в эмбриональном периоде протекает в печени, а в постнатальном (послеродовом) – в костном мозге.

Созревшие клетки расселяются затем в лимфатические узлы и селезенку, занимая в них относительно обособленные места: В-клетки – кортикальные зоны лимфоузлов, а Т-клетки – паракортикальные или соответствующие зоны лимфоидных фолликулов селезенки. Правда, Т-клетки постоянно рециркулируют, т. е. покидают иммунные органы, проникают в кровоток, а из него – вновь в лимфоидные органы.

Популяция Т-лимфоцитов весьма многочисленна. Больше всего их в тимусе и грудном лимфатическом протоке, где они составляют соответственно 95–100 и 80–90 %,в крови и лимфатических узлах – 55–85 %, в селезенке и лимфоидной ткани слизистых оболочек – 25–40 %. Практически отсутствуют Т-клетки в костном мозге. Большая часть Т-лимфоцитов – долгоживущие клетки, нередко функционирующие на протяжении всей жизни организма. Высокочувствительны к радиации. По отношению к циклофосфамиду Т-киллеры более устойчивы, чем Т-хелперы.

Пул В-лимфоцитов в организме животных тоже значителен: 40–60 % от общей массы клеток находится в групповых лимфатических фолликулах, костном мозге, крови, селезенке и 25 % – в лимфатических узлах и грудном лимфатическом протоке. Практически нет В-лимфоцитов только в тимусе. Продолжительность жизни зрелых В-лимфоцитов, не подвергающихся воздействию антигенов, составляет несколько месяцев.

Субпопуляции Т- и В-клеток. Популяции Т- и В-клеток неоднородны не только по структуре рецепторного аппарата, но также и по эффектам действия и участию в иммунном ответе. Так, $CD4^+$-Т-хелперы, или ТхО-клетки, под воздействием антигенов могут дифференцироваться на две субпопуляции – в направлении воспалительных хелперов Тх1, выполняющих посредническую функцию в формировании Т-киллеров и участвующих в цитотоксических клеточных реакциях, или в направлении иммунных хелперов Тх2 гуморального ответа, индуцирующих трансформацию В-лимфоцитов в плазмоциты. Пути дихотомии (*dicha* – на две части, *tome* – сечение) ТхО определяются, прежде всего, природой антигена-индуктора, его дозой, антигенпрезентирующими клетками и микроокружением. Так, микобактерии, вирус гриппа, стрептокиназа, интерлейкин 12 (ИЛ-12) направляют дифференциацию ТхО-клеток в сторону Тх1, а ИЛ-4 и аллергены – в направлении Тх2; действие высоких и низких доз антигена приводит к возникновению Тх1, а средних – к Тх2; при контакте ТхО с В-лимфоцитами развиваются Тх1, а при контакте с дендритными клетками и макрофагами – Тх2; развитию Тх1 благоприятствует микроокружение лимфоузлов, а Тх2 – микроокружение слизистых оболочек.

В популяции $CD8^+$-Т-лимфоцитов различают прецитотоксическую и цитотоксическую субпопуляции. Относительно индукции формирования ЦТЛ существует три предположения: 1) $CD8^+$-клетки активируются антигенпрезентирующими дендритными клетками, вырабатывающими необходимый им для размножения интерлейкин 2 при условии экспрессии большого числа костимулирующих молекул CD80 и CD86; 2) тот же механизм активации $CD8^+$-клеток может достигаться с помощью воздействия на дендритные клетки интерферона γ, продуцируемого Тх1-субпопуляцией; 3) допускается, что умеренно стиму-

лируемые $CD8^+$-клетки на АПК активируются, синтезируя собственный ИЛ-2.

В популяции В-лимфоцитов различают две субпопуляции: самоподдерживающуюся в брюшной полости, сальниковую В1, содержащую молекулу CD5, и костномозговую, обычную В2, не имеющую CD5-антигена. Основное отличие CD5-клеток состоит в том, что они в постнатальном периоде остаются потенциально агрессивными в отношении собственных клеток и тканей и могут вырабатывать полиспецифические IgM-аутоантитела, которые участвуют в развитиии аутоиммунных патологических процессов. Не имеющая CD5-молекул субпопуляция В2-лимфоцитов, превратившись в антителообразующие плазмоциты, продуцирует не поли-, а видоспецифические IgM, и не к собственным, а к чужеродным антигенам. При этом тимуснезависимые антигены индуцируют трансформацию В2-лимфоцитов в плазмоциты без дополнительных стимуляторов, а тимусзависимые – с помощью Т-хелперов, макрофагов, стромальных отростчатых клеток и выделяемых ими цитокинов (см. «Иммунный ответ»).

Т-супрессоры. Популяция супрессоров (*supressum* – подавлять) в отличие от эффекторных Т- и В-клеток функционирует как регулятор нормального иммунного ответа, в частности, под ее контролем находится Т-клеточный и тимусзависимый гуморальный ответы, а также поддержание иммунной толерантности к аутоантигенам, к которым, правда, могут иметь отношение и так называемые вето-клетки, являющиеся, по-видимому, аутоспецифическими лимфоцитами.

Основной клеткой-мишенью Т-супрессоров считаются Т-хелперы. Т-супрессоры также оказывают влияние на В-лимфоциты, особенно отчетливо – в процессе регуляции образования IgE. Описано несколько структурных цепей рецепторов Т-супрессоров и гуморальных факторов (в том числе цитокинов), реализующих их действие, но получить клоны негибридомных Т-супрессоров и клонировать их гены гуморальных факторов и МНС не удается. Вследствие этого некоторые исследователи считают, что супрессорами является киллерная субпопуляция лимфоцитов, поскольку $CD8^+$-клетки в ряде экспериментов способны регулировать иммунные ответы. Однако каким образом они распознают антигены, связанные с молекулами МНС

класса II, как реализуется супрессорное действие $CD8^+$-клеток в отношении Т-хелперов и В-лимфоцитов и почему они проявляют свое действие только на поздних стадиях развития иммунного ответа – остается не раскрытым. С позиции взаимных ингибирований функций супрессорными можно назвать субпопуляцию $CD4^+$-клеток, ее подклассы Тх1 и Тх2 и даже – активированные макрофаги. Из этого вытекает, что скептицизм относительно существования Т-супрессоров не развеял реальности механизмов активной иммуносупрессии, опосредованной разновидностью Т-лимфоцитов, которые в 70-х гг. XX в. назвали Т-супрессорами. Как и эффекторные Т-лимфоциты, они очень чувствительны к ионизирующей радиации, но отличаются от них коротким периодом жизни.

Макрофаги. Макрофаги – основной тип клеток моноцитарной системы лимфоцитов. Они представляют собой гетерогенные по функциональной активности клетки диаметром 15–25 мкм с хорошо развитой цитоплазмой (см. рис. 55, *а*). На их поверхности имеются специфические рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов G, M, A и E, нескольким субфракциям комплемента, гормонам, нейромедиаторам, гистамину, бактериальным липополисахаридам. Активное взаимодействие макрофагов с окружающими их клетками и межклеточным матриксом определяется наличием на их поверхности ряда адгезивных молекул и рецепторов к цитокинам, в частности хемотаксическим. Макрофаги не имеют собственных рецепторов для распознавания антигенов, но могут осуществлять эту функцию через фиксацию на их поверхности иммуноглобулинов. На всех макрофагах содержатся антигены МНС класса I, а на активированных – МНС класса II, имеющие непосредственное отношение к представлению антигенных пептидов Т-хелперам. Секретируют различные фракции комплемента и цитокины, стимулирующие пролиферацию и дифференциацию стволовых лимфоцитов в гранулоциты. Они обладают высокой микробоцидной активностью. Так, в развитом лизосомальном аппарате макрофагов содержатся лактоферрин и лизоцим, протеиназы, катепсин G, дифензины и другие вещества, повреждающие стенки бактерий и нарушающие их метаболические процессы. Такое же действие на фагоцитированные бактерии оказывают последовательно образующиеся в макрофагах

анион супероксид (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2) и ионы $HClO^-$, в катализе которых участвуют соответственно НАДФ-оксидаза с цитохромом *b*, дисмутаза и миелопероксидаза. При определенных условиях макрофаги проявляют также цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Общая численность моноцитов и макрофагов в организме человека – около $2 \cdot 10^{11}$. Продолжительность их жизни – от 20 сут до 7 мес. В большинстве случаев срок обновления популяций тканевых макрофагов равен 20–40 дням.

Дендритные клетки. Термином *дендритные* (*dendron* – дерево) называют отростчатые клетки эпидермиса и стромы органов, в том числе лимфоидных, несущих молекулы MHC класса II.

Точнее говоря, существует шесть разновидностей клеток с дендритной морфологией: белые отростчатые эпидермоциты (клетки Лангерганса); близкие им по свойствам дендритные клетки слизистых оболочек бронхолегочного и пищеварительного трактов; вуалевые клетки лимфы с вуалями-отростками; дендритные клетки зародышевых центров лимфоузлов; интердигитальные (межпальцевые) клетки тимуса; и, главное, интердигитальные клетки лимфатических узлов. Большая часть их происходит из клеток Лангерганса, которые хорошо связывают и обрабатывают антиген, но практически не осуществляют его презентацию. Полагают, что это связано с отсутствием на их поверхности костимулирующих молекул CD80 и CD86. Эти молекулы приобретаются интердигитальными клетками в результате трансформации клеток Лангерганса в лимфатических узлах, куда они мигрируют в процессе развития воспаления и иммунных реакций. В отличие от своих предшественников интердигитальные клетки утрачивают способность связывать и обрабатывать антиген, но эффективно представляют процессированный антигенный пептид Т-хелперам, вызывая их активацию, деление и секрецию цитокинов. На поверхности этих клеток много продуктов MHC класса II, но нет рецепторов к Fc-фрагменту иммуноглобулинов и субфракциям комплемента. Как и макрофаги, интердигитальные клетки обладают адгезивностью, способны к пиноцитозу, но не фагоцитируют. Дендритные клетки имеют костномозговое происхождение и могут возникать как из моноцитарных предшественников, так и из зрелых моноцитов. Точно не установлена

лишь природа дендритных клеток зародышевых центров лимфоузлов, которые могут являться «хранилищем» антигена и обеспечивать длительное поддержание иммунологической памяти. Но если они, как полагают, действительно являются потомками фибробластов, то займут особое место среди остальных типов дендритных клеток.

Таким образом, основными клеточными элементами, обеспечивающими приобретенный иммунитет, являются В-лимфоциты, Т-лимфоциты, макрофаги и дендритные антигенпрезентирующие клетки. При этом иммуноциты созревают в центральных органах иммунитета, а функционируют вместе с А-клетками как единое целое в лимфатических узлах, селезенке и других вторичных органах иммунитета.

Строение и биологическая роль органов иммунитета

Тимус. Тимус – парный дольчатый орган, находится в верхнем отделе переднего средостения, по конфигурации напоминает пирамиду, обращенную вершиной кверху. Орган покрыт соединительно-тканной капсулой, от которой отходят перегородки, разделяющие его паренхиму на дольки. Основу долек составляет эпителиальный ретикулум, представленный рыхлой сетью звездчатых клеток, петли которой инфильтрированы лимфоцитами, макрофагами и небольшим количеством эозинофилов, нейтрофилов и тучных клеток. В каждой дольке различается корковое и мозговое вещество. В наружном кортикальном слое содержатся интенсивно красящиеся и размножающиеся лимфобласты, от которых происходят все тимоциты. Они тесно связаны с гигантскими эпителиальными клетками-няньками, и на первый взгляд кажется, как будто находятся даже в их цитоплазме. Ближе к мозговому слою во внутреннем корковом веществе преобладают малые непролиферирующие лимфоциты. В мозговом веществе лимфоцитов гораздо меньше, чем звездчатых эпителиальных клеток. Часть последних уплощается и образует концентрические скопления, или тельца Гассаля, в центре которых находится клетка, продуцирующая секретоподобное вещество. Звездчатые и эпителиальные клетки, тельца Гассаля, как сейчас полагают, выделяют

тимулин, тимозин, тимостимулин, тимопоэтин и другие гормоны, обусловливающие дифференциацию претимических лимфоцитов в зрелые тимоциты со специфическим рецепторным аппаратом распознания антигенов.

Тимус закладывается на шестой неделе эмбрионального развития и к моменту рождения ребенка полностью созревает, что уже само по себе может говорить о каком-то особом его назначении. Исследования в этом направлении показали, что тимэктомия (удаление тимуса) у мышей, крыс, хомяков в первые сутки после рождения приводит к снижению общего количества лимфоцитов и атрофии паракортикальной зоны всех лимфоузлов, потере способности отторгать чужеродные ткани или реагировать на аллергены по механизму гиперчувствительности замедленного типа. Процесс антителообразования у тимэктомированных животных практически не нарушается. Поэтому понятно, что в тимусе формируются лимфоциты паракортикальной зоны лимфоузлов, которые элиминируют чужеродную метку.

Фабрициева бурса и костный мозг. Сумка Фабриция, или фабрициева бурса, где созревают преВ-клетки у птиц, является эктодермальным выростом клоаки. Как и тимус, является лимфоэпителиальным органом, состоящим из долек, в которых различают те же корковую и мозговую зоны, а в них, среди эпителиальных клеток и ретикулоцитов, – тяжи больших и малых лимфоцитов. Раннее удаление фабрициевой сумки *in ovo* или в первые два-три дня жизни приводит к полной утрате синтеза антител без нарушения способности организма реагировать на антиген клеточными иммунными реакциями. Это прямо указывает на то, что из ее лимфоидных клеток формируются плазмоциты.

Созревание В-клеток у млекопитающих происходит в губчатом веществе костного мозга. Костный мозг представлен ретикулярной стромой (соединительно-тканной подложкой), сетью сосудов и нервных волокон, стволовыми клетками, внешне схожими с малыми лимфоцитами крови, клетками кроветворной и жировой ткани.

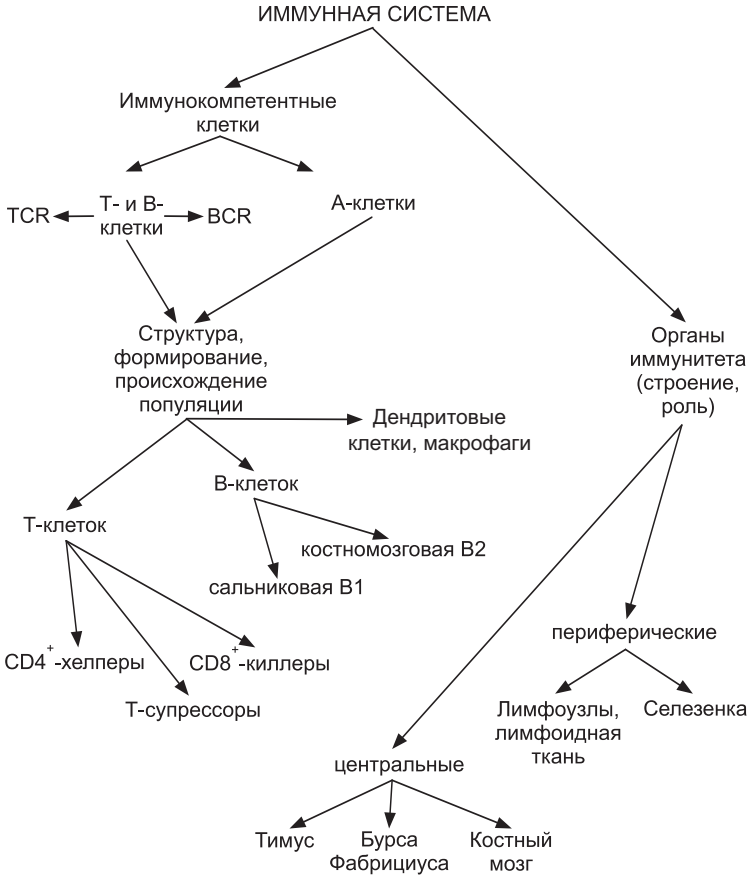
Лимфатические узлы. Лимфоузлы состоят из лимфоидных клеточных элементов, расположенных в сети ретикулярных клеток. Каждый из них снаружи покрыт соединительно-тканной капсулой, от которой отходят трабеку-

лы, разделяющие их на доли. В лимфоузлах различают *кортикальную* зону, прилегающую к капсуле, и *паракортикальную*, отделяющую корковое вещество от мозгового. На гистологических срезах в кортикальной зоне интактного лимфоузла находят сферической формы, хорошо красящиеся плотные скопления лимфоидных элементов – первичные фолликулы, а при воздействии антигенов – вторичные с бледно окрашенным зародышевым центром. В нем обнаруживаются интенсивно пролиферирующие В-лимфоциты и плазмобласты, из которых формируются плазмоциты. В зоне очень мало Т-лимфоцитов, и поэтому она называется *тимуснезависимой*. Наоборот, в паракортикальной *тимусзависимой* зоне активно пролиферируют и дифференцируются Т-лимфоциты, а зародышевые центры отсутствуют.

Кровеносные сосуды питают лимфоузлы через ворота, расположенные в вогнутой части лимфоузлов. Лимфа поступает в них через выпуклую часть, а выходит – через ворота. Содержащиеся в крови и лимфе чужеродные частицы адсорбируются в лимфоузлах ретикулярными клетками и макрофагами. После распознавания антигена происходит пролиферация лимфоцитов и выселение плазмоцитов в мозговое вещество из зародышевых центров. Титр антител в оттекающей от стимулированного лимфоузла лимфе коррелирует со степенью митотической активности лимфоцитов в зародышевых центрах. Таким образом, лимфоузлы являются не просто механическими барьерами, задерживающими микробы, а, прежде всего, – центрами, где происходит рекогносцировка антигенов и их элиминация.

Селезенка. Как и лимфоузлы, селезенка является периферическим органом иммунитета. Снаружи покрыта соединительно-тканной капсулой, от которой, так же как и в лимфоузлах, отходят многочисленные трабекулы, составляющие каркас органа. Ее паренхима состоит из красной и белой пульпы. Красную пульпу образуют капиллярные петли, между которыми располагаются эритроциты и сравнительно небольшое количество лимфоидных элементов. Белая пульпа в виде сероватых участков в красной пульпе содержит большие массы лимфоцитов и макрофагов, в том числе – мальпигиевые тельца и зародышевые фолликулы, эквивалентные вторичным фолликулам лимфоузлов. Так же, как в лимфатических узлах, в селезенке образуются плазмоциты и антитела.

Лимфоидная ткань слизистых оболочек. Диффузно рассеянная ткань слизистых оболочек кишечника, дыхательных путей и мочеполового тракта состоит из скопления лимфоцитов и макрофагов. Содержит большое количество плазматических клеток. При антигенном стимуле в лимфоидной ткани возникают зародышевые центры, активируются Т- и В-лимфоциты, происходит макрофагальная реакция, продуцируются секреторные иммуноглобулины, которые, покрывая слизистые оболочки, обеспечивают местный иммунитет.



Граф 44

Антитела (иммуноглобулины)

Антитела – это особый вид белков, называемых иммуноглобулинами (Ig), который вырабатывается под влиянием антигенов и обладает способностью специфически реагировать с ними. При этом антитела могут нейтрализовать токсины бактерий и вирусы (антитоксины и вирус-нейтрализующие антитела), склеивать корпускулярные антигены (агглютинины), осаждать растворимые антигены (преципитины), повышать фагоцитарную активность лейкоцитов (опсонины), совместно с комплементом лизировать бактерии и другие клетки, например эритроциты (лизины), связывать антигены, не вызывая каких-либо видимых невооруженным глазом реакций (блокирующие антитела).

Структура мономерного иммуноглобулина. Электронно-микроскопические исследования показали, что молекула мономерного Ig имеет форму буквы игрек с меняющимися углами между двумя ее верхними отрезками. Его структуру в 70-х гг. XX в. определили Р. Портер и Г. Эдельман. Он состоит, как оказалось, из четырех полипептидных цепей, связанных друг с другом дисульфидными мостиками (рис. 61). Две из них – длинные и в верхней трети изогнутые, как хоккейные клюшки, а две другие – короткие и прямые – прилегают к верхним отрезкам длинных цепей. Молекулярная масса длинных цепей – 50–70 кД, коротких – около 24 кД. Длинные полипептидные цепи иммуноглобулина называют тяжелыми или H-цепями (*heavy* – тяжелый), а короткие – легкими или L-цепями (*light* – легкий). Длинная цепь содержит 4–5 доменов, а короткая – всего лишь два. Структура верхних доменов H- и L-цепей у разных иммуноглобулинов силь-

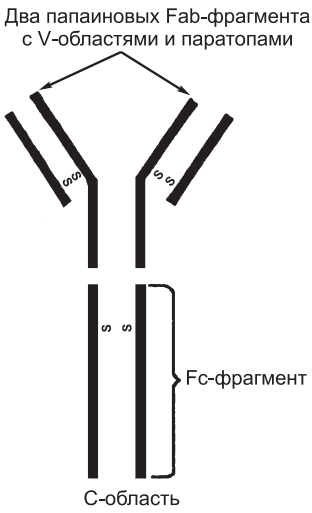


Рис. 61. Строение иммуноглобулина

но **в**арьирует, а у остальных – **к**онстантна (постоянна), поэтому первые называются **V**-доменами, а вторые – **C**-доменами.

По строению С-доменов в составе L-цепей выделяют два изотипа – κ (каппа) и λ (лямбда), а у Н-цепей – пять изотипов – μ (мю), γ (гамма), α (альфа), δ (дельта), ε (эпсилон). В зависимости от разновидностей Н-цепей различают пять основных классов иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgA, IgD, IgE. На основе более тонких различий аминокислотной последовательности Н-цепей среди IgG выделяют подклассы IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, а среди IgA – IgA и **с**екреторные IgAS. Разные типы тяжелых цепей друг с другом не рекомбинируют ввиду существенных различий химической структуры. Для определенного класса иммуноглобулинов они строго специфичны. Легкие цепи способны рекомбинировать с любым изотипом тяжелых цепей, и в молекуле иммуноглобулинов различных классов могут быть по два κ- или λ-изотипа, но никогда – по одному каждого.

V-домены L- и Н-цепей имеют прямое отношение к распознаванию антигенов. В результате их комбинирования в молекуле мономерного иммуноглобулина формируются два антигенсвязывающих участка (центра) с индивидуальной, сильно варьирующей от молекулы к молекуле специфичностью или, как их по механизму взаимодействия с антигеном называют, антидетерминантами или паратопами.

Под влиянием папаина игрек-молекулу иммуноглобулина удалось расщепить на три фрагмента: два верхних, так называемых Fab-фрагмента (*Fragment antigen binding*), содержащих по одному антигенсвязывающему центру, и нижний, константный Fc-фрагмент (*Fragment crystallizable*), неспособный к взаимодействию с антигеном и представляющий собой константные домены тяжелых цепей. Иммуноглобулины Fc-фрагментом адсорбируются на рецепторах иммунокомпетентных клеток. У антител, связавших антиген, на Fc-фрагменте по классическому пути активируется комплемент.

Структурные особенности различных классов Ig. Среди пяти классов иммуноглобулинов различают три мономера и два полимера (рис. 62). Мономерами являются IgG, IgE, IgD и сывороточный IgA, у которых имеется два антигенсвязывающих центра, а полимерами – IgM и IgAS, который секретируется на слизистых оболочках и не обнаруживается в кровотоке. В состав IgM входит пять моно-

мерных молекул, полимеризованных (связанных) в области Fc-фрагментов J-цепями. Секреторный IgAS – димер. Он состоит из двух мономерных молекул, защищенный от воздействия протеолитических ферментов особым гликопептидом (секреторным компонентом), который продуцируется эпителиальными клетками.

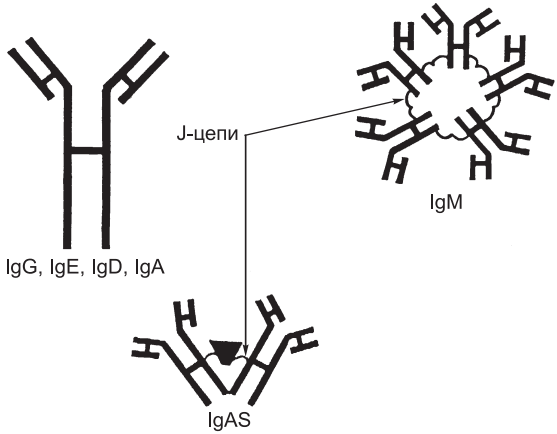


Рис. 62. Классы иммуноглобулинов

Механизм взаимодействия антител с антигеном. Антигенсвязывающие центры у разных иммуноглобулинов имеют различную конфигурацию, комплементарную детерминантной группе (гаптену, эпитопу) того антигена, под воздействием которого выработались. Вследствие этого распознавание антигена соответствующим антителом происходит не по химической структуре, а, главным образом, по трехмерной форме наружного электронного облака, иными словами, по общей конфигурации гаптена благодаря взаимной комплементарности с антигенсвязывающим центром. Таким образом, антитела связываются с антигенами нековалентно за счет пространственной комплементарности, которая обеспечивается межмолекулярными силами и водородными связями. При этом прочность взаимодействия между антигеном и антигенсвязывающими центрами называется *аффинностью* (сродством).

Виды антител. Среди иммуноглобулинов-мономеров по функциональной активности различают два вида антител (Ат) – *полные* и *неполные*. Полные Ig взаимодействуют с антигенами (Аг) двумя паратопами, неполные – только одним. Вследствие этого полные (двухвалентные) антитела в реакции агглютинации образуют крупные иммунные комплексы, оседающие в виде зерен-хлопьев на дно пробирки, а неполные (одновалентные) – видимой реакции не вызывают. Если реакции взаимодействия неполных свободноплавающих Ат с Аг происходят в крови, не вызывая каких-либо болезненных проявлений в организме, их называют *антителами-свидетелями*, *блокирующими* или *комплементсвязывающими*, так как образуемые ими иммунные комплексы одновременно связывают комплемент. Реагирование неполных цитофильных IgE и IgG с антигенами может приводить к развитию аллергии. При незначительных, бесследно исчезающих ее проявлениях на кожных покровах человека их называют *реагинами*, а при ярко выраженных повреждениях кожи – *агрессинами* или *кожно-сенсибилизирующими антителами*.

Свойства иммуноглобулинов

Физико-химические особенности. По физико-химическим свойствам различные иммуноглобулины представляют собой белки с относительно высокой молекулярной массой (150–350 кД), обозначаемые по константе седиментации как 7S – IgG, IgD, IgA; 7,7–8,0 S – IgE; 9–12 S – IgAS. Макроиммуноглобулин M имеет молекулярную массу 900 кД (19S).

Биологические особенности. Рассматривая биологические свойства иммуноглобулинов, нужно отметить, что содержание их в крови непостоянно и колеблется от 0–450 нг/мл (IgD и IgE) до 0,5–4 мг/мл (IgM и IgA) и 8–16 мг/мл (IgG).

В ответ на первичное введение в организм антигена вырабатываются IgM. Они отличаются выраженной авидностью (жадностью); обладая 10 антигенсвязывающими центрами, образуют прочные соединения с антигенами, несущими множественные эпитопы; вызывают агглютинацию; обеспечивают устойчивость к бактериальным инфекциям. Однако IgM сохраняются недолго, и период их полувыведения не превышает 5 дней.

При повторном попадании антигена в организм происходит бурная выработка IgG, обеспечивающих нейтрализацию бактериальных токсинов и вирусов. Связываясь с микроорганизмами, IgG активируют комплемент, вызывают хемотаксис нейтрофилов. Микрофаги быстро поглощают бактерии, обработанные IgG и комплементом, так как имеют рецепторы к Fc-фрагменту антител и C3b-субфракции комплемента. IgG легко проникают через барьеры, в частности сквозь плаценту, попадая в кровь плода. В последующем их титр пополняется при кормлении ребенка грудным молоком, что обеспечивает ему иммунитет в первые недели жизни. Период полувыведения IgG равен 24 дням.

IgA, IgAS, IgE продуцируются как на первичное, так и на вторичное воздействие антигена. При этом сывороточные IgA накапливаются в крови. Биологическая роль их до конца не изучена. Секреторные IgAS продуцируются в слизистых оболочках кишечника, верхних дыхательных и мочевыводящих путей, содержатся в глазной жидкости, слюне, молоке и обеспечивают местный иммунитет тканей. Период полувыведения равен 6 дням.

IgE – цитофильный иммуноглобулин. Он, в частности, связывается с тучными клетками и базофилами крови. В случаях взаимодействия цитофильных IgE с антигенами на этих клетках образуются иммунные комплексы, индуцирующие выработку ими медиаторов воспалительной реакции. Активирует эозинофилы и является основным иммуноглобулином специфической защиты организма при паразитарных инфекциях.

Функция сывороточного IgD в иммунологических процессах при различных инфекционных процессах не вполне ясна. Он является одним из основных типов мембранных иммуноглобулинов.

Антигенная структура. Как все белки, иммуноглобулины являются антигенами, и по отношению к ним вырабатываются *антииммуноглобулины*, т. е. антитела против антител. В молекулах иммуноглобулинов различают три вида детерминант: изотипические, аллотипические и идиотипические.

Изотипические и *аллотипические детерминанты* локализованы в С-областях иммуноглобулинов и специфичны для Н- и L-цепей того или иного типа. Изотипические детерминанты разных классов иммуноглобулинов иден-

тичны для всех особей определенного вида; аллотипические – кодируются аллельными генами и у одних особей имеются, а у других – отсутствуют.

Идиотипические детерминанты, ассоциированные с гипервариабельными участками иммуноглобулинов, уникальны для структуры антигенсвязывающих центров антител. Суммарное число вариантов этих детерминант может составлять 10^{17}. Обнаруживаются они лишь у отдельных индивидуумов популяции с помощью антиидиотипических антител. Такое разнообразие антигенраспознающих молекул у В-лимфоцитов, как установил С. Тонегава, детерминировано многочисленными «зрелыми» генами, которые в геноме зародышевых клеток, однако, отсутствуют. У них имеются лишь их фрагменты: V – зародышевые гены, J – соединительный сегмент, С-гены и D-сегмент, расположенный между V-геном и С-сегментом. «Зрелые» гены, кодирующие антигенраспознающие молекулы, формируются при созревании лимфоцитов в процессе так называемой реаранжировки (перестройки) зародышевых генов, суть которой состоит в изъятии разъединяющего их генетического материала с последующим объединением, в котором участвуют ферменты-рекомбиназы, кодируемые генами RAG-1 и RAG-2. Процесс реаранжировки в В-лимфоцитах сначала осуществляется в генах Н-цепей, а затем – в генах L-цепей. Так, в кластере Н-генов реаранжировка V-генов начинается со случайно избранных элементов D и J путем формирования ДНК петли на участке между ними, затем по тому же механизму сближаются V- и DJ-сегменты, а в кластерах генов L-цепей – V и J. Большое количество V-генов в кластерах, тем не менее, не обеспечивает существующего многообразия антигенсвязывающих участков в молекулах иммуноглобулинов. Ввиду этого в процесс умножения «зрелых» генов включаются несколько дополнительных механизмов. Один из них состоит в нематричном приращивании (достройке) коротких олигонуклеотидов в области соединения V- и DJ-участков, которое активируется терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой. При этом перестройка «зародышевых» генов всегда происходит только в одной хромосоме, чем и достигается аллельное исключение иммуноглобулиновых рецепторов. Таким же путем достигается вариабельность антигенраспознающих доменов у Т-лимфоцитов.

Антителообразование

Образование антител как иммунная реакция на антигены происходит в лимфоидной ткани периферических органов иммунитета, главным образом, в лимфатических узлах и белой пульпе селезенки. Продуцентами антител являются плазмоциты.

Общая иммунная реакция на антиген. Синтез антител начинается в тимуснезависимой зоне и в стенках лимфатических синусов, сопровождаясь общим нарастанием клеточности лимфоузлов, увеличением в них центров размножения с большим количеством митотически делящихся лимфоцитов, появлением вокруг них и в медуллярных тяжах плазматических клеток. В первые сутки после введения антигена резко снижается выход лимфоцитов из лимфатических узлов, а в последующие 3–4 дня, наоборот, значительно возрастает, что ведет к интенсивной миграции (расселению) стимулированных лимфоцитов через кровь во все лимфоидные ткани.

Фазы антителообразования. В динамике образования антител различают две фазы – индуктивную (латентную) и продуктивную, или репродуктивную.

Индуктивной фазой называют отрезок времени между введением антигена и появлением следов иммуноглобулинов или первых плазмоцитов. В этой фазе происходит распознавание антигена. Он фагоцитируется макрофагами (пиноцитируется) или связывается ими. Если вслед за этим антиген полностью разрушается, то антитела не вырабатываются. Антителогенез происходит лишь при частичной деградации антигена. В таком случае в лимфоидной ткани, где происходит связывание антигена, отмечаются массовая гибель и, параллельно, пролиферация клеток, появляется большое количество фагоцитов, увеличивается содержание гистамина, гепарина, серотонина и других веществ, усиливающих воспаление. На этом фоне в конце индуктивной фазы начинается взаимодействие (кооперация) между вспомогательными А-клетками, на мембране которых находится измененный антиген, Т- и В-лимфоцитами, в результате чего молодые В-лимфоциты, или предшественники плазмоцитов, получают сигнал к пролиферации и дифференциации (рис. 63).

Индуктивная фаза очень лабильна и длится примерно 20 ч. Начавшийся процесс антителообразования в ней можно приостановить воздействием неблагоприятных для организма факторов. Легче всего это удается с помощью радиации, вследствие чего индуктивную фазу антителогенеза называют радиочувствительной.

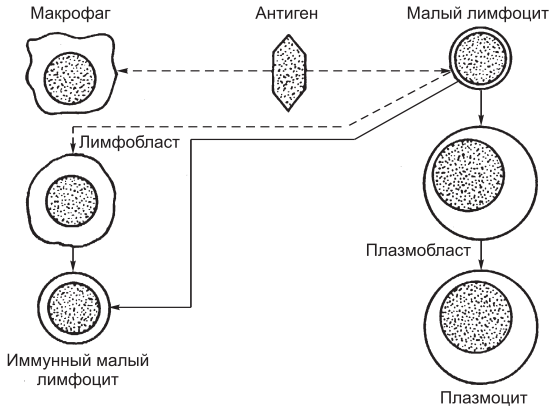


Рис. 63. Трансформация В-лимфоцитов в антителообразующие клетки

В *продуктивной фазе* происходит интенсивный синтез антител. Приостановить его не удается даже радиооблучением, и поэтому продуктивную фазу называют *радиорезистентной*. В этой фазе иммунного ответа усиливается кооперация иммунокомпетентных клеток, и сильно возрастает деление В-лимфоцитов. На смену молодым плазмобластам (иммунобластам) в лимфоидной ткани приходят юные плазмоциты, а затем – и зрелые.

При первичном иммунном ответе максимальное количество плазмоцитов в селезенке и лимфатических узлах появляется на 7-е сут. Это совпадает с высоким титром антител в крови. Повторное введение чужеродного антигена сопровождается необычно интенсивным антителообразованием – высокий титр антител возникает уже на 3–4-е сут, что связано с наличием в организме первично иммунизированных особей клеток иммунологической памяти,

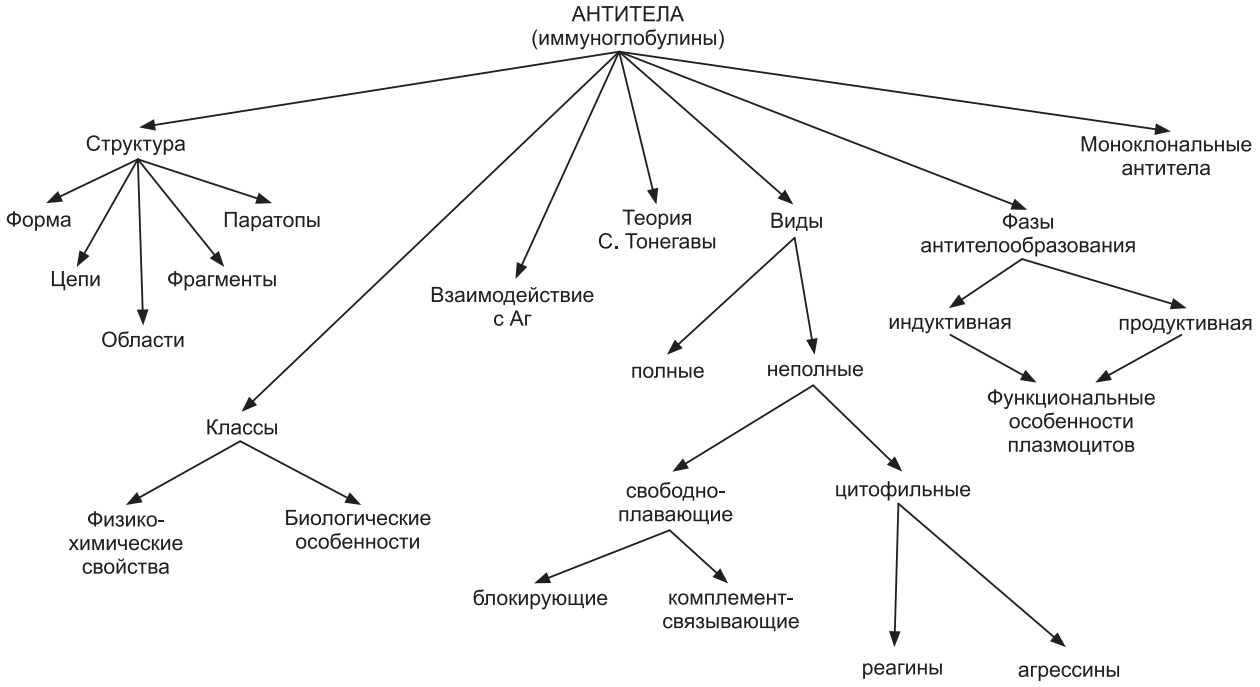
не закончивших полный цикл трансформации (см. «Иммунный ответ»).

Продуктивная фаза антителообразования сравнительно непродолжительна. Применительно к одному клону она продолжается около 10 сут, но по отношению ко многим из них – может удлиняться до нескольких недель. Однако через 2–3 мес. титр антител в крови переболевших инфекционными заболеваниями резко снижается.

Функциональные особенности плазмоцитов. Касаясь функциональных особенностей плазмоцитов, следует подчеркнуть, что они, в известном смысле, могут рассматриваться как своеобразные одноклеточные белковые железы. Плазмоциты секретируют иммуноглобулины по голокриновому или мерокриновому типу. Как правило, плазмоциты образуют антитела одной иммунологической специфичности, например Н- или О- антитела к соответствующим жгутиковым и соматическим антигенам бактерий. Более того, при наличии в молекуле антигена двух разных детерминант плазмоцит вырабатывает антитела против одной из них. Только 0,01 % плазмоцитов продуцирует оба антитела. Большинство плазмоцитов синтезирует лишь один класс тяжелых и один тип легких цепей одновременно. Первичный иммунологический ответ обычно начинается с синтеза макроглобулинов М с константой седиментации 19S. При вторичном ответе на антиген образуются микроглобулины G с константой 7S. Большая часть плазматических клеток образует антитела с константой седиментации либо 7S, либо 19S.

Развитие клона плазмоцитов, начиная от плазмобласта до зрелой формы, занимает 5–6 сут. Жизненный цикл плазмоцитов, продуцирующих тот или иной вид антител, не превышает 48 ч. При этом вырабатывающиеся клоном плазмоцитов антитела представляют собой широкий спектр иммуноглобулинов, отличающихся как по специфичности по отношению к различным детерминантам антигена, так и по авидности.

Моноклональные антитела. Методику получения высокоспецифических антител с большей степенью авидности к определенной детерминантной группе антигена разработали Ц. Мильштейн и Г. Келер, создав бессмертные клоны В-клеток, которые называют *гибридомами*. Гибридомы полу-


АНТИТЕЛА
(иммуноглобулины)
Структура
Форма
Цепи
Области
Фрагменты
Паратопы
Классы
Физико-
химические
свойства
Биологические
особенности
Взаимодействие
с Аг
Теория
С. Тонегавы
Виды
полные
неполные
свободно-
плавающие
блокирующие
комплемент-
связывающие
цитофильные
реагины
агрессины
Фазы
антителообразования
индуктивная
продуктивная
Функциональные
особенности
плазмоцитов
Моноклональные
антитела

Граф 45

чают путем слияния нормальных по продолжительности жизненного цикла лимфоцитов, продуцирующих антитела, с опухолевыми (бессмертными) дефектными линиями В-клеток, неспособными к секреции иммуноглобулинов.

Схематически это осуществляют следующим образом. Антигеном, который имеет, например, две или больше детерминант, иммунизируют мышей или крыс. Получив лимфоциты селезенки, продуцирующие соответствующие к ним антитела, с помощью полиэтиленгликоля разрушают их клеточные стенки и сливают с опухолевыми В-клетками.

Затем взвесь клеток высевают на элективную для гибрида ГАТ-среду, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин, но неблагоприятную как для нормальных лимфоцитов, так и для опухолевых В-клеток.

Получить чистый клон гибридом в ГАТ-среде удается только в том случае, если в лунке микропанели для культур клеток будет находиться одна особь гибрида. Каждая гибридома наследует присущие родительским клеткам свойства: от антителообразующей – способность продуцировать высокоспецифические иммуноглобулины к строго определенному эпитопу, а от опухолевой В-клетки – способность к перевиваемости и неограниченному росту.

Имея одинаковые структуру, идиотип и специфичность, моноклональные антитела нашли широкое применение в идентификации различных видов микроорганизмов, субпопуляций лимфоцитов, определении совместимости групп крови, диагностике опухолей, серотерапии инфекционных заболеваний, новообразований и во многих других областях биологии и медицины.

Иммунный ответ

Иммунный ответ – это антигенспецифическая реакция, развивающаяся в ответ на воздействие конкретного антигена и направленная на его распознавание, разрушение и удаление. В основе развития иммунного ответа лежит взаимодействие иммунокомпетентных клеток, определяющих выбор клеток, включаемых в ответную реакцию на антиген и трансформацию их в эффекторные клетки.

Общие механизмы распознавания антигенов и образование эффекторных клеток. Проникающие в организм антигены, будь то клетки или молекулы, в нативном (при-

родном) виде не распознаются как генетически чужеродные метки (исключением являются В-лимфоциты). Иммунная реакция их распознавания начинается с фагоцитоза антигена макрофагами крови и тканей или с его связывания с дендритными клетками стромы лимфоидных органов. В макрофагах они могут полностью разрушаться, но чаще расщепляются до промежуточных продуктов. В частности, большинство антигенов в течение часа в лизосомах фагоцитов подвергаются ограниченной денатурации и протеолизу или, как чаще говорят, *процессингу*. Оставшиеся от них пептиды (9–10 – 12–25 остатков аминокислот), называемые *номинальным антигеном*, комплексируются с экспрессированными на внешней мембране макрофагов молекулами МНС класса II и в таком состоянии представляются для распознавания. В дендритных клетках антиген тоже процессируется, но может оставаться, как на паренхиматозных клетках, в неизмененном виде. В случае процессинга переструктурированный в них антиген комплексируется с молекулами МНС класса II и класса I.

Макрофаги, дендритные и некоторые другие вспомогательные клетки, несущие на внешней мембране комплексы молекул МНС с включенными в них пептидами, предназначенные для распознавания антигена, называются *антигенпрезентирующими* (*presentatio* – предъявление). Мембранные комплексы антигенпрезентирующих клеток распознают Т-лимфоциты. Таким образом, Т-лимфоциты распознают не антиген как таковой, а его фрагменты, изменяющие структуру антигенов главного комплекса гистосовместимости, т. е. «измененное свое».

Одновременно с распознаванием антигена происходит контактное взаимодействие антигенпрезентирующих клеток и Т-лимфоцитов с помощью комплементарных поверхностных молекул, что обеспечивает их взаимную адгезию и секрецию антигенпрезентирующими клетками ряда цитокинов, которые вызывают сначала активацию Т-лимфоцитов, а затем – пролиферацию и их дифференциацию в эффекторные клетки.

Кооперация иммунокомпетентных клеток в гуморальном иммунном ответе. Иммунный ответ в виде антителообразования происходит при распознавании В-клеткой антигена, который индуцирует ее пролиферацию и дифференциацию в плазмоциты. Прямое воздействие на

В-клетку без участия Т-клеток могут оказывать только тимуснезависимые антигены. По механизму стимулирующего действия их разделяют на два типа: тип 1, к которому относятся бактериальные липополисахариды, и тип 2, включающий полисахариды стрептококков, полимеры D-аминокислот, поливинилпирролидон, полимеризованный флагеллин, не подвергающиеся деградации в лизосомах макрофагов. Тимуснезависимые антигены типа 1 стимулируют деление В-клеток неспецифически, воздействуя как митогены. Антигены типа 2 с многократно повторяющимися детерминантами реагируют с иммуноглобулиновыми рецепторами В-клеток. При этом в специфическом механизме активации В-клеток, кроме них, участвуют макрофаги, выделяя цитокины, стимулирующие их деление и трансформацию в плазмоциты.

Гуморальный иммунный ответ на тимусзависимые антигены начинается со связывания антигена рецептором В-лимфоцитов. Образующийся при этом на мембране В-лимфоцита комплекс IgM+Ag погружается внутрь клетки, где после процессинга и связывания с цитоплазматическими молекулами МНС класса II презентируется на его поверхности для распознавания Т-хелпером. Таким образом, в молекуле тимусзависимого антигена существует два набора эпитопов. Один из них распознается антигенспецифическими рецепторами BCR В-лимфоцитов, а второй, формируемый внутри В-клетки, распознается $CD4^{+}$-Т-хелперами. Эпитоп первого набора, распознаваемый В-клеткой, может иметь различную химическую структуру, например полисахаридную или белковую, а эпитоп второго набора, распознаваемый Т-хелперами, – только белковую. Естественно, что по отношению к эпитопам первого набора В-клетка является распознающей, а к эпитопам второго набора – презентирующей. В результате распознавания Т-хелпером эпитопов второго набора с помощью TCR-рецептора при участии корецептора CD4 и костимулирующих молекул CD28 и CD40L, взаимодействующих, как это показано на рис. 64, с соответствующими им молекулами CD80 и 40, Т-хелперы (Тх0) дифференцируются в Тх2-хелперы, выделяющие ИЛ-4, под влиянием которого В-клетка дифференцируется в плазмоцит, секретирующий антитела.

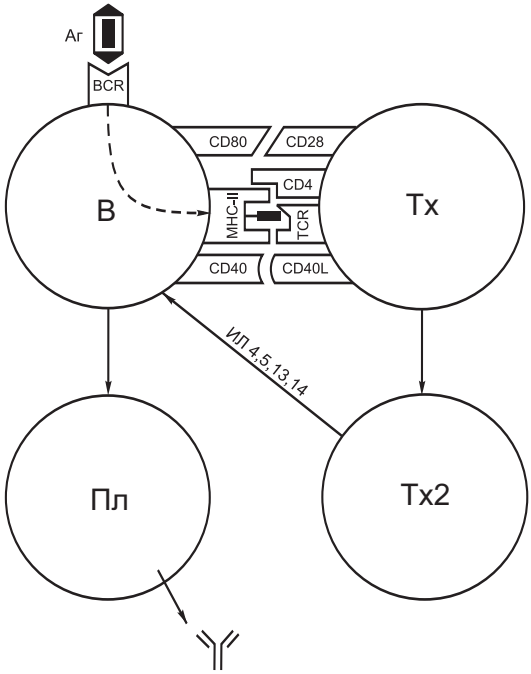


Рис. 64. Кооперация иммунокомпетентных клеток в гуморальном ответе

Кооперация иммунокомпетентных клеток в цитотоксических реакциях. Цитотоксической называют иммунную реакцию, приводящую к формированию цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ), способных разрушать инфицированные или опухолевые (мутантные) клетки с экспрессируемым опознавательным антигеном на их поверхности. В качестве антигенпрезентирующих клеток, как это представлено на рис. 65, в ней участвуют дендритные клетки или макрофаги, презентирующие антигенный пептид в комплексе с молекулами МНС класса II Т-хелперам ($CD4^+$-клеткам), а в комплексе с МНС класса I – прецитотоксическим лимфоцитам ($CD8^+$-клеткам). Для активации тех и других клеток обязательна костимуляция, обусловленная взаимодействием молекул CD80 антиген-

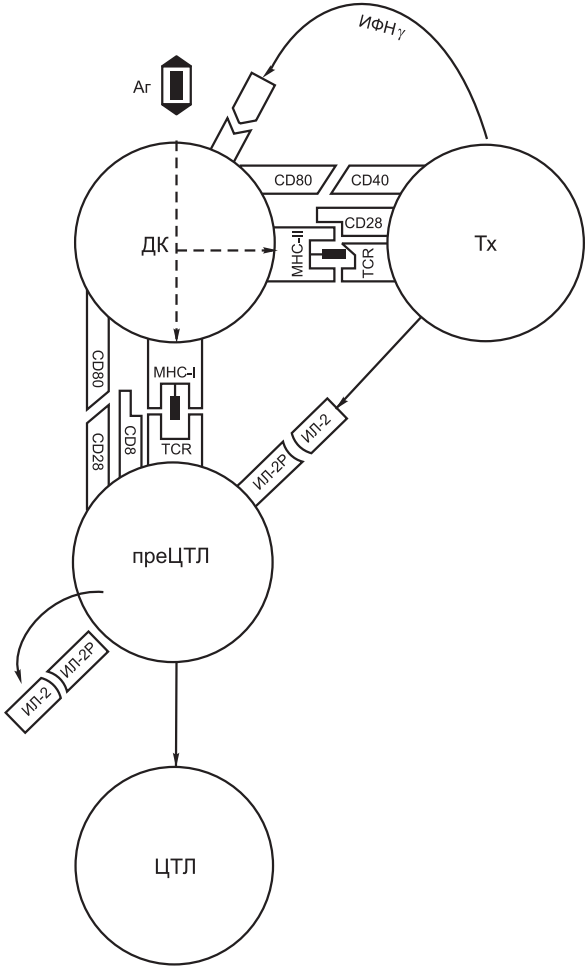


Рис. 65. Кооперация иммунокомпетентных клеток в цитотоксических реакциях

презентирующих клеток с корецептором CD28 Т-лимфоцитов. Распознавшие презентированный антигенный пептид $CD4^+$-клетки продуцируют интерферон γ, активирующий антигенпрезентирующие клетки, а распознавшие антигенный пептид $CD8^+$-клетки подвергаются бласттранс-

формации, экспрессируя молекулы-рецепторы для ИЛ-2, который крайне необходим им для превращения в ЦТЛ и последующего размножения. Источником ИЛ-2 для ЦТЛ на первом этапе служат активированные вместе с ними ТхО-хелперы. Допускается, что на более поздних этапах ИЛ-2 начинают сами вырабатывать $CD8^+$-клетки, стимулированные антигенпрезентирующими клетками, т. е. обеспечивают свое размножение по аутокринному механизму.

В отличие от Т-хелперов, нуждающихся для продолжительной пролиферации в контакте с АПК и в действии многих цитокинов, поддержание размножения активированных ЦТЛ обеспечивается одним ИЛ-2. Интересно, что, стимулируя размножение ЦТЛ, этот цитокин вместе с тем усиливает экспрессию к нему рецепторов и интенсифицирует дальнейшую его выработку. Завершившие деление ЦТЛ, ничем не отличающиеся по внешним признакам от преCD8$^+$-клеток, выселяются из паракортикальных зон лимфоузлов и, попав в циркуляцию, разносятся в различные органы и ткани, где могут разрушать инфицированные и перерождающиеся клетки.

Главным результатом дифференциации ЦТЛ является реализация иммунного цитолиза. Отличается он от неиммунного, вызванного NK-киллерами, тем, что происходит через определенное время, необходимое для формирования активных Т-киллеров. Клетки-мишени распознаются такими киллерами по комплексам антигенных пептидов с молекулами МНС класса I, но без участия антигенпрезентирующих клеток. Механизм иммунного Т-клеточного цитолиза почти таков же, как NK-зависимого, т. е. после установления тесной связи с клеткой-мишенью в зону их межклеточного контакта из гранул ЦТЛ поступают перфорин и гранзимы (фрагментины), которые после активации в присутствии ионов Ca^{2+} перфорируют мембрану мишени и внутри клетки фрагментируют ДНК. В отличие от NK-зависимого, в клеточном цитолизе могут участвовать и другие цитотоксические вещества, например лимфотоксин и фактор некроза опухолей, а также выделяемый Т-хелперами и Тх1-клетками интерферон γ, усиливающий экспрессию молекул гистосовместимости на поверхности

клеток-мишеней, что способствует распознаванию чужеродного пептида.

Таким образом, в отличие от дифференциации лимфоцитов при созревании, в процессе которой формируются антигенраспознающие клетки, их дифференциация в иммунном ответе направлена на образование эффекторных клеток. Так, в гуморальном ответе происходит формирование крупных плазматических клеток с обильной цитоплазмой, и они переходят от синтеза мембранных иммуноглобулинов, имеющихся у В-лимфоцитов, к секреции растворимых Ig, а при клеточном цитотоксическом ответе – цитотоксических лимфоцитов, синтезирующих вещества, разрушающие клетки-мишени, и цитокины, регулирующие активацию, рост и дифференциацию лимфоцитов и эффекторных клеток воспаления. При этом в гуморальном ответе в качестве антигенпрезентирующих клеток обычно выступают В-лимфоциты, а Т-хелперами служат Тх2-клетки, а в цитотоксическом – дендритные клетки и Тх0- или Тх1-клетки.

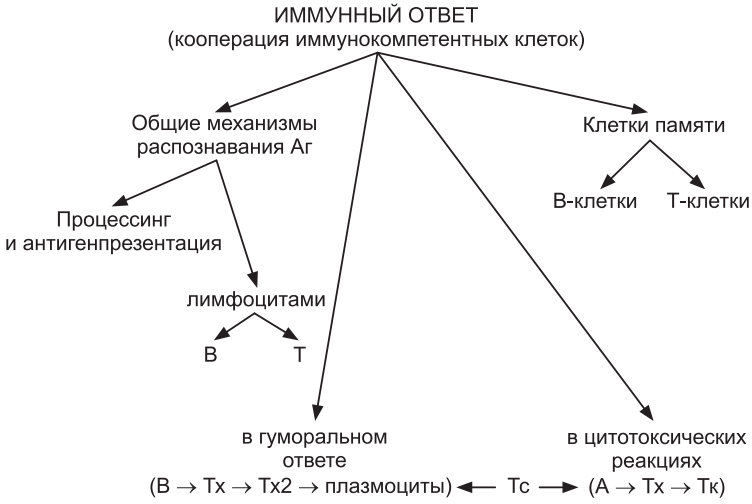
Регуляторами иммунного ответа по-прежнему, можно считать, являются Т-супрессоры, которые в процессе образования иммуноглобулинов и в реакциях цитолиза блокируют выработку аутоантител и обеспечивают толерантность к собственным тканям и органам.

Клетки памяти. Параллельно с образованием плазмоцитов и ЦТЛ формируются клетки памяти.

В-клетки памяти представляют собой особую линию дифференциации. Они образуются в зародышевых центрах вторичных фолликулов лимфатических узлов. Решающим моментом индукции В-клеток памяти является CD40–опосредованное взаимодействие предшественников В-клеток с Т-хелперами. Их фенотип, если не считать экспрессии молекул CD45RO, практически не отличается от фенотипа обычных В-клеток. Рецепторы этих клеток обладают более высоким сродством к антигену, и они легко активируются, контактируя с Т-клеткой при представлении ей антигенного пептида и действии Т-клеточных цитокинов, что имеет значение для быстрого выхода В-клеток памяти в пролиферацию. Формирование В-клеток, ответственных за иммунологическую память, обеспечивающих быструю элиминацию антигенов и абсолютную ус-

тойчивость к реинфекции, отличается интересными закономерностями. В течение 10–20 дней после первичной иммунизации их количество неуклонно возрастает. Затем оно держится на постоянном уровне в течение нескольких месяцев, а иногда и лет. У клеток иммунологической памяти все направления синтеза иммуноглобулинов, за исключением одного, репрессированы, и для них антиген служит директивным включателем уже детерминированной пролиферации и дифференциации, которая заканчивается образованием плазмоцитов за 2–3 дня.

Менее изучены Т-клетки памяти. Так как они имеют все основные маркеры Т-лимфоцитов, включая рецепторный комплекс CD3-TCR, вспомогательные и адгезивные молекулы, то считается, что Т-клетки памяти относятся к их долгоживущим вариантам. Наиболее специфическим признаком Т-клеток памяти является экспрессия на их поверхности тех же молекул CD45RO и отсутствие CD45RA. В популяции Т-клеток памяти имеются как $CD4^+$-клетки, так и $CD8^+$-лимфоциты, но преобладают первые. Все они формируются в паракортикальной зоне лимфоузлов и параартериальных муфтах селезенки.



Граф 46

Цитокины

Общие свойства. Цитокинами (*cytos* – клетка, *kineo* – возбуждаю) называют вещества, активирующие и координирующие взаимодействие клеток. По структуре они являются гликопротеинами с молекулярной массой от 8 кД до 80 кД, а по эффекту действия – медиаторами. Вырабатываются при иммунном ответе, развитии воспаления и кроветворении, регулируя и стимулируя их. Обладают потенцирующим и аддитивным действием. Однако могут оказывать и противоположный эффект. Быстро синтезируясь (в течение 1–4–24 ч), они в короткие сроки расходуются или выводятся из кровотока через почки. При угасании иммунной реакции синтез цитокинов прекращается. Сродство к цитокинам определяется наличием на мембранах клеток специфических рецепторов, но многие из них отличаются плейотропизмом.

Продуценты цитокинов. Цитокины вырабатывают Т-лимфоциты, В-лимфоциты, NK-клетки, моноциты-макрофаги, дендритные и другие клетки соединительной ткани.

Классификация цитокинов. Цитокины лимфоцитов называют *лимфокинами*, моноцитов – *монокинами*, клеток стромы – *гемопоэтинами* (*haima* – кровь, *poiesis* – выработка). При этом лимфокины регулируют активацию, рост и дифференциацию лимфоцитов, монокины стимулируют неспецифические эффекторные клетки воспаления, а гемопоэтины – процессы кроветворения.

Независимо от того, какими клетками вырабатываются цитокины, они подразделяются на четыре группы: интерлейкины (*inter* – взаимно, *leukos* – белый), координирующие взаимодействие между лейкоцитами; интерфероны (ИФН), обладающие противовирусной активностью; факторы некроза опухолей (ФНО), разрушающие мутантные клетки (см. «Противоопухолевый иммунитет»); колониестимулирующие факторы (КСФ), вызывающие экстрамедуллярные (внемозговые) очаги кроветворения. Отдельно выделяют трансформирующий фактор роста β (ТФРβ).

В норме без антигенной стимуляции иммунной системы в кровотоке обнаруживаются небольшие количества цитокинов, в основном цитокины стромальных клеток и моноцитов, стимулами для секреции которых могут, по-видимому, служить контакты с окружающими клетками, мета-

болиты и многие другие факторы. В отсутствие стимуляции лимфокины не выделяются, и покоящиеся лимфоциты обычно на них не реагируют. Активированные клетки начинают продуцировать цитокины в ближайшие часы. Так, монокины и гемопоэтины обнаруживаются спустя 1ч, интерлейкины – через 2 (ИЛ-2), 4 (ИЛ-4), 6 ч (ИЛ-10). Пик выработки моно- и гемопоэтинов приходится на 3–14-й ч, а большинства интерлейкинов – на 2–3 сут.

Биологическая характеристика цитокинов. В настоящее время описано около 20 интерлейкинов, два ФНО (α и β), три ИНФ (α, β и γ), три КСФ.

Таблица 5. **Основные клетки-продуценты и их цитокины**

Клетки-продуценты	Группы цитокинов				
	ИЛ	ИФН	ФНО	КСФ	ТФР
Тх0	2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 14	γ	α, β	ГМ-	
Тх1	2, 3	γ	α, β	ГМ-	
Тх2	3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 14		α	ГМ-	
ЦТЛ	2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 16	γ	α, β	ГМ-	
NK-клетки	1, 8, 12	γ	β	ГМ-	
В-клетки	1, 4, 10, 12	α	α		
Моноциты-макрофаги	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15	α, β	α	ГМ-, Г-	β
Дендритные клетки	1, 6, 12				

Как видно из табл. 5, наибольший спектр цитокинов синтезируют Тх0, но продуцируют они их в очень малом количестве. Более высокий уровень цитокинов секретируют воспалительные Тх1- и иммунные Тх2-лимфоциты. Цитотоксические лимфоциты образуют тоже большое количество цитокинов, но интенсивность их секреции намного ниже, чем у всех трех типов хелперов, моноцитов-макрофагов и клеток стромы.

Спектр действия интерлейкинов

Интерлейкины участвуют в различных типах межклеточных коммуникаций (связях). По спектру действия на

клетки-мишени их можно подразделить на три группы: полифункциональные интерлейкины; участвующие в иммунном ответе; интерлейкины-хемоаттрактанты.

Полифунциональные интерлейкины. К группе полифункциональных интерлейкинов относятся шесть интерлейкинов – ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-9 и ИЛ-11. Все они имеют широкий спектр клеток-мишеней. Так, ИЛ-1 вызывает пролиферацию активированных В-клеток и их дифференциацию в плазмоциты; индуцирует воспалительную реакцию; повышает подвижность нейтрофилов; стимулирует фагоцитоз; способствует усилению синтеза белков острой фазы воспаления; усиливает продукцию других цитокинов; стимулирует ранние этапы эритропоэза; наконец, участвует в обмене сигналами между иммунной и нервно-эндокринной системами.

Столь же разнообразны клетки-мишени ИЛ-6 и ИЛ-11, которые по межсистемным взаимодействиям настолько сходны с ИЛ-1, что их трудно, а подчас и невозможно отличить. Клетками-мишенями трех остальных полифункциональных интерлейкинов являются в основном предшественники клеток крови (ИЛ-3 и ИЛ-9), ранние проВ- и преВ-клетки (ИЛ-7), тучные клетки (ИЛ-9).

Интерлейкины иммунного ответа. Среди интерлейкинов этой группы выделяют интерлейкины гуморального и клеточного ответов.

В *гуморальном иммунном ответе* участвуют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-14. Основными из них являются ИЛ-4 и гомологичный ему ИЛ-13. Их мишенями являются В-лимфоциты. Действуя на них раньше других цитокинов, они могут стимулировать их размножение (при активации IgE имеют прямое отношение к развитию анафилаксии); являются основным фактором дифференциации Тх0-клеток в Тх2; повышают экспрессию молекул МНС класса II и антигенпрезентирующую активность вспомогательных клеток. ИЛ-5 и ИЛ-14, являясь ростовыми и дифференцировочными факторами В-лимфоцитов, вместе с тем стимулируют эозинофилы, потенцируя их гельминтоцидное действие (ИЛ-5), и индуцируют образование клеток памяти (ИЛ-14).

В *клеточном цитотоксическом ответе* принимают участие ИЛ-2 и близкие ему по структуре и функциям ИЛ-12 и ИЛ-15, которые необходимы как индукторы роста,

пролиферации и дифференциации цитотоксических лимфоцитов (высокие их концентрации усиливают цитолитический эффект NK-клеток), индуцируют образование на многих клетках специфических к ним рецепторов; воздействуя на моноциты, усиливают генерацию активных форм кислорода и пероксидов. ИЛ-12 примечателен тем, что является индуктором дифференциации Т-хелперов в направлении Тх1 и стимулятором выработки интерферона γ (см. «Иммунный ответ»).

Отдельного описания заслуживает ИЛ-10 как цитокин, участвующий в клеточно-гуморальном иммунном ответе. Так, совместно действуя с ИЛ-2 и ИЛ-7, он усиливает пролиферацию тимоцитов, а в сочетании с ИЛ-4 – ускоряет размножение В-клеток.

Интерлейкины-хемоаттрактанты. Истинными хемоаттрактантами среди цитокинов являются низкомолекулярный ИЛ-8 (7,5 кД) и высокомолекулярный ИЛ-16 (80 кД). Первый из них повышает хемотаксис нейтрофилов, а второй – адгезивность Т-хелперов.

Факторы некроза опухолей

Имеется два фактора некроза опухолей: ФНОα и ФНОβ (в прежней номенклатуре – лимфотоксины). ФНОα продуцируется в основном моноцитами-макрофагами, а ФНОβ – Т-лимфоцитами, стимулированными различными антигенами и митогенами. Тот и другой факторы представляют собой гликопротеиды с молекулярной массой 17,4 кД (ФНОα) – 20–25 кД (ФНОβ). Действуют они на один и тот же рецептор, вызывая одинаковые эффекты. В частности, разрушают опухолевые и инфицированные вирусами и паразитами клетки с развитием в тканях геморрагического некроза и общей кахексии организма, вследствие чего еще недавно ФНО именовали кахексинами. Правда, степень их активности неодинакова. Более выражена она у ФНОα, что, может быть, связано со скоростью его образования. Так, в максимальном количестве он накапливается уже через 2–3 ч, а ФНОβ – только на 2–3-и сут. По спектру клеток-мишеней и биологическим эффектам ФНО близки ИЛ-1 и ИЛ-6. Кроме трансформированных клеток, на них реагируют почти все клетки, участвующие в воспалитель-

ной реакции. В частности, ФНО усиливают экспрессию молекул адгезии на эндотелии, оказывают хемотаксическое действие на фагоциты, обусловливают синтез белков острой фазы воспаления. В развитии иммунного ответа они участвуют в качестве кофакторов ростовых цитокинов, индуцирующих пролиферацию В- и Т-лимфоцитов, усиливают антителообразование, подавляют гиперчувствительность замедленного типа, препятствуют формированию иммунологической толерантности. Большой интерес вызвали данные о том, что ФНО участвуют в морфогенезе лимфоузлов и пейеровых бляшек, а также формировании зародышевых центров при иммунном ответе.

Интерфероны

Согласно принятой номенклатуре выделяют три вида интерферонов – α (макрофагальный), β (фибробластный), γ (лимфоцитарный, иммунный), но по биологическим эффектам их можно подразделять на два типа – ИФН I типа, включающий α- и β-интерфероны, действующие через один и тот же рецептор и обладающие одним и тем же механизмом антивирусного действия (см. «Конституциональные факторы естественной резистентности» и «Противовирусный иммунитет»), и ИФН II типа, к которому относят γ-интерферон.

ИФН II типа. Источником γ-интерферона являются как цитотоксические, так и хелперные лимфоциты, но после дифференциации Тх0 на Тх1 и Тх2 способность вырабатывать его сохраняют только Тх1-клетки.

γ-интерферон по структуре представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 20–25 кД. После действия антигенов или митогенов пик экспрессии его гена приходится на 48–72 ч. Образование γ-интерферона индуцируется вирусами, но гораздо слабее, чем ИФН I типа. Его продукция в ходе дальнейшего синтеза усиливается и потенцируется ИЛ-2.

По эффектам противовирусного и антиопухолевого действия γ-интерферон уступает α- и β-интерферонам, но намного превосходит их в иммунорегуляции. Он служит стимулятором макрофагов, способствуя обработке и презентации ими антигенов на молекулах МНС класса II, выработке ИЛ-1 и, главное, ИЛ-12, который усиливает его

синтез и вызывает дифференциацию Т-хелперов в направлении Тх1-клеток, что, в конечном итоге, приводит не просто к снижению секреторной функции Тх2-клеток, а к подавлению гуморального иммунного ответа и развитию клеточного. Являясь продуктом цитотоксических Т- и NK-клеток, γ-интерферон, по-видимому, участвует в реализации вызываемого ими цитолиза.

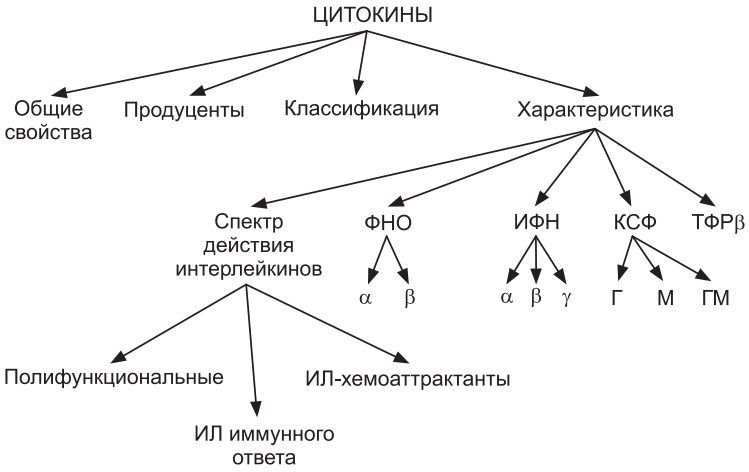
Колониестимулирующие факторы

В группу КСФ входят *гранулоцитарно-макрофагоцитарный* (ГМ-), *моноцитарно-макрофагальный* (М-) и *гранулоцитарный* (Г-) гемопоэтины. Все эти цитокины представляют собой гликопротеины с молекулярной массой 21–25 кД (ГМ-КСФ), 70–76 кД (М-КСФ), 19–25 кД (Г-КСФ). Образуются клетками стромы, костного мозга и других органов, макрофагами и активированными Т-лимфоцитами.

Действие КСФ осуществляется в тесной связи друг с другом и с ИЛ-3, 7, 11. Точнее говоря, КСФ поддерживают пролиферацию и начальные этапы дифференциации юных гранулоцитарно-макрофагальных предшественников. В меньшей мере влияют на формирование специализированных моноцитарно-макрофагальных колоний, а также активность зрелых моноцитов, макрофагов и гранулоцитов.

Трансформирующий фактор роста β

ТФРβ представляет собой гомодимер (молекулярная масса одной цепи 25 кД). Обладает очень широким спектром действия. В отличие от других факторов роста (в том числе ТФРα) проявляет активность в отношении клеток иммунной системы. Продуцируют ТФРβ огромное количество стромальных клеток и макрофагов, а также клетки многих злокачественных опухолей. Столь же многочисленны его клетки-мишени. ТФРβ подавляет синтез многих цитокинов, блокирует ответ лимфоцитов на ИЛ-2, 4 и 7, угнетает формирование NK-клеток и ЦТЛ. Вызывает переключение выработки IgG на IgA. При прекращении выработки ТФРβ развивается генерализованный аутоиммунный процесс.



Граф 47

Теории антителообразования и взаимодействия антител с антигенами

Теория «боковых цепей». Механизм образования антител и их взаимодействие с антигенами впервые обосновал в теории «боковых цепей» П. Эрлих (1898). Представив клетку в виде атомных групп и радикалов, он как химик полагал, что центрально расположенные группировки могут определять ее видовую специфичность, а поверхностные («боковые цепи») – выполнять функцию рецепторов антигенов. Соединяясь с ними, клетка, по мнению П. Эрлиха, затем вырабатывает их так много, что они, не удерживаясь на мембране, отщепляются и поступают в кровь, где функционируют как антитела, способные связывать микробы и токсины. При этом П. Эрлих представлял, что клетка якобы может иметь антитела трех порядков: *антитела первого порядка*, обусловливающие нейтрализацию токсина, имеют одну группу связывания, которая соединяется с гаптеном антигена; *антитела второго порядка*, вызывающие реакции агглютинации и преципитации, обладают группой связывания и эффекторной группой склеивания или осаждения антигенов; *антитела третьего порядка*,

связывающие комплемент, содержат две группы связывания: одна вступает в реакцию с антигеном, а другая – с комплементом.

Современные теории антителообразования подразделяют на три группы: 1) *инструктивные* – теории прямой и непрямой матрицы; 2) *селекционные* – теории непрямого отбора и селекции клонов антителообразующих клеток; 3) *дерепрессии генов*.

Теория прямой матрицы. Выдвигая эту теорию в 1930 г., Ф. Брейнль и Ф. Гауровитц предполагали, что синтез антител в клетках происходит на детерминантах антигена, которые, являясь матрицей, определяют структуру и конфигурацию антигенсвязывающих центров (рис. 66, *а*). Выработанные таким образом под воздействием антигенов иммуноглобулины с центрами связывания в виде слепков детерминант антигена приобретают высокую степень специфичности и способность реагирования лишь с комплементарными гаптенами.

Теория непрямой матрицы. Создатели этой теории Ф. Бернет и Ф. Финнер в целом разделяя идею матричного характера формирования специфичности иммуноглобулинов, в 1949 г. высказали гипотезу опосредованного воздействия антигенов на генотип антителообразующих клеток (рис. 66, *б*). При этом непрямая информация образования комплементарных антигену иммуноглобулинов передается потомкам клеток.

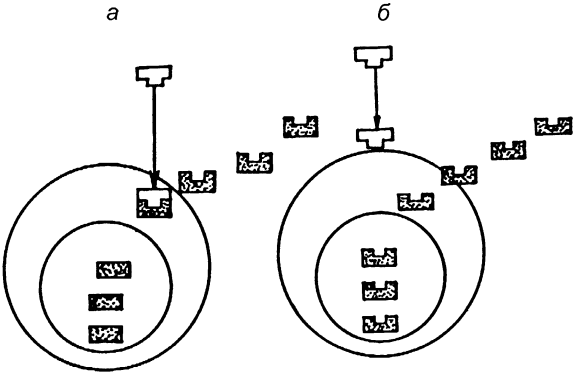


Рис. 66. Инструктивные теории антителообразования:
а – прямой матрицы; *б* – непрямой матрицы

Большой научной ценности теория «боковых цепей» и матричные теории антителообразования в настоящее время не имеют, но на их основе формировались селекционные теории и теория дерепрессии генов.

Теория непрямого отбора. Выдвинутая в 1955 г. Н. Йерне теория непрямого отбора допускала наличие в организме многочисленных антителопродуцирующих клеток, а в крови – спонтанно выработанного огромного набора антител ко всевозможным антигенам. Антителообразование к каждому из них объяснялось тем, что комплекс антитело – антиген побуждал выработку только таких иммуноглобулинов, которые в нем содержались. Таким образом, антиген в антителообразовании выполнял роль селектора, а не сигнального индуктора.

Теория селекции клонов антителообразующих клеток. Разработанная Ф. Бернетом в 1959 г. теория селекции клонов антителообразующих клеток постулирует: в процессе длительной эволюции в организме сформировалась гетерогенная популяция антителообразующих клеток, способных продуцировать антитела определенной специфичности; антителообразование детерминировано генотипом и не зависит от антигена; антиген лишь стимулирует (селекционирует) клоны тех антителообразующих клеток, которые имеют к нему специфические рецепторы; в ответ на антигенный стимул происходит пролиферация антителообразующих клеток, а параллельно – и дифференциация предадаптированных клеток в плазмоциты, продуцирующие преддетерминированные по структуре и, главное, – специфичности – иммуноглобулины (рис. 67). Теория Ф. Бернета допускает, что в момент перехода исходных клеток в дифференциацию они могут вырабатывать несколько видов иммуноглобулинов. В дальнейшем в присутствии антигена-индуктора одно направление синтеза иммуноглобулина закрепляется, а остальные репрессируются. Те клетки, в которых синтез иммуноглобулина не закрепляется, погибают. Кроме того, в результате взаимодействия антигена образуются не до конца дифференцированные клетки иммунологической памяти. Возможно, в клетках памяти все направления синтеза иммуноглобулинов, за исключением одного, репрессированы. Повторное внедрение антигена для этих клеток служит не сигналом для осуществления выбора синтеза определенного

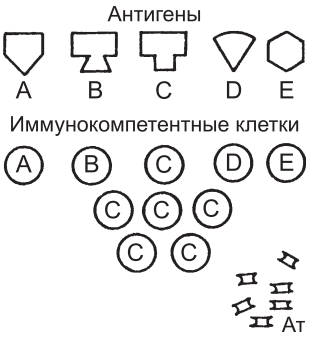


Рис. 67. Теория селекции клонов антителообразующих клеток

иммуноглобулина, как для исходных клеток, а директивным включателем уже детерминированной дифференциации и пролиферации.

Данная теория охватывает многие стороны иммунитета. Объясняя процесс антителообразования селекцией антигеном соответствующих клонов клеток-предшественников или отбором только некоторого количества из них, она допускает мутационное формирование иммунокомпетентных клеток в онтогенезе. С позиций этой теории стало возможным объяснить состояние толерантности организма к собственным антигенам, под воздействием которых в эмбриональном периоде происходит гибель клеток со специфическими для них рецепторами.

Теория Ф. Бернета стала ключевой и определяющей в развитии современной иммунологии, в частности иммуногенетики.

Теория дерепрессии генов. Теория допускает, что иммунокомпетентная клетка может вырабатывать антитела самой различной специфичности. По минимальным расчетам, ее код содержит информацию, достаточную для формирования 175 000 антигенсвязывающих центров антител. Однако способность генов детерминировать продукцию такого количества антител репрессирована. Предполагается, что антиген соединяется с ферментом, который обусловливает синтез репрессора и, снимая его действие, индуцирует антителообразование.

Теория взаимодействия антител с антигенами. По вопросу механизма реагирования антигенов с антителами

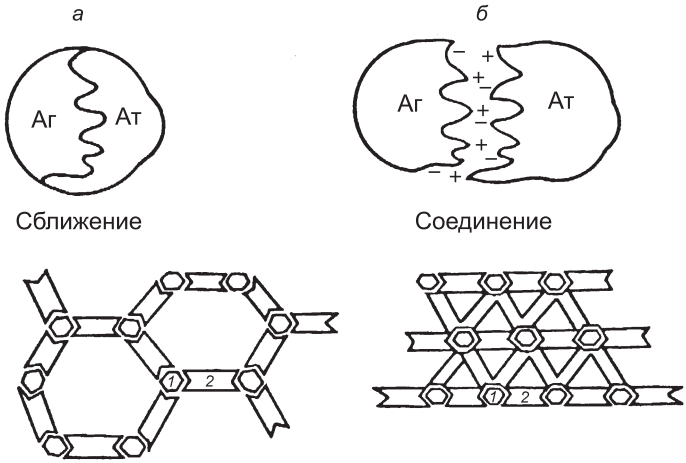


Рис. 68. Взаимодействие антител (Ат) с антигенами (Аг): *а* – «решетка», *б* – «каркас»; *1* – Аг; *2* – Ат

имеется несколько гипотез. П. Эрлих предполагал, что иммунологические реакции протекают по типу химических и, в частности, представлял, что взаимодействие токсина с антитоксином протекает, как реакция между сильной кислотой и сильной щелочью. Вскоре, однако, выяснилось, что в основе реакции иммунитета лежит адсорбционный процесс, специфичность которого определяется строением детерминантных групп антигенов и соответствующих им по заряду, структуре и конфигурации антигенсвязывающих центров антител.

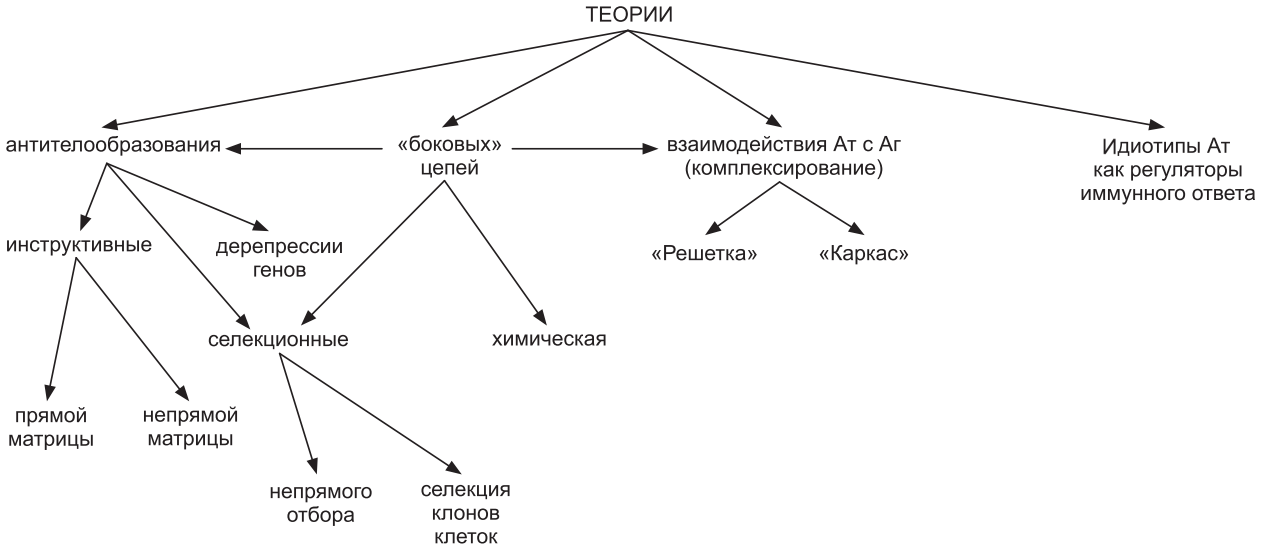
Относительно характера соединения антитела с антигеном существуют две гипотезы. По мнению П. Маррека, реакция взаимодействия антигена с антителом обусловлена разноименностью их электрических зарядов (рис. 68). Прочность соединения зависит от количества и полноты совпадения реагирующих групп антигена и антитела. При оптимальном соотношении антител и антигенов их молекулы в специфических комплексах располагаются в чередующемся порядке и образуют своеобразные «*решетки*». Л. Полинг рассматривает взаимодействие антитела с антигеном как процесс реагирования двухвалентных и по-

ливалентных структур. Он считает, что при полном насыщении всех валентностей образуются комплексы антигена и антитела в виде «*каркаса*».

Представленные формы реагирования находят подтверждение при прямых электронно-микроскопических исследованиях различных иммунных реакций, в которых участвуют разнообразные антигены и антитела.

Идиотипы антител как регуляторы иммунного ответа. Вырабатываясь под воздействием антигенов, антитела, связываясь и разрушая их, постепенно ингибируют и прекращают иммунный ответ. Вместе с тем, обладая свойствами антигенов, они, по гипотезе Н. Йерне, могут осуществлять регуляцию иммунитета в сложных сетевых взаимодействиях идиотип–антиидиотип между лимфоцитами различных Т- и В-субпопуляций. Для понимания этого механизма напомним, что каждый специфический антигенсвязывающий фрагмент антитела имеет свой характерный набор идиотипов. В общей массе в организме животных их многие миллионы. Так как огромное разнообразие идиотипов антител, по мнению Н. Йерне, обусловлено многообразием природных антигенных детерминант, то распознающие их лимфоциты должны распознавать также идиотипические детерминанты всех антител, в том числе цитофильных, т. е. самих лимфоцитарных рецепторов. И действительно, так оно и есть. Толерантности к идиотипам у иммунной системы не возникло вследствие ничтожно малых (следовых) их количеств.

Иммунизированное каким-либо внешним антигеном животное сначала будет вырабатывать против него специфические антитела, затем – антитела к идиотипам антител, а далее – антитела к антиидиотипическим антителам и т. д. Такой цепной тип реакций, дающих «сеть» аутоантител, возникает, когда большая часть выработанных на антигенный стимул иммуноглобулинов имеет одинаковый идиотип. При этом наряду с процессом выработки аутоантител к доминантному идиотипу активируются соответствующие клоны Т-клеток. Те и другие способны ингибировать или усиливать ответ лимфоцитов, имеющих рецепторы к данному идиотипу. Через взаимодействия идиотип-антиидиотип лимфоциты функционально связаны между собой в замкнутую идиотипическую сеть.


ТЕОРИИ
антителообразования
«боковых» цепей
взаимодействия Ат с Аг (комплексирование)
Идиотипы Ат как регуляторы иммунного ответа
инструктивные
дерепрессии генов
«Решетка»
«Каркас»
селекционные
химическая
прямой матрицы
непрямой матрицы
непрямого отбора
селекция клонов клеток

Граф 48

Противовирусный иммунитет

Основу противовирусного иммунитета составляют неспецифические факторы естественной невосприимчивости, эффективность которых в процессе инфицирования организма возрастает и дополняется выработкой α-, β- и γ-интерферонов, вируснейтрализующих антител, а главное, активацией Т-киллеров. В связи с этим различают два типа невосприимчивости против вирусов: 1) естественную (видовую, наследственную), связанную с врожденной и возрастной устойчивостью организма к определенным вирусным инфекциям; 2) приобретенную, создающуюся во время инфицирования, после перенесенной болезни или искусственной иммунизации.

Факторы естественного иммунитета

Анатомо-физиологические барьеры. Естественная резистентность организма к вирусам обусловлена теми же анатомо-физиологическими барьерами, которые обеспечивают антибактериальную невосприимчивость. В частности, кожа и слизистые оболочки здорового человека – непреодолимые препятствия для большинства вирусов. К тому же кожно-слизистые секреты содержат термолабильные вирусные ингибиторы. Не менее активны в отношении вирусов химические барьеры. Соляная кислота желудка, например, денатурирует их в считанные минуты. Столь же быстро действует на вирусы дуоденальная желчь, растворяя, как любой другой детергент, липиды внешних оболочек, в результате чего вирусы распадаются на отдельные капсомеры с освобождением рибонуклеопротеидов и поверхностных антигенов типа гемагглютининов и нейраминидаз. Мощными естественными барьерами являются лимфатические узлы, где возникает первичный очаг воспаления, препятствующий распространению вирусов в кровоток, близлежащие ткани и внутренние органы. Существенную роль в этом играют фагоциты.

Естественная резистентность клеток. Абсолютная устойчивость клеток к вирусам связана с отсутствием у них соответствующих рецепторов и ферментов депротеинизации. Врожденный противовирусный иммунитет у животных является наследственно обусловленным признаком, и его нельзя ослабить даже рентгеновским облучением или иммунодепрессантами. Видовую резистентность к ви-

русам удалось изменить лишь путем искусственного выведения линий животных, скрещивая высокоустойчивые и чувствительные к ним виды.

Термолабильные β-ингибиторы. Важными факторами антивирусного иммунитета являются сывороточные термолабильные вируснейтрализующие β-ингибиторы. По химическому составу они являются липопротеидами. Реагируя с вирусами, β-ингибиторы вначале образуют с ними нейтральный комплекс, из которого легко реактивируется вирус. Необратимая его инактивация наступает только после двухчасового контакта и во многом зависит от присутствия сывороточного кофактора, усиливающего повреждающее действие β-ингибиторов на вирусы. Кофактор является особым микроглобулином, который, как и комплемент, разрушается после прогревания сыворотки при температуре 56–60 °С. Активность β-ингибиторов к разным видам вирусов неодинакова. Более чувствительны к ним авирулентные штаммы. Усиление вирулентности вируса сопровождается снижением или даже полной потерей чувствительности к β-ингибиторам. Содержание β-ингибиторов и кофактора в сыворотке не постоянно. Их уровень может определяться возрастом животных, сезонностью, полноценностью пищи, витаминами и другими факторами, определяющими общую резистентность организма.

Температурный фактор. Уровень температуры тела определяет видовую антивирусную резистентность организмов, а в процессе инфекции – регулирует цикл размножения вирусов. В частности, температура 39–40 °С полностью подавляет цикл размножения большинства вирусов теплокровных ввиду того, что их репродуктивный оптимум лежит на 2–3 °С ниже этих значений. Защитная роль лихорадки при этом усиливается сдвигом pH в тканях и окислительно-восстановительного потенциала, угнетающих развитие вирусов. К тому же понижение pH и повышение rH_2 стимулирует выработку интерферонов.

Приобретенные факторы антивирусного иммунитета

Приобретенный антивирусный иммунитет обусловливается интерферонами, иммуноглобулинами, цитотоксическими лимфоцитами и макрофагами.

Интерфероны I типа. Как антивирусные факторы ИФН I типа были открыты в 1957 г. А. Айзексом и Дж. Линденманом. В организме секретируются всеми клетками, и в месте входных ворот вирусов концентрация интерферонов в считанные часы многократно возрастает. При этом интерферонообразование определяется некоторыми системами активации комплемента, в частности продукцию ИФН I типа усиливает пирогенное действие ИЛ-1.

Вырабатываются интерфероны через 5–7 ч от начала развития вирусов. Продолжительность их образования зависит от времени репродукции вируса в клетках, в частности после введения живой гриппозной вакцины составляет 5–7 сут, а после пероральной вакцинации против полиомиелита – 21–28 сут. Индуцирует интерферонообразование вирионная НК, особенно – двунитчатая РНК. Искусственными стимуляторами интерферонообразования могут быть также бактериальные экзотоксины, экстракты бактерий и грибов, фитогемагглютинины, синтетические полианионы, полисахариды и полинуклеотиды. В отличие от антител, ИФН I типа обладают широким спектром антивирусного действия. Они подавляют размножение не только инфекционных, но и онкогенных интеграционных вирусов. Однако полиэтиологическая антивирусная активность интерферонов ограничена тем видом животного, клетки которого его выработали. Даже в организме родственных видов противовирусная эффективность ИФН I типа почти полностью утрачивается. Исключение составляет ИФН I типа человека, активный также в организме кролика. Механизм антивирусного действия ИФН I типа многообразен.

Интерферон II типа. Продуцируется γ-интерферон хелперами и почти всеми супрессорами. Представляет собой цитокин, активирующий неспецифические эффекторные клетки воспаления.

Антивирусные иммуноглобулины. Антивирусные антитела вырабатываются на 5–7-е сут. Как правило, титр их в крови вначале невысок, но затем закономерно, с интервалами 7–14–21 сут, четырехкратно возрастает. Они высокоспецифичны к гемагглютининам, нейраминидазам и другим поверхностным структурам V-антигена. Адсорбируясь на вирионе, вируснейтрализующие антитела препятствуют адсорбции и проникновению вирусных частиц в клетку.

Быстрота образования и прочность связей нейтральных комплексов резко возрастают при наличии в них кофактора сыворотки крови. По физико-химической структуре и биологическим свойствам вируснейтрализующие антитела относятся к IgG, IgM и IgAS. При этом сывороточные IgG, IgM подавляют вирусы, вызывающие генерализованные инфекции (корь, вирусные гепатиты, тогавирусные инфекции), а секреторные IgAS создают местный иммунитет к респираторным (грипп, парагрипп) и кишечным инфекциям (полиомиелит, ЭКХО- и Коксаки-инфекции).

При общей оценке антивирусной эффективности иммуноглобулинов исходят из того, что медленное нарастание титра вируснейтрализующих антител в сыворотке обычно сочетается с тяжелым течением вирусной инфекции, переходом ее в хроническую форму и плохим прогнозом болезни. Наоборот, высокий уровень вируснейтрализующих антител в крови приводит к быстрому выздоровлению и освобождению организма от вирусов.

Однако при некоторых вирусных инфекциях избыток сывороточных антител не всегда улучшает состояние больных. Нередко в иммунных комплексах вирусы не только не обезвреживаются, но даже находят благоприятные условия для длительного персистирования, так как антитела могут прикрывать их от деградирующего действия клеточных ферментов.

Более того, в комплексах они легко и быстро адсорбируются на клетках, имеющих рецепторы к Fc-фрагментам антител, а некоторые вирусы даже лучше размножаются в них. Парадоксальное усиление репродукции вирусов свойственно, правда, лишь тога-, бунья-, лисса- и реовирусам и чаще всего отмечается при обработке их иммунными сыворотками, содержащими относительно низкие титры антител.

Кроме того, избыточное содержание свободноплавающих иммунных комплексов в кровотоке всегда ведет к их осаждению на клетках, что сопровождается функциональными и структурными нарушениями в органах и тканях, а нередко – развитием аутоиммунных болезней. К выработке аутоантител может также приводить конформационная перестройка структуры антител в иммунных комплексах.

Неэффективны вируснейтрализующие антитела при вирусных инфекциях, возбудители которых, внедрившись в организм, диссеминируют по межклеточным отросткам и контактирующим мембранам, не попадая в лимфу

и кровь. Полностью защищены от антител интеграционные вирусы в состоянии провируса. В этих случаях, а они достаточно часто встречаются, развивается преимущественно Т-зависимый клеточный ответ, и действенными оказываются клеточные эффекторные механизмы, приводящие к гибели инфицированных клеток и деструкции всего их содержимого вместе с вирусами. Выбор этого направления иммунного ответа может определяться антигенпрезентирующими дендритными клетками и макрофагами, которые секретируют ИЛ-12.

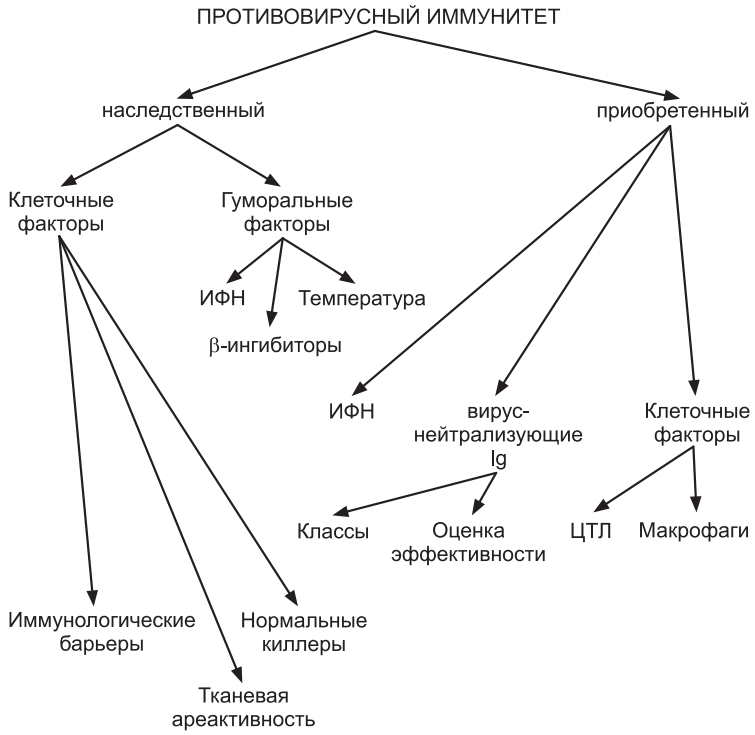
Клеточные факторы. Среди клеточных факторов приобретенного антивирусного иммунитета основную роль играют Т-киллеры, а точнее – цитотоксические лимфоциты. По структуре и функции ЦТЛ очень сходны с нормальными киллерами, но в отличие от NK-клеток приобретают, напомним, способность к цитолизу пораженных вирусами клеток только после активации (см. «Кооперация иммунокомпетентных клеток в цитотоксических реакциях»).

Связавшись с клетками-мишенями, активированные ЦТЛ, как и NK-клетки, выделяют перфорины и гранзимы, разрушая их мембраны и фрагментируя ДНК. При Т-клеточном цитолизе пораженных клеток в реакцию могут включаться также ФНО α и β, активирующие нейтрофилы, макрофаги, а, главное, нормальные киллеры.

Деструктивные процессы, вызванные ЦТЛ и NK-клетками, в конечном итоге, приводят к тому, что, оказавшись вне клеток и попав в межклеточную жидкость и кровоток, вирусы быстро обезвреживаются антителами и β-ингибиторами. Защитный эффект цитолиза инфицированных вирусами клеток особенно ярко проявляется на ранних стадиях заболевания. Массивный цитолиз вируссодержащих клеток при далеко зашедшей генерализованной инфекции может приводить к серьезным повреждениям органов и тканей, образованию веществ, индуцирующих продукцию аутоантител и активирующих агрессивные клоны Т-киллеров, способных вызывать аутоиммунные патологические процессы. Возникают они, однако, редко и чаще всего являются следствием подавления активности супрессоров.

Макрофаги. Роль макрофагов в противовирусном иммунитете оценивается неоднозначно. Считается, что вирусы из-за очень малых размеров плохо фагоцитируются, проявляют большую устойчивость к лизосомальным ферментам, а некоторые из них, например вирусы медленных

инфекций, кори и герпеса, даже размножаются в фагоцитах. В качестве самого серьезного довода против признания защитной роли фагоцитов в противовирусном иммунитете приводятся некоторые данные о том, что, мигрируя, макрофаги диссеминируют репродуцирующиеся в них вирусы на чувствительные клетки. Приняв это во внимание, нельзя забывать, что макрофаги как антигенпрезентирующие клетки участвуют в выработке противовирусных антител, являются продуцентами интерферонов, активно поглощают зараженные вирусами клетки, медленно, но инактивируют многие вирусы. Наконец, способность макрофагов удерживать и переваривать вирусы постепенно нарастает и у взрослых животных выражена в большей степени, чем у новорожденных.



Граф 49

ИММУНОПАТОЛОГИЯ

Выделяют 4 типа иммунопатологии: извращенная реактивность, основной формой которой является аллергия; иммунопатология, обусловленная аутоагрессией; иммунодефициты и опухоли иммунной системы.

Аллергия (гиперчувствительность)

Общее понятие. Термин аллергия (*allos* – другой, *ergon* – действие) ввел австрийский педиатр Ц. Пирке для определения изменений реагирования организма ребенка при инфекционных заболеваниях. Исходя из этого, в рубрику «аллергия» первоначально включали практически все патологические состояния и болезни, в основе которых лежали анергия, гипергия и гиперергия, т. е. полное отсутствие реакции, пониженная или повышенная реактивность организма. Теперь под *аллергией* понимают неадекватный по силе иммунный ответ организма на повторное воздействие определенного вещества-агента (аллергена), связанный с повышенной к нему чувствительностью (гиперчувствительностью) и проявляющийся целым рядом локальных или системных специфических реакций.

Природа и классификация аллергенов. Аллергию вызывают многочисленные субстанции, но, в основном, низкомолекулярные вещества с молекулярной массой 5–15 кД, легко проникающие через слизистые оболочки и быстро связывающиеся с белками организма. По резервуару их образования все аллергены делят на *экзоаллергены*, попадающие извне, и *эндоаллергены*, образующиеся в самом организме. Экзоаллергены по путям поступления и происхождения, в свою очередь, подразделяют на пять групп: ингаляционные (цветочная пыльца растений и пыль с перхотью, остатками шерсти, волос, пуха и пера); пищевые (молоко, яйца, ягоды, лук, шоколад и др.); лекарственные (пенициллин, сульфаниламиды и др.); промышленные (формалин, бензол, пестициды и т. д.); инфекционные (грибы, вирусы, бактерии).

Типы аллергических реакций

По скорости проявления выделяют два основных типа аллергических реакций – гиперчувствительность немед-

ленного (ГНТ) и замедленного (ГЗТ) типов, а по иммунологическим механизмам их возникновения – четыре – анафилактический (ГНТ), цитотоксический, иммунокомплексный и ГЗТ (I, II, III и IV типы по классификации П. Джелла и Р. Кумбса).

Анафилактический тип гиперчувствительности. К анафилактическому типу реакций относят анафилактический шок, крапивницу (системные реакции), аллергические дерматит, ринит-конъюнктивит, диарею, тошноту, рвоту, бронхиальную астму (преимущественно локальные реакции). Нередко их называют иммунологическими реакциями реагинового типа, так как все они опосредованы цитофильными IgE, имеющими сродство к тучным клеткам и базофилам. Вырабатываются они в лимфоидной ткани слизистых оболочек (включая брыжеечные и бронхиальные узлы), где сосредоточена одна из основных популяций тучных клеток, имеющих к ним рецепторы, и где быстро формируются Т-хелперы типа Тх2, активирующие выработку IgE путем секреции ИЛ-4 (см. «Субпопуляции Т-лимфоцитов»). При этом не вызывает сомнения, что выработка IgE может быть связана с ослаблением супрессорного контроля. Не исключается, что в развитии анафилактического типа гиперчувствительности участвуют также сывороточные IgE, концентрация которых у лиц с атопическими болезнями (бронхиальная астма, крапивница, сенная лихорадка) возрастает на несколько порядков.

В развитии реакций анафилактического типа различают три фазы: иммунологическую, патохимическую (фаза биохимических реакций) и патофизиологическую (фаза клинических проявлений).

В *иммунологической фазе* повторно попадающий в организм аллерген вступает в специфическую реакцию с IgE, фиксированными на рецепторах тучных клеток и базофилов, вызывая образование на их мембранах иммунных комплексов, которые служат источником активирующих сигналов дегрануляции обоих типов клеток.

В *патохимической фазе*, наступающей вслед за дегрануляцией тучных клеток и базофилов, сохраняющих жизнеспособность, высвобождаются гистамин, гепарин, хемотаксические факторы для нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов, тромбоксаны, продукты метаболизма арахидоновой кислоты (лейкотриены и простагландины), вызы-

вающие спазм гладких мышц и повышающие проницаемость капилляров, что способствует всасыванию аллергенов в ткани и развитию аллергического воспаления. Ее усиливают, воздействуя на тучные клетки и нейтрофилы, малые пептиды С3а и С5а, отщепляющиеся от соответствующих фракций комплемента в процессе одновременно происходящей его активации. При этом нарушается деятельность ферментных систем и может изменяться коллоидный состав и свертываемость крови.

Патофизиологическая фаза является следствием взаимодействия освободившихся из тучных клеток и базофилов медиаторов с вторичными мишенями, каковыми могут являться эндотелий сосудов, гладкие мышцы, лейкоциты крови, тромбоциты, что, в частности, выражается в виде отека слизистых оболочек и кожных покровов, покраснения и припухлости (крапивница, ринит-конъюнктивит), удушья в результате спазма гладкой мускулатуры бронхов (астма), других местных реакций, а при резких нарушениях деятельности сердечно-сосудистой системы – внезапно возникающим анафилактическим шоком.

Характеристика анафилактического шока. Анафилактический шок – самая тяжелая форма общесистемной гиперчувствительности немедленного типа, в самом названии которой определена ее трагическая сущность. Наиболее тяжело протекает он у морских свинок. Воспроизводя анафилактический шок у этих животных, вначале сенсибилизируют их лошадиной сывороткой, вводя ее подкожно, внутрибрюшинно или внутривенно. Эффективной оказывается даже доза 0,000001 мл. Готовность морских свинок отвечать анафилактическим шоком возникает спустя 9–12 дней инкубации и совпадает с моментом появления в их крови антител. Реализуется шок при соблюдении двух условий: 1) повторная, или разрешающая доза сыворотки должна превышать сенсибилизирующую в 10–100 раз и быть не менее 0,1 мл; 2) для развития шока разрешающую дозу сыворотки необходимо вводить в кровоток (внутривенно или внутрисердечно).

Картина шока у всех особей животных одного и того же вида одинакова и не зависит от природы антигена, которым сенсибилизируют и воспроизводят анафилаксию. Так, у морской свинки анафилактический шок проявляется сразу же после введения разрешающей дозы сыворот-

ки. Вначале у животного возникает одышка, беспокойство и судороги всего тела, затем оно погибает при явлениях непроизвольной дефекации и мочеиспускания. При вскрытии грудной полости отмечаются резкая эмфизема легких как следствие спазма гладкой мускулатуры бронхов, кровоизлияния в слизистые и серозные оболочки. У других животных внешние признаки анафилактического шока такие же, как у свинок, однако патолого-анатомическая картина, в связи с неодинаковым распределением в органах и тканях гладкой мускулатуры, существенно различается. Так, у кроликов спазмируются легочные артерии и расширяется правый желудочек сердца, а у собак – печеночные вены, что приводит к застойным явлениям в печени и увеличению ее массы.

У человека анафилактический шок возникает при введении гетерологических иммунных сывороток, антибиотиков и других лекарственных препаратов. При его возникновении у людей учащается пульс, повышается температура тела, возникает одышка, отеки, боли в суставах, высыпания, судороги, резко нарушается деятельность сердечно-сосудистой системы, что может заканчиваться падением кровяного давления, потерей сознания и смертельным исходом.

Цитотоксическая гиперчувствительность. В эту группу аллергических реакций включают иммунопатологические процессы, при которых цитотоксический эффект *опосредован* специфическими иммуноглобулинами или аутоантителами класса IgG, которые могут взаимодействовать с активированным по классическому пути комплементом, NK-клетками, лизирующими нагруженные антителами клетки-мишени, или макрофагами, фагоцитирующими опсонизированные клетки. К такого рода гиперчувствительности относят реакцию на переливание несовместимой крови и реакцию резус-отрицательной женщины, беременной Rh-положительным плодом; некоторые формы лекарственной непереносимости, приводящей к гемолитической анемии; системную красную волчанку, ревматоидный артрит и другие коллагенозы; аутоиммунный тиреотоксикоз.

Иммунокомплексные реакции. Образование иммунных комплексов – естественная иммунная реакция организма. Образующиеся при этом преципитаты после свя-

зывания комплемента быстро растворяются и выводятся с мочой или же фагоцитируются и расщепляются. Однако при избытке антигена, дефиците комплемента и нарушении фагоцитоза формируются нерастворимые преципитаты. Накапливаясь, они откладываются в сосудах и на многочисленных структурах, экспрессируемых Fc-рецепторы. В местах отложения иммунных комплексов регистрируется большое количество активированных макрофагов, нейтрофилов и тучных клеток; агрегация тромбоцитов и формирование микротромбов с освобождением вазоактивных веществ; накопление анафилатоксинов С3а и С3б, кининов, гистамина, протеиназ; многих цитокинов (включая ФНО и хемокины) и других медиаторов гиперергического воспаления, заканчивающегося некрозом тканей. Классическими примерами такого типа аллергии могут служить феномен Артюса и сывороточная болезнь.

Феномен Артюса – местная (локальная) гиперергическая реакция с образованием глубоких незаживающих язв в коже и подкожной клетчатке у кроликов, которым 5–7 раз через 5–6 дней подкожно вводили лошадиную сыворотку. Феномен Артюса сравнительно легко передается пассивно путем парентерального введения сыворотки сенсибилизированного донора с последующей подкожной инъекцией реципиенту разрешающей дозы лошадиной сыворотки.

Сывороточная болезнь – системная иммунокомплексная реакция у людей. Она развивается при повторном введении чужеродной иммунной сыворотки, но если вводится в большом количестве и не разрушается в организме до 9–12 дней, когда в крови реципиента в высоком титре появляются антитела, то возникает также у несенсибилизированных лиц. В зависимости от места отложения иммунных комплексов при сывороточной болезни возникают артриты, нефриты, васкулиты, боли, отеки, зуд, реже – другие ее проявления.

Гиперчувствительность замедленного типа. ГЗТ – тип реакций, опосредованный не гуморальными, как три предшествующих типа гиперчувствительности, а клеточными факторами. Эффекторными клетками при этом типе гиперчувствительности являются не ЦТЛ, как совсем недавно полагали, а воспалительные Тх1-хелперы. Обяза-

тельным условием проявления ГЗТ, как и других типов аллергии, является предварительная сенсибилизация организма, которая в эксперименте достигается внутрикожным введением антигена в полном адъюванте Фрейнда (см. «Вакцины») с последующей транспортировкой антигенных пептидов дендритными клетками в паракортикальные зоны лимфоузлов, где они, контактируя с $CD4^+$-Т-лимфоцитами, индуцируют их превращение в Тх1-клетки. Существенную роль в таком направлении дифференциации Т-хелперов играют повышенная экспрессия на вспомогательных клетках молекул МНС класса II и секретируемый ими ИЛ-12. Готовность отвечать ГЗТ на разрешающую дозу антигена возникает спустя 5–7 сут. В развитии локальной кожной реакции различают две фазы – раннюю, быстро и бесследно исчезающую реакцию воспаления в виде инфильтрации кожи нейтрофилами, которая возникает спустя несколько часов после введения разрешающей дозы антигена, и позднюю (основную фазу), обусловленную мононуклеарными клетками, проявляющуюся через 48–72 ч образованием папулы, которая подвергается некрозу. Запуск этой и других клеточных реакций ГЗТ (контактной гиперчувствительности на пикрилхлорид, парафенилендиамин, динитрохлорбензол и красители, лекарственной чувствительности на антибиотики), естественно, осуществляют сенсибилизированные Тх1-клетки, активирующие вначале резидентные макрофаги, а затем и мигрирующие в очаг иммунного воспаления. При этом исключительно важную роль в патогенезе ГЗТ играют γ-интерферон, ФНО α и β, ИЛ-2, ГМ-КСФ, продуцируемые Тх1-клетками, ИЛ-1, ИЛ-6, вырабатываемые макрофагами, а также хемокины, выделяемые теми и другими эффекторными клетками. Перечисленный набор цитокинов стимулирует слияние фагосом, содержащих микробы, с лизосомами у макрофагов, генерируя образование ими активных форм кислорода и оксида азота, обладающих микробоцидными свойствами, а также индуцирует секрецию воспалительных цитокинов. При развитии неэффективной реакции ГЗТ на внедрение инфекционных агентов, которые не поддаются разрушению, формируется инфекционная гранулема, в центральной части которой находятся возбудители, гигантские и эпителиоид-

ные клетки, окруженные валом Т-лимфоцитов, предохраняющих диссеминацию инфекционных агентов.

Инфекционная аллергия. Развитие инфекционной аллергии (гранулемы) и ее сущность впервые описал Р. Кох. Повторно заражая морскую свинку микобактериями туберкулеза, он обнаружил необычно бурную реакцию на них больного животного. На месте подкожного введения суперинфицирующей дозы в считанные часы некротизировалась ткань, возникала язва, и вместе с ее содержимым удалялись туберкулезные бактерии, что предупреждало их распространение в регионарные лимфоузлы и через кровь во внутренние органы свинки.

Подобное состояние гиперчувствительности характерно для многих инфекционных заболеваний, но интенсивность проявления этой аллергической реакции не имеет столь яркого характера, как при туберкулезе.

Обычно инфекционная аллергия возникает при хронических инфекциях, реже – при остропротекающих.

Являясь по своей природе иммунологическими, аллергические реакции у больных часто усугубляют течение инфекционных процессов. Например, возникновение каверн (полостей) на месте туберкулезных бугорков в легких приводит к диссеминации микобактерий туберкулеза и возникновению новых очагов. Закономерно возникающая гиперчувствительность при инфекционных болезнях позволяет использовать аллергические пробы в их экспресс-диагностике.

Приготовление и применение микробных аллергенов

Туберкулин – концентрированный стерильный фильтрат бульонных культур микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего видов, осажденный трихлоруксусной кислотой и растворенный после обработки этанолом и эфиром в изотоническом растворе натрия хлорида с фосфатным буфером, твином-80 (стабилизатор) и фенолом (консервант). Аллергеном в нем является туберкулопротеин. Вводят туберкулин внутрикожно в ладонную поверхность предплечья, по Манту, в объеме 0,1 мл, содержащем 2 туберкулиновые единицы. Результаты реакции учитывают через 72 ч, оценивая ее по диаметру возникающей на

месте введения туберкулина папулы, которая при положительной пробе составляет 5 мм и более. При отрицательной реакции папула не образуется или имеет точечные размеры.

Тулярин – убитая нагреванием при температуре 70 °С взвесь 2-суточной культуры туляремийных бактерий в 3 %-ном глицерине. В 1 мл взвеси содержится 100 млн бактерийных тел. Вводят тулярин внутрикожно в среднюю треть предплечья в количестве 0,1 мл. Реакцию учитывают через 24–36–48 ч. Если результат положительный, на месте введения тулярина возникает отек или инфильтрат различной интенсивности. Вместо внутрикожной пробы можно пользоваться накожной, для воспроизведения которой применяют тулярин, содержащий в 1 мл 2 млрд убитых бактерийных тел. На продезинфицированную кожу предплечья наносят 2 капли препарата, через которые делают поверхностные насечки и слегка втирают его. Реакцию оценивают через 24–36 ч. Кроме тулярина реакцию воспроизводят также туаллергеном, извлеченным из бактерий химическим путем. Вводят его внутрикожно или накожно. У больных туляремией положительная реакция возникает в ближайшие 5 мин, но ее учитывают спустя 40–60 мин.

Бруцеллин – фильтрат 3-недельной культуры бруцелл *(Brucella abortus, B. melitensis)*, прогретый при 80 °С в течение 1 ч. Его вводят внутрикожно в область предплечья. Реакцию, которую называют пробой Бюрне, учитывают через 24–48 ч. При латентном бруцеллезе на месте введения бруцеллина возникает отечность диаметром 10 мм, а при клинически выраженной форме болезни она может достигать 60 мм.

Антраксин – гидролизат сибиреязвенных бацилл. Вводится внутрикожно в ладонную поверхность предплечья в количестве 0,05 мл. Положительная реакция характеризуется появлением гиперемии и инфильтрата. Реакция оценивается плюсами в зависимости от размера гиперемированного участка: «+» – диаметр около 15 мм; «++» – 16–25 мм; «+++» – 26–50 мм; «++++» – более 51 мм.

Гонококковый аллерген – гретая взвесь убитых гонококков в изотоническом растворе натрия хлорида, содержащая в 1 мл 100 млн м. т. Его применяют при диагностике хронических форм гонореи, вводя внутрикожно 0,1 мл. Положительная реакция, возникающая через 24 ч, прояв-

ляется гиперемией и припухлостью в месте инъекции аллергена.

Актиномицетные аллергены – экстракт актиномицетов или актиномицетная вакцина, содержащая в 1 мл 250 млн м. т. Аллерген вводят внутрикожно. Результат учитывают через 24 ч. Положительная реакция проявляется покраснением и образованием папулы.

Фавин, трихофитин, микроспорин – консервированные фильтраты 2–3-месячных бульонных культур соответствующих грибов. Применяются в диагностике фавуса, трихофитии, микроспории.

Токсоплазмин – специально обработанная перитониальная жидкость белых мышей, зараженных внутрибрюшинно токсоплазмами. Аллерген вводят внутрикожно по типу аллергической реакции Манту. Учитывают ее через 24–48 ч.

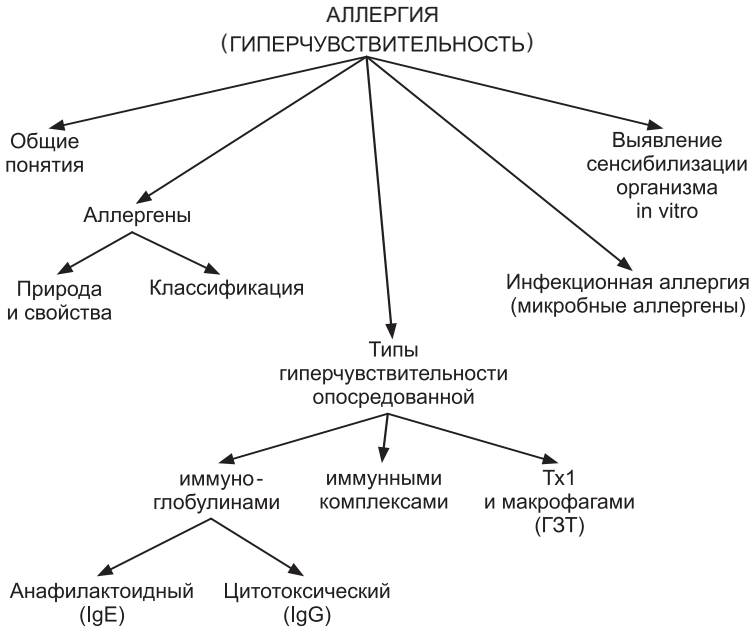
Определение сенсибилизации организма in vitro

Аллергизацию организма *in vitro* можно выявить в реакциях торможения миграции, бласттрансформации лейкоцитов, розеткообразования и многих других. К наиболее простым относятся реакции дегрануляции базофильных гранулоцитов и тучных клеток под влиянием аллергена в присутствии сыворотки больного.

Реакция дегрануляции базофилов (тест Шелли) ставится на предметном стекле в спиртовом растворе нейтрального красного, путем смешивания в нем равных объемов: 1) лейкоцитов человека (кролика), сыворотки больного и аллергена (опыт); 2) лейкоцитов, сыворотки больного и изотонического раствора натрия хлорида; 3) лейкоцитов, аллергена и того же изотонического раствора (контроли). Капли накрывают покровными стеклами и заключают в парафин. Препараты выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре и в иммерсионном микроскопе подсчитывают 20–25 базофилов. При дегрануляции трети из них в опытной пробе базофильный тест считают положительным.

Реакция дегрануляции тучных клеток ставится так же, как тест Шелли. Обычно используется для определения лекарственной аллергии. Тучные клетки получают от крыс. С этой целью в брюшную полость наркотизиро-

ванного животного вводят 10 мл теплого изотонического раствора, 1–2 мин массируют крысе живот и, сделав посредине разрез, собирают стекающую жидкость с петель кишечника в пробирку с гепарином. Получив взвесь тучных клеток, ее наносят по 0,03 мл на три предметных стекла, покрытых сухим слоем нейтрального красного, и смешивают с такими же объемами исследуемого антибиотика-аллергена (контроль № 1), сыворотки пациента (контроль № 2), антибиотика-аллергена и сыворотки (опытная проба). Накрыв взвеси клеток покровными стеклами, их на 15 мин помещают в термостат, после чего под иммерсионным микроскопом подсчитывают в препаратах количество дегранулированных тучных клеток. При низких значениях дегрануляции тучных клеток в контроле показатель 10 % и более в опыте указывает на гиперчувствительность организма к исследуемому антибиотику.



Граф 50

Аутотолерантность и аутоиммунные патологические процессы

Под иммунологической толерантностью (терпимостью, неотвечаемостью) понимают нереагирование иммунной системы организма на собственные клеточные и тканевые органоспецифические аутоантигены, а под аутоиммунными патологическими процессами – болезненные состояния, связанные с воздействием на них аутоагрессивных клонов Т-лимфоцитов и аутоантител, вырабатываемых аутореактивными клонами В-лимфоцитов.

Механизм иммунологической толерантности. Аутотолерантность Т- и В-клеток организма возникает уже в раннем эмбриональном периоде и объясняется тем, что незрелые аутоагрессивные лимфоциты на ранних этапах дифференциации, контактируя с аутоантигенами, реагируют не активацией, как зрелые клетки на чужеродные антигены, а запрограммированной гибелью. Начало отрицательной селекции (выбраковки) аутоспецифических клонов Т-клеток путем индукции гибели по механизму апоптоза происходит в тимусе, а полное ее завершение – в других лимфоидных органах и тканях при контакте с их антигенами. Здесь следует подчеркнуть, что в периферических органах аутореактивность Т-клеток может элиминироваться при связывании их рецепторов с антигенпрезентирующими клетками при отсутствии на них костимулирующих молекул CD80 и CD86. Состояние неотвечаемости часто также связано с блокадой рецепторов аутоагрессивных клонов Т-лимфоцитов аутоантигенами.

Механизмы, индуцирующие толерантность аутореактивных В-лимфоцитов, пока не выяснены. Предполагается, что толерантность у них возникает уже на стадии формирования мембранных IgM как рецепторов, но если аутореактивность В-лимфоцитов в процессе их дифференциации все-таки сохраняется, то возможность развития гуморального аутоиммунного ответа крайне невелика, поскольку он не может быть поддержан Т-хелперами. Не исключено, что активация аутореактивных клонов В-клеток предотвращается наличием в иммунной системе супрессорных клеток, роль которых могут выполнять, например, CD^{8+}-Т-лимфоциты или вето-клетки.

В общем, разные популяции иммунных лимфоцитов неодинаково чувствительны к индукции толерантности. В сравнении с Т-клетками более устойчивыми к ней оказываются В-лимфоциты, а среди Т-клеток – Т-киллеры более, чем Т-хелперы, а Тх2-клетки – более, чем Тх1.

Ввиду этого некоторая часть их может оставаться у плода не полностью толерантной, как, например, сальниковая популяция $CD5^+$-лимфоцитов, вырабатывающих полиспецифические IgM, которые реагируют с ДНК и белками цитоскелета, миелином, сывороточным альбумином, тироглобулином, коллагеном, трансферрином, эритроцитами, фибробластами, компонентами клеток сердца и почек. Какой-либо патологии они, однако, не вызывают. По мнению Г. Грабарь и некоторых других видных иммунологов, наличие в крови здоровых гнотобиотов (безмикробных животных) небольшого количества этих и других аутоантител не является следствием повреждения тканей или перекрестных иммунных реакций на антигены микробов-симбионтов организма, как совсем недавно считалось. Они образуются в процессе обмена веществ или к продуктам клеточного распада и выполняют функцию выведения аутоантигенов, участвуя таким образом в поддержании антигенного гомеостаза. Более того, нормальные аутоантитела, в отличие от патологических, могут регулировать функции тканей, благоприятно влиять на рост и общую дифференциацию клеток организма. Подобную гомеостатическую функцию в здоровом организме, можно полагать, выполняют оставшиеся в нем аутореактивные Т-клетки.

Основные типы аутоиммунных процессов. В настоящее время известно более сотни аутоиммунных болезней. Все они имеют затяжной деструктивно-прогрессирующий характер и неблагоприятный прогноз. По локализации подразделяются на органоспецифические и системные, а по иммунологическому механизму возникновения – на Тх1-зависимые (клеточные) и Тх2-зависимые (гуморальные). При этом аутоиммунные процессы клеточного типа вызывают $CD4^+$-клетки класса Тх1 и $CD8^+$-киллеры. Первые из них индуцируют воспалительную реакцию ГЗТ, вовлекающую обширные участки органов и тканей с тяжелыми повреждениями, а вторые – локальный цитотоксический механизм поражения.

Нозологические формы аутоиммунных болезней. Среди органоспецифических болезней наибольшую значимость в аутоиммунной патологии имеют: 1) тироидит Хашимото, тиротоксикоз (базедова болезнь) и первичная микседема, сопровождающиеся увеличением щитовидной железы (зобом), 2) инсулинзависимый сахарный диабет, при котором поражаются β-клетки панкреатических островков Лангерганса, продуцирующие инсулин; 3) рассеянный склероз, характеризующийся возникновением множественных склеротических бляшек в белом веществе головного и спинного мозга. Среди системных болезней чаще других встречаются: 1) ревматоидный артрит с преобладающим поражением суставов; 2) гемолитическая анемия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, идиопатическая лейкопения; 3) системная красная волчанка, проявляющаяся диффузной дезорганизацией соединительной ткани практически всех внутренних органов и систем с преимущественным вовлечением в патологический процесс почек, суставов, кожи, клапанов сердца, серозных оболочек плевры и брюшины. При этом тироидит, тиротоксикоз, микседему и болезни крови относят к аутоиммунным процессам гуморального типа, инсулинзависимый сахарный диабет и ревматоидный артрит – к аутоиммунным болезням клеточного типа, а системную красную волчанку – к аутоиммунным болезням гуморально-клеточного типа.

Пусковые механизмы аутоиммунных процессов. К развитию аутоиммунных болезней приводят, прежде всего, регуляторные нарушения в иммунной системе, что часто обусловливается мутациями. Так, разрушение у мышей гена трансформирующего фактора роста β или тирозинкиназы Lyn, участвующей в передаче активационных сигналов в В-клетку, закономерно ведет к формированию аутоиммунных процессов. Получены многочисленные линии животных с повышенной склонностью к данным процессам, например, у цыплят *Obese* возникает аутоиммунный тироидит, у линейных новозеландских черных мышей – аутоиммунная гемолитическая анемия, а у других линейных мышей – инсулинзависимый сахарный диабет, волчаночный синдром и прочие аутоиммунные заболевания, детерминируемые, как правило, несколькими генами. С большим постоянством в некоторых семьях выявляются

регуляторные нарушения в иммунной системе при наследственной предрасположенности, которая определяется в основном аллельными формами генов комплекса МНС. Об этом, в частности, свидетельствует необычайно высокий уровень органоспецифических аутоантител у здоровых членов семьи, в которой имеются больные аутоиммунными болезнями братья, сестры, родители или дети.

В клинической практике аутоиммунные патологические процессы чаще всего возникают при травматических повреждениях забарьерных тканей, содержащих аутоантигены, неконтактируемые в норме с иммунными клетками. Так, при травме глаза могут развиться аутоиммунные болезни, вызванные аутоантителами к антигенам хрусталика глаза (острый передний увеит) и увеального тракта (симпатическая офтальмия), при повреждении яичек – к антигенам спермы (мужское бесплодие), а при травме мозга – к миелину (энцефалопатия).

Нередко они возникают при деструктивных процессах в органах и тканях, когда в организме появляются патологические аутоантигены, например при вирусных болезнях. Вырабатываются патологические аутоантитела также при разного рода модификациях белковых молекул. Так, организменные протеины, конъюгированные с α-метил-ДОФА, индуцируют аутоиммунную гемолитическую анемию с выработкой аутоантител к Rh-антигену. Соединяясь с изониазидами, они могут вызвать образование антиядерных иммуноглобулинов с последующим возникновением полиартрита, а комбинируясь с пенициллинамидом и прокаинамидом, – аутоантитела, провоцирующие развитие системных аутоиммунных процессов вплоть до красной волчанки.

При некоторых инфекциях аутоантитела продуцируются к собственным клеткам в результате сходства детерминант антигенов патогенных микроорганизмов и хозяина. Примерами могут служить перекрестно реагирующие аутоантитела к гемолитическому стрептококку и клеткам миокарда больного ангиной, такие же аутоантитела – при болезни Чагаса, вызываемой трипаносомой Круза, или к бледной трепонеме и митохондриям – при сифилисе.

Допускается, что аутоиммунные процессы, связанные с поражением собственных тканей аутоантителами, могут явиться следствием повышенного содержания потенци-

ально агрессивной сальниковой субпопуляции $CD5^+$-B1-клеток.

К развитию аутоиммунного процесса клеточного типа может приводить необычная для нормы экспрессия антигенов МНС класса II на неспециализированных клетках, что отмечается в пораженной поджелудочной железе при инсулинзависимом сахарном диабете, щитовидной железе и печени – при аутоиммунных тиротоксикозах и гепатитах. При этом остается неясным, каково происхождение пептидов, представляемых молекулами МНС класса II. Естественно было бы ожидать, что они имеют эндогенную природу, но это противоречит известным правилам презентации, согласно которым антигены МНС класса II представляют Т-хелперам лишь экзогенные пептиды.

Не исключено, что аутоиммунные заболевания клеточного типа возникают у тех индивидуумов, у которых в эмбриогенезе был нарушен процесс выбраковки аутоагрессивных клонов лимфоцитов, причиной чего могла быть функциональная недостаточность дендритных клеток. И, наконец, в индукции аутоиммунных патологических процессов большое значение может иметь недостаточная активация супрессорных вето-клеток, «сдерживающих» неэлиминированные клоны аутореактивных Т-лимфоцитов.

Характер, природа и специфические особенности аутоантител. Ведущую роль в возникновении и развитии большинства аутоиммунных процессов играют реакции клеточного иммунитета, но как провоцирующие их факторы в более полной мере изучены аутоантитела. Они вырабатываются при всех аутоиммунных процессах, но, отличаясь цитофильностью, быстро адсорбируются в тканях, вследствие чего даже при избыточной продукции их титры в сыворотке крови больного очень низки и судить о тяжести течения аутоиммунных болезней по динамике нарастания аутоантител в крови больных, как это всегда делается, трудно или даже невозможно.

Обычно взаимодействие аутоантител с молекулами клеток приводит к локальной иммунокомплексной патологии, а при активации ими комплемента, NK-клеток и макрофагов – к массивному повреждению тканей цитотоксического типа.

По характеру образования иммунных комплексов различают полные и неполные аутоантитела, тепловые – с оп-

тимумом реагирования при температуре 37 °С и холодовые – с оптимумом 4 °С класса G и М. Чаще и в более высоких титрах встречаются холодовые полные антиэритроцитарные агглютинины класса М. Холодовыми являются аутоантитела против IgM и IgG, нейтрофилов и Т-лимфоцитов. Способностью холодовых нормальных аутоантител резко подавлять Т-лимфоциты можно объяснить постепенный переход инфекционной болезни, возникающей на фоне переохлаждения, в аутоиммунный процесс. Среди тепловых антител превалируют неполные иммуноглобулины класса G, вызывающие гемагглютинацию и ингибирующие Т-супрессоры.

Характер действия и, главное, специфичность аутоантител при разных аутоиммунных процессах человека имеют характерные особенности. Так, при тироидите Хашимото в крови, как правило, обнаруживается только один вид органоспецифических аутоантител, реагирующих с тироглобулином, который является компонентом щитовидной железы. У трети больных тем же тироидитом, кроме специфических антител, обнаруживаются антитела к обкладочным клеткам слизистой оболочки желудка. То же отмечается и при других аутоиммунных болезнях. Эти аутоантитела, реагирующие с разными клетками, однако не перекрестно реагирующие групповые, а органоспецифические, т. е. в сыворотке больных содержатся две-три популяции совершенно различных по специфичности антител, что позволяет диагностировать сопутствующие аутоиммунные болезни, нередко близкие по механизму развития.

Исключительно разнообразны аутоантитела при системной красной волчанке, сочетаемой с ревматоидным артритом, гемолитической анемией, идиопатической лейкопенией, тромбоцитопенической пурпурой, дерматомиозитом и др.

Основные иммунологические показатели аутоиммунных болезней. Аутоиммунные болезни, связанные с образованием иммунных комплексов, проявляются лимфоплазмоклеточной инфильтрацией пораженного органа; активацией пролиферативных процессов в лимфоузлах; наличием в крови больных гипергаммаглобулинемии и органоспецифических аутоантител. Диагноз аутоиммунной болезни может подтвердить благоприятное действие иммунодепрессантов, снижающих у больных уровень аутоантител в крови и угнетающих лимфоидную реакцию.

АУТОТОЛЕРАНТНОСТЬ И АУТОИММУННЫЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ
Механизм аутотолерантности
Основные показатели аутоиммунных болезней
в крови
в органах
в лимфоузлах
Тх1-зависимые
Основные типы аутоиммунных процессов
Тх2-зависимые
Органоспецифические
Системные
Пусковые механизмы аутоиммунных процессов
полные
Характер, природа и особенности аутоантител
неполные
Тепловые
Полиоргано-специфические
Холодовые

Граф 51

Иммунодефициты

Иммунодефициты – это патологические состояния, обусловленные недостаточностью иммунной системы или определенных ее звеньев. Различают первичные (наследственные) иммунодефициты, обусловленные мутациями генов или хромосомными перестройками, и вторичные (приобретенные), развивающиеся в постнатальном периоде вследствие действия на организм различных иммунодепрессивных факторов.

Первичные иммунодефициты – это тяжелые наследственные заболевания (3 случая на 1000 больных), встречающиеся почти исключительно у детей. В настоящее время в этой группе иммунодефицитов числится несколько десятков нозологических форм заболеваний. Среди них превалируют иммунодефициты с точечными повреждениями иммунной системы, которые подразделяют на четыре подгруппы: *иммунодефициты с преобладанием клеточного звена иммунитета* (ретикулярный дискинез при дефекте стволовых клеток, синдром «голых лимфоцитов», при котором не формируются $CD4^+$-клетки вследствие отсутствия экспрессии всех генов МНС класса II); *с преимущественным поражением гуморального иммунитета* (агаммаглобулинемия, сцепленная с хромосомой X, причиной которой являются нарушения в развитии В-лимфоцитов или экспрессии генов иммуноглобулинов); *связанные с дефектом фагоцитарной функции* (синдром дефекта адгезии лейкоцитов с нарушением таксиса, эндоцитоза у нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов, замедленным заживлением ран (тип 1) и задержки умственного развития (тип 2) с нарушением киллинга при дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, миелопероксидазы и вторичных гранул у нейтрофилов); *связанные с наследственными дефектами системы комплемента* (волчаночный синдром при дефиците C1q, C1r, C2 и C4, рецидивы пиогенных инфекций, иммунокомплексная патология при дефиците C3).

К *комбинированным иммунодефицитам* с множественными повреждениями относят заболевания, в основе которых лежат генотипические дефекты, затрагивающие ранние этапы развития лимфоцитов, как, например, иммунодефицит созревания лимфоцитов, развивающийся в

результате повреждения генов рекомбиназ RAG1 и RAG2, обусловливающих перестройку генов TCR; синдром ди Джорджи с дефектом развития тимуса, паращитовидной железы и сосудов сердца; геморрагический синдром Вискотта – Олдрича, вызванный тромбоцитопенией, при котором нарушаются межклеточные взаимодействия и эффективность иммунных процессов; Луи – Бар-синдром (атаксия–телеангиэктазия), обусловленный дефектностью репарации ДНК, который характеризуется мозжечковыми расстройствами движения, симметричными телеангиэктазиями (расширение капилляров) и рецидивирующими пневмониями, часто сочетающимися с гипоплазией тимуса и дисгаммаглобулинемией.

Иммунную недостаточность организма людей можно заподозрить по часто повторяющимся простудным заболеваниям, причиной которых могут служить сапрофитические виды микроорганизмов (см. «Внутрибольничные инфекции»), с преимущественным поражением бронхолегочного аппарата, слизистой оболочки полости рта, кожи и ее придатков. В общем, пациенты с наиболее распространенными первичными иммунодефицитами страдают от инфекционных заболеваний в 75–100 % случаев. Иногда у них обнаруживаются аутоиммунные болезни и аллергоподобные расстройства, как, например, «атопический» дерматит при синдроме Вискотта – Олдрича. Нередко развиваются злокачественные процессы. Так, при Луи – Бар-синдроме они возникают в 10–20 % случаев, при синдроме Вискотта – Олдрича – в 15 %, при сцепленной с полом агаммаглобулинемии – в 6 %. Важно также подчеркнуть, что дискинезии и системные пороки у детей с первичными иммунодефицитами могут сопровождаться задержкой развития.

В лечении первичных иммунодефицитов используется в основном переливание крови как заместительная терапия. В борьбе с инфекциями основное место отводится антибиотикам. На пути трансплантации костного мозга, тимуса, недостающих популяций лимфоцитов стоит большая опасность развития в организме детей с первичным иммунодефицитом реакции «трансплантат против хозяина». Разрабатывается генотерапия, суть которой состоит во введении аутологичных клеток костного мозга, содержащих недостающий ген.

Вторичные иммунодефициты – это широко распространенные иммунодефицитные состояния, проявляющиеся под действием на организм химических, физических и биологических иммунотропных веществ-агентов, в том числе экологических и лекарственных. В большей или меньшей степени эти состояния могут сопутствовать соматическим и инфекционным болезням, стрессу и старению. Строго говоря, в рубрике «вторичные иммунодефициты» имеется лишь одна классифицированная форма болезни – СПИД, вызванная вирусом иммунодефицита человека, т.е. внешним средовым фактором. Роль наследственного фактора при других вторичных иммунодефицитах исключить трудно. Но если предположить, что в основе их развития он все же участвует, то проявляется только в результате действия внешнего индуктора, что характерно для болезней с наследственным предрасположением.

Дифференцирующими критериями первичных и вторичных иммунодефицитов могут служить: установление генетического дефекта-индуктора, время проявления иммунодефицита (раннее–запоздалое), развитие оппортунистических инфекций (первичное–послеиндукторное), методы лечения иммунодефицитов (генотерапия – устранение причинного фактора).

Основой проявлений вторичных иммунодефицитов является: 1) гибель иммунокомпетентных клеток, реализуемая по механизмам некроза и апоптоза; 2) блокада их рецепторов и нарушение внутриклеточных звеньев сигнализации продуктами микробов, опухолевых клеток, метаболитами и токсинами; 3) дисбаланс эффекторных и супрессорных клеток, $CD4^+/CD8^+$ -клеток в сторону снижения индекса (норма 1,8–2,1), Тх1/Тх2, что проявляется нарушением их активности и неравномерным развитием двух типов иммунного ответа.

Эти иммунологические отклонения, правда, могут носить несколько иной характер, зависящий от факторов и механизмов, обусловливающих иммунодефицит. Так, при микобактериальных инфекциях отмечают анергию, гибель Т-клеток и супрессорных макрофагов; при белковом голодании – лимфопению и гипофункцию клеток; при дефиците микроэлементов – дефект развития Т-клеток, снижение активности Т- и NK-клеток и нейтрофилов (Zn), дефект нейтрофилов, гипофункцию Т-клеток (Cu).

Иммунодефициты при стрессе. В основе иммунодефицитов при стрессе лежит воздействие на организм высоких концентраций катехоламинов, АКТГ и глюкокортикоидов, вызывающих не только пространственное перераспределение лимфоцитов и выход незрелых кортикальных тимоцитов из вилочковой железы, что отмечается при их низком уровне, но и апоптоз лимфоцитов. Наиболее чувствительны к ним кортикальные $CD4^+$- и $CD8^+$-лимфоциты, менее – В-клетки и макрофаги. Неблагоприятные последствия однократного стресса для иммунной системы проходят бесследно, так как предшественники Т- и В-лимфоцитов устойчивы к кортикоидам. Сопровождая заболевание, стресс может выступать как ко-фактор формирования вторичных иммунодефицитов. Особую проблему составляет часто повторяющийся стресс. Накапливаясь, стрессорные состояния вызывают в иммунной системе необратимый процесс, в частности ускоренное ее старение.

Иммунодефициты пожилых. Точный возраст, в котором развивается старческий иммунодефицит, определить крайне трудно. Клинически значимые его проявления обычно обнаруживаются в 70-летнем возрасте.

Возрастное старение иммунной системы связано с быстрой утратой многих функций тимуса и его инволюцией. В частности, уже вскоре после рождения происходит «периферилизация» функций тимуса, т. е. передача части его «полномочий» периферическому отделу иммунной системы. Полагают, что в основе этого процесса лежит накопление в лимфоузлах Т-клеток памяти против эпитопов инфекционных и пищевых агентов. В то же время резко уменьшается способность стромы тимуса заполняться лимфоцитами. Параллельно снижается секреторная активность эпителия тимуса. В период полового созревания она еще достаточно высока, но к 60 годам секреция основного гормона тимулина прекращается. Атрофия эпителиального ретикулума тимуса происходит в течение всей жизни. В среднем возрасте остаточная ткань тимуса составляет примерно 3 %, а в старости – 1 %. Резкое опустошение его эпителиальных и лимфоидных клеток обнаруживается после 60 лет, когда участки нормальной ткани сохраняются разве только вокруг сосудов. В этот же период отчетливо проявляется функциональная недостаточность периферических Т-лимфоцитов, однако она еще хо-

ВИДЫ ИММУНОДЕФИЦИТОВ
Первичные (дефекты)
Вторичные (вызванные)
звеньев иммунитета
клеточного (синдром «голых лимфоцитов»)
гуморального (агамма-глобулинемия)
системы комплемента (волчаночный синдром)
фагоцитарной функции (синдром нарушения таксиса, эндоцитоза, киллинга)
комбинированные (синдромы)
ди Джорджи (дефекты тимуса, паращитовидной железы, сосудов сердца)
Вискотта — Олдрича (геморрагии)
Луи — Бар (атаксия-телеангиэктазия)
стрессами (гормоны надпочечников)
иммунотропными факторами
болезнями
соматическими
инфекционными
старением (инволюция тимуса, низкоафинные Ig)

Граф 52

рошо компенсируется несмотря на снижение численности Т-лимфоцитов. Количество NK-клеток существенно не изменяется, а активность фагоцитов даже повышается. На фоне подавления тимусзависимого гуморального ответа повышается концентрация IgG и IgA, но среди них преобладают низкоаффинные антитела. С возрастом в гуморальный иммунный ответ вовлекается ограниченное число клонов В-клеток, но увеличивается вклад поликлональной составляющей, ослабляется проявление аллергических процессов, примерно у 50 % старых людей накапливаются аутоантитела к ДНК, коллагену, белкам щитовидной железы. Гиперпродукцию аутоантител связывают с ослаблением контроля со стороны Т-супрессоров. В отличие от иммунодефицита при стрессе иммунологические изменения, происходящие при старении, однонаправленны и необратимы.

Трансплантационный иммунитет

Трансплантационный иммунитет – это вид наследственного (естественного) иммунитета, проявляющийся иммунологической реакцией отторжения чужеродных по антигенной структуре органов и тканей или лимфоидных клеток, называемых трансплантатами (*transplantatio* – пересаживание).

Виды трансплантатов. Органы и ткани разных видов животных (ксенотрансплантаты) несовместимы и после пересадки человеку отторгаются в кратчайшие сроки. Гистосовместимыми оказываются лишь трансплантаты собственных тканей, например кожные лоскуты, пересаженные с одного участка тела человека на другой (аутотрансплантаты), а также органы и ткани одинаковых по генотипу однояйцевых близнецов, развивающихся из одной оплодотворенной яйцеклетки, или инбредных животных, полученных при скрещивании близкородственных особей (сингенные трансплантаты, или изотрансплантаты). В современной медицине чаще всего используются генетически не идентичные, но по основным локусам гистосовместимые аллотрансплантаты.

Природа и механизм трансплантационного иммунитета. Иммунологическую природу отторжения чужеродных трансплантатов в экспериментах доказал в 40-х гг. XX в.

П. Медавар, установив, что кожные аллотрансплантаты разрушаются активированными лимфоцитами.

В настоящее время известно несколько десятков «сильных» и «слабых» генетических локусов, обусловливающих гистосовместимость. При несовместимости по «сильным» локусам отторжение аллотрансплантатов происходит в течение ближайших двух недель, а по «слабым» – может растягиваться на многие недели и месяцы, и в этих случаях удается добиться их стойкого приживления с помощью иммунодепрессантов. Наибольшую роль в отторжении аллотрансплантата играют антигены МНС класса II, вызывающие преимущественно Тх1-зависимый клеточный иммунный ответ. При этом в реакции отторжения аллотрансплантата принимают участие $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоциты. Первые ответственны за развитие иммунного воспаления, во многом сходного с ГЗТ, а вторые – обусловливают разрушение аллогенных клеток. $CD4^+$-клетки вовлекаются в реакцию после доставки аллоантигена дендритными клетками донора, мигрирующими из трансплантата, но каким образом антигенный пептид передается от них на МНС класса II реципиентных антигенпрезентирующих клеток для распознавания Т-хелперам – неизвестно. Вслед за этим сингенные АПК должны продуцировать ИЛ-12, направляющий дифференциацию хелперов в сторону Тх1. Точно так же происходит распознавание аллоантигенов $CD8^+$-клетками хозяина, но на антигенах МНС класса I. Правда, существует также представление, что $CD8^+$-клетки способны распознавать неизмененные аллогенные молекулы класса I «напрямую», а не в комплексе с собственными антигенами МНС класса I.

Реакция отторжения аллотрансплантата. Аллотрансплантаты отторгаются даже в том случае, если отличаются от тканей реципиента хотя бы одним антигеном, но интенсивность и быстрота реакции, прежде всего, зависят от характера локуса гистосовместимости и типа иммунореактивности реципиента, что хорошо изучено при подсадке кожного аллотрансплантата. Так, при его трансплантации в первые 3–4 дня между ним и кожей реципиента устанавливается нормальное кровообращение, и по внешнему виду кажется, что происходит нормальное приживление кожного лоскута. Начиная с 5–7-х сут, он быстро отекает, становится твердым, синюшным, с точечными кровоизли-

яниями. Происходит это потому, что проникшие в кожный трансплантат $CD4^+$Тх1-клетки выделяют цитокины, привлекая в него огромное количество макрофагов, продукты которых вызывают иммунное воспаление. Завершается процесс отторжения трансплантата на второй неделе полным тромбозом сосудов и цитолизом аллогенных клеток, который осуществляют $CD8^+$-киллеры при участии NK-клеток.

Вторично подсаженный трансплантат кожи того же донора отторгается через 5–7 сут. Процесс его деструкции начинается с первых дней, без первоначальной фазы васкуляризации, что само по себе препятствует приживлению кожного аллотрансплантата. Эффект реакции *second-set* («второго захода») связывают с действием цитокинов, продуцируемых Т-клетками, которые быстро образуются из клеток памяти при их контакте с клетками донора. Выработанные на первичный аллотрансплантат антитела существенной роли в *second-set*-реакции не играют. Они, правда, могут проникать в трансплантат и формировать с мембранными антигенами иммунные комплексы, вызывая воспалительную реакцию с участием макрофагов и клеток стромы самого трансплантата. Позже в реакции отторжения пересаженной ткани могут участвовать сенсибилизированные $CD8^+$-киллеры и воспалительные $CD4^+$-клетки, завершающие ее разрушение. Точно так же отторгаются другие солидные аллотрансплантаты. Исключение составляет суспензия клеток костного мозга, в процесс цитолиза которых вовлекаются нормальные киллеры и антитела, практически не задействованные при типичной трансплантационной реакции.

Реакция «трансплантат против хозяина». Отторжение чужеродных тканей и клеток – это обычная иммунная реакция реципиента против трансплантата, но у некоторых из них может развиться противоположная реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Это, в частности, отмечается у эмбрионов и новорожденных животных или птиц из-за незрелости их иммунной системы. У взрослых особей способность отторгать трансплантат утрачивается после облучения летальными дозами ионизирующей радиации, разрушающей клетки иммунной системы. Иммунологически ареактивными становятся животные с индуцированной толерантностью к антигенам донора в результа-

те их иммунизации в эмбриональном периоде или в первые дни после рождения.

РТПХ закономерно возникает у иммунологически инертных животных при трансплантации клеток лимфоузлов и селезенки, тимуса или кроветворной ткани костного мозга.

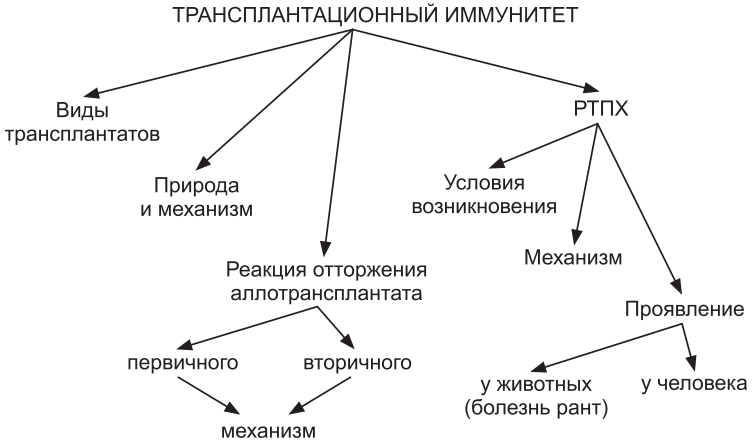
Механизм РТПХ. В основе РТПХ преобладает реакция $CD4^+$-лимфоцитов донора на МНС класса II реципиента, выражающаяся в избирательности повреждения дендритных клеток, макрофагов и эпителиальных клеток тимуса, экспрессирующих их. Размножаясь и инфильтрируя ткани-мишени, $CD4^+$-лимфоциты вытесняют из них собственные Т-лимфоциты, дефицит которых возрастает по мере постепенного угасания лимфопоэза у хозяина. Пролиферацию агрессивных клонов лимфоцитов поддерживает избыточная выработка ростовых цитокинов, вызывающих апоптоз клеток хозяина и развитие кахексии. Цитотоксическая реакция $CD8^+$-клеток большой роли в развитии РТПХ не играет.

Проявление РТПХ. Классической РТПХ является *болезнь рант* у новорожденных мышей. Развивается она после введения им аллогенных клеток селезенки взрослых мышей и проявляется отставанием в росте и снижении массы тела (*runt* – малорослость). Вскоре возникают дерматит и понос. Вследствие интенсивной пролиферации лимфоидных клеток донора в первые дни наблюдается увеличение массы лимфоузлов, гиперплазия костного мозга и спленомегалия. В более позднее время наступает атрофия лимфоидной ткани реципиента, а во внутренних органах появляются очаги некроза. На фоне кровяного химеризма (разных по генотипу клеток) развивается гемолитическая анемия и резко снижается антиинфекционная резистентность. Сходная картина РТПХ отмечается у взрослых животных, но без отставания в росте.

У человека РТПХ обычно развивается при пересадке аллогенного трансплантата костного мозга для компенсации недостаточности кроветворения при разного рода цитопениях (низком уровне клеток) и лучевой болезни. Начинается она через 10–30 дней с дерматита и диареи, затем развивается энтерит, колит, гепатит, нарушается лимфо- и гемопоэз, понижается выработка гормонов тимуса и замедляется процесс формирования в нем Т-лимфо-

цитов с последующим развитием иммунодефицита. Острая РТПХ у человека длится от одной до 2–3 недель, а хроническая – может продолжаться несколько месяцев. Заканчивается РТПХ смертью или выздоровлением вследствие возникновения толерантности к Т-клеткам трансплантата, старения или гибели трансплантированных клеток костного мозга.

С целью профилактики РТПХ у людей суспензию костного мозга обрабатывают моноклональными антителами или сорбируют предшественников Т-клеток с помощью лектина сои. Новые Т-лимфоциты, формирующиеся в тимусе хозяина, становятся толерантными к его клеткам, органам и тканям.



Граф 53

Противоопухолевый иммунитет

Противоопухолевый иммунитет является основным видом наследственного иммунитета, обеспечивающего выживание многоклеточных животных, в организме которых, как показывают расчеты соматических мутаций, в течение одних суток возникает около 1 млн мутантных клеток, значительная часть которых подвергается опухолевой трансформации. Быстро распознавая и разрушая

их, иммунная система выполняет функцию гомеостаза, что обусловливает нормальное развитие организмов во внутриутробном и постнатальном периодах.

Этиологические основы возникновения опухолей. Согласно принятым теперь взглядам, раковое перерождение клеток у животных чаще всего вызывают интеграционные ДНК- и РНК-содержащие вирусы. Оно обычно возникает не сразу, так как геном интеграционного вируса в хромосоме клетки-хозяина репрессируется. Трансформация клетки в злокачественную происходит после дерепрессии и считывания информации из вирусных онкогенов. Провоцирующими агентами дерепрессии онкогенов могут явиться экзогенные или эндогенные факторы самой разнообразной природы (см. «Онкогенные вирусы»).

Виды и механизмы противоопухолевого иммунитета. Различают две системы противоопухолевой защиты: 1) врожденную, универсальную противоопухолевую реактивность организма, независимую от специфичности раковых антигенов; 2) специфическую, которая индуцируется антигенами возникающих опухолей, сфокусированную на очаг (бластому).

Естественный противоопухолевый иммунитет обусловливается в основном нормальными киллерами, которые разрушают злокачественные клетки при контакте с ними, и ФНО. Фагоцитарная реакция в естественной противоопухолевой защите большого значения, по-видимому, не имеет. Макрофаги не поглощают живые опухолевые клетки, но, как и нормальные киллеры, могут обладать механизмом цитолиза.

Специфический антибластомный иммунитет обеспечивают, главным образом, ЦТЛ, но их эффективность определяется иммуногенностью мембранных опухолеспецифических трансплантационных антигенов (см. «Онкогенные вирусы»), защитно-приспособительными механизмами злокачественных клеток и их супрессорным действием на иммунную систему хозяина.

Механизмы защиты опухолевых клеток от иммунных факторов. Различают два механизма защиты злокачественных клеток от иммунного надзора. Один из них связан с дефицитом на опухолевых клетках молекул распознавания, а другой – с маскировкой (ускользанием) их антигенов.

В частности, опухолевые клетки трудно распознаются ЦТЛ потому, что они слабо или совсем не экспрессируют молекулы МНС класса I. К тому же клетки опухолей не экспрессируют молекул CD80 и CD86, реагирующих с корецептором CD28, без сигнала, с которого вместо активации и дифференциации у $CD8^+$-лимфоцитов развивается анергия, а нередко – они попросту разрушаются по механизму апоптоза.

В случае если опухолевый антиген индуцирует антителообразование, то специфические иммуноглобулины, реагируя с ним, вместо повреждения опухолевых клеток часто защищают их от действия цитотоксических Т-лимфоцитов или даже усиливают злокачественный рост. Объясняется это тем, что антительная блокада опухолевых антигенов на мембранах скрывает чужеродность раковых клеток. Не понятно лишь то, почему противоопухолевые антитела не опсонизируют злокачественные клетки, способствуя их фагоцитозу или киллингу NK-клетками. Необходимо отметить, что чужеродность опухолевых антигенов маскируют не только антитела, но также мукополисахариды, всегда накапливающиеся при трансформации нормальных клеток в злокачественные.

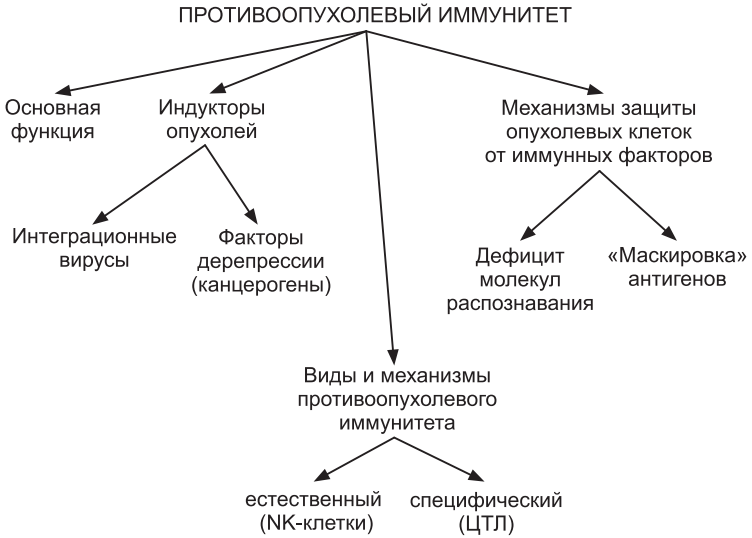
Избежать иммунного надзора опухолевые клетки могут также путем интернализации (погружения) иммунного комплекса антител с мембранными антигенами внутрь клетки без последующего ресинтеза поверхностных антигенов. Возможно, что в ряде случаев мембранные антигены опухолевых клеток становятся растворимыми и, выделяясь в межклеточную жидкость, «перехватывают» противоопухолевые антитела и блокируют Т-киллеры «на дальних подступах». Не исключено, что в процессе развития антибластомного иммунитета в опухолевых клетках происходит мутация генов, которая приводит к утрате специфичности их антигенов.

Допускается, что защита опухолевых клеток обусловливается продукцией ими цитокинов, снижающих активность ЦТЛ. Такую функцию могут, например, выполнять ТФР α и β, а также ИЛ-10, ингибирующий синтез цитокинов Тх1-клетками (в том числе γ-ИФН).

Существует представление, что в опухолевом процессе часто развивается иммунотолерантность к опухолевым антигенам, которую удалось воспроизвести в эксперимен-

те путем инокуляции раковых клеток, не вызывающих формирование опухоли и не индуцирующих иммунитет.

Развитие опухолей можно объяснить также активацией супрессорных клеток. При этом роль супрессоров могут выполнять макрофаги, гипотетические вето-клетки, Тх2-лимфоциты, являющиеся антагонистами Тх1-клеток, или же сами опухолевые клетки, продуцирующие такие же цитокины, как и Тх2-клетки.



Граф 54

Иммунный статус человека

Резистентность организма обеспечивается сбалансированным действием многих конституциональных и приобретенных гуморально-клеточных факторов иммунной системы. Количественный вклад каждого из них в суммарный иммунитет колеблется вокруг свойственного ему усредненного показателя (нормы), что и называют *иммунным статусом*.

Исследования механизмов иммунного статуса выявили, что способность реагировать на патогены генетически

закодирована. По силе иммунного ответа одни особи могут быть высокореагирующими на один из них и слабореагирующими на другой, а вся популяция условно подразделяется на три типа – сильный, слабый и умеренный. Гены иммунореактивности называются Ir-генами. Среди них одни контролируют процесс переработки антигена макрофагами, другие – скорость пролиферации и дифференциации Т- и В-клеток, третьи – общий уровень образования антител и синтез цитокинов. Все эти гены сцеплены с локусом главного комплекса гистосовместимости, кодируя антигены МНС на иммуноцитах и тем самым контролируя процессы их кооперации.

Возрастные особенности формирования иммунного статуса. Организм новорожденного и детей первых 6 мес жизни на внедрение антигена реагирует слабой фагоцитарной активностью и низким уровнем выработки антител (преимущественно IgM). Полноценно иммунная система начинает функционировать со второго года жизни, когда устанавливается нормальный процесс образования IgG. К 4–6-му году их титры достигают величин, присущих взрослым. Сохраняется лишь дефицит выработки секреторных IgAS, что обусловливает высокую чувствительность детей к возбудителям респираторных и кишечных инфекций. Полностью сбалансированное функционирование защитных факторов устанавливается только в 15–16-летнем возрасте и в благоприятных условиях сохраняется на протяжении всей жизни. У пожилых людей снижение уровня иммунитета происходит в результате нарушения процесса распознавания антигенов и выработки иммуноглобулинов, что чаще всего возникает на фоне вторичных иммунодефицитов, развивающихся при соматических и инфекционных заболеваниях. Обычно они носят временный, функциональный характер, исчезая после выздоровления, но если повреждаются отдельные звенья иммунной системы, то иммунодефициты прогрессируют.

О состоянии иммунного статуса судят по целому ряду тестов неспецифической и приобретенной устойчивости: по количественному содержанию в сыворотке крови больных комплемента, лизоцима, интерферонов α и β, фагоцитарной активности макрофагов и, главное, по процентному или абсолютному количеству Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и содержанию иммуноглобулинов, нормальный

уровень которых в крови составляет 1000–2000 Т-клеток/мкл, 100–300 В-клеток/мкл, 0,5–1,9 г IgM/л, 8–17 г IgG/л, 1,4–3,2 г IgA/л.

При выявлении иммунологических нарушений прибегают к коррекции, используя биологически активные препараты, модифицирующие иммунный ответ, благотворно воздействующие на иммунокомпетентные клетки или на вырабатываемые ими регуляторные продукты.

Принципы иммунотерапии

Иммунотерапия – лечение иммунотропными природными и синтетическими средствами, действующими на иммунную систему или иммунологическую фазу патологических процессов. Среди иммунотерапевтических средств различают иммуностимуляторы-иммунокорректоры, активирующие (исправляющие) иммунологические процессы, и иммуносупрессоры, ингибирующие (подавляющие) неадекватно сильные иммунные реакции. Все они называются *иммуномодуляторами*. Среди них по терапевтическому эффекту выделяют две группы – с преимущественно стимулирующим или корректирующим действием и иммунодепрессанты.

Иммуномодуляторы стимулирующего и корректирующего действия. По источнику происхождения (получения) выделяют 5 подгрупп стимуляторов-корректоров:

1) иммуноглобулиновые препараты человека (см. «Иммунные сыворотки»);

2) пептиды из экстракта тимуса крупного рогатого скота (тактивин, тималин, тимоптан, тимостимулин), использующиеся при лечении заболеваний с поражением Т-системы иммунитета и аутоиммунных процессов;

3) цитокины, в первую очередь: а) рекомбинантные интерфероны α (реаферон), β (бетаферон), γ (гаммаферон), применяемые для лечения гепатитов, острых респираторных вирусных инфекций, злокачественных новообразований, гнойных и септических процессов, б) интерлейкины, в частности ИЛ-2 (пролейкин и ронколейкин), эффективные при меланоме, лейкозах и лимфомах, в) рекомбинантные колониестимулирующие факторы (молграстим, леноградстим), которые используются для нормализации кроветворения;

4) препараты из липополисахаридов псевдомонад (пирогенал и продигиозан), протеогликанов бактерий (лико-

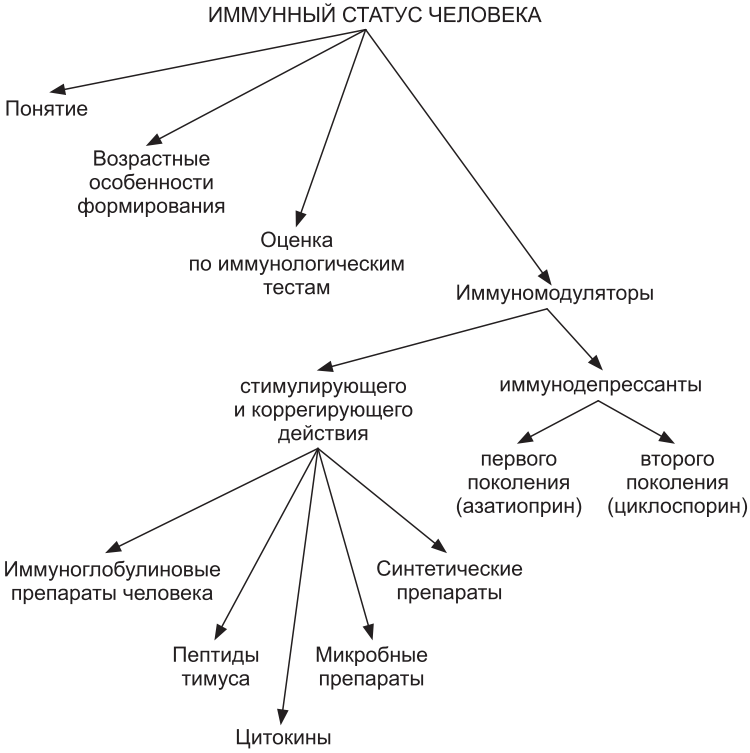
пид), рибосом клебсиелл и стрептококков (рибомунил), гидролизата дрожжевой РНК (нуклеинат натрия), активирующие нейтрофилы, макрофаги, эндотелиальные клетки, индуцирующие образование противоспалительных цитокинов и экспрессию адгезинов;

5) левамизол, диуцифон, тимоген и другие синтетические иммуномодуляторы, применяемые при иммунодефицитах.

Иммунодепрессанты. В качестве иммунодепрессантов применяются вещества двух поколений. К первому из них относятся азатиоприн, синтезированный на основе 6-меркаптопурина, и циклофосфамид, которые нарушают процесс репликации ДНК и неизбирательно повреждают все делящиеся клетки, вступающие в иммунный ответ, в результате чего нарушаются процессы обновления тканей и гемопоэз. К сожалению, первое поколение иммунодепрессантов ослабляет резистентность организма к инфекционным болезням и часто способствует возникновению опухолей.

Более совершенны иммунодепрессанты второго поколения. Лучшим из них является циклоспорин А, выделенный из почвенного гриба *Tylopocladium infantum*, вещество FK506 и антибиотик рапамицин, полученные из стрептомицет. Отличаясь по структуре и некоторым особенностям механизма действия, они не разрушают, а только блокируют активацию Т-лимфоцитов и выработку ИЛ-2, вследствие чего не вызывают побочных эффектов и применяются как идеальные препараты для подавления реакции отторжения при аллотрансплантации органов и тканей, а также при лечении различных аутоиммунных заболеваний. Щадящими иммунодепрессантами оказались глюкокортикоиды, в частности преднизолон и особенно – препараты типа дексаметазона и бетаметазона с высокой активностью, продолжительным действием и выраженным противоспалительным эффектом. Применяются эти гормональные препараты при лечении коллагенозов и аллергических заболеваний.

В последние годы в качестве высокоспецифических иммунодепрессантов пытаются использовать иммунотоксины, представляющие собой гибридные молекулы, состоящие из моноклональных антител или цитокинов, связанных с токсинами (в частности, с рицином), способные проникать внутрь клеток-мишеней и вызывать их лизис.



Граф 55

Иммунные сыворотки

Сыворотка – жидкая часть крови, лишенная фибриногена. Она образуется при свертывании крови и отделении плазмы от сгустка и форменных элементов.

Классификация. Иммунные сыворотки получают от человека (аллогенные, или гомологичные) и от иммунизированных животных (гетерологичные, или чужеродные). По целевому назначению их подразделяют на диагностические и лечебно-профилактические, а по характеру содержащихся в них антител – на антитоксические и антимикробные.

Диагностические сыворотки используются для идентификации патогенных микробов и других антигенов.

С помощью *лечебно-профилактических сывороток* у человека и животных создается пассивный иммунитет. Надобность в нем возникает при инфицировании (серопрофилактика) или заболевании (серотерапия).

Антитоксические сыворотки нейтрализуют бактериальные экзотоксины и применяются для лечения и профилактики токсинемических инфекций. К ним относятся противодифтерийная, противоботулиническая, противостолбнячная, антигангренозная и антистафилококковая сыворотки.

Антимикробные сыворотки обезвреживают бактерии и вирусы. Лучшими из них являются вируснейтрализующие, в частности антикоревая, противооспенная, антирабическая, противоэнцефалитная, противополиомиелитная и противогриппозная сыворотки. Лечебно-профилактическая эффективность антибактериальных сывороток низка, и они используются только в профилактике коклюша и лечении чумы, сибирской язвы, лептоспироза.

Титрование антитоксических лечебных сывороток. Антитоксические сыворотки титруются в антитоксических или международных единицах. За 1 АЕ (МЕ) принимают минимальное количество сыворотки, предохраняющее определенный вид животных от гибели при заражении специально подобранной дозой токсина. Например, 1 АЕ антидифтерийной сыворотки – это наименьшее ее количество, которое на протяжении 4 сут предохраняет от гибели морскую свинку массой 250 г, инфицированную 100 DLM дифтерийного токсина.

Таблица 6. **Титрование антитоксической сыворотки методом флоккуляции**

Ингредиенты, мл	Номер пробирки						
	1	2	3	4	5	6	7
Токсин, содержащий 20 Lf в 1 мл	2	2	2	2	2	2	2
Исследуемая сыворотка	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
На водяной бане при 45 °С							
Результат	–	–	+	+	+	+	+

Инициальная (начальная) флоккуляция, проявляющаяся хлопьеобразованием, возникает в той пробирке, где количество Lf *(Limes floculationis)* токсина и МЕ сыворотки строго соответствуют друг другу. Из табл. 6 видно, что хлопьеобразование произошло в третьей пробирке, содержащей 40 Lf токсина и 0,04 мл сыворотки. Следовательно, в этом объеме антитоксической сыворотки содержится 40 МЕ, а в 1 мл – 40 : 0,04 = 1000 МЕ.

Антибактериальные и антивирусные сыворотки не титруются. Лечебная доза их определяется по объему, улучшающему состояние здоровья больных, что зависит от тяжести заболевания и возраста людей.

Методы получения иммунных сывороток. Лечебно-профилактические гетерологичные сыворотки получают путем иммунизации животных возрастающими дозами убитых микробов и анатоксинов, а после создания базисного иммунитета (грундиммунитета) – живыми микробами и токсинами. Обычно для этого используют лошадей, поскольку они более реактогенны, чем другие животные, дают большой выход антител, и, главное, их белок – наименее анафилактогенный.

Нередко для лечения и профилактики инфекционных болезней используются аллогенные сыворотки здоровых доноров, переболевших людей или препараты плацентарной крови.

Иммуноглобулины. Иммуноглобулины – это очищенные и концентрированные препараты гамма-глобулиновой фракции сывороточных белков, содержащих высокие титры антител. Для получения иммуноглобулинов используют методы фракционирования сывороток с помощью спиртоводных смесей при температуре 0 °С, ультрацентрифугирование, электрофорез, частичное расщепление протеолитическими ферментами, восстановление и алкилирование, дополнительные этапы хроматографической очистки и т. д. Освобожденные от балластных белков иммуноглобулины малотоксичны, более авидны, быстрее реагируют с антигенами и прочно связываются с ними. Применение очищенных иммуноглобулинов снизило тяжесть проявления аллергических реакций, возникающих при введении гетерологичных сывороток. Современная технология изготовления человеческого иммуноглобулина предусматривает полную гарантию стерильности, исключающей заражение людей вирусным гепатитом В и СПИДом.

Основным антителом в препаратах иммуноглобулинов является IgG. Гомологичный иммуноглобулин – практически ареактогенный биопрепарат, и только у некоторых лиц при наличии в нем аллотипических молекул IgG возможна выработка антииммуноглобулинов и развитие анафилаксии.

Способы введения. Сыворотки и иммуноглобулины вводят в организм различными путями: подкожно, внутримышечно, внутривенно или в спинномозговой канал. Пассивный иммунитет возникает после их введения через несколько часов и продолжается около 15 сут.

Профилактика анафилактического шока. У сенсибилизированных чужеродной сывороткой животных и человека анафилактическое состояние, которое при повторном ее введении может проявиться шоком, сохраняется в течение многих месяцев или даже на протяжении всей жизни. Для предупреждения анафилактического шока у людей А.М. Безредка предложил вводить сыворотку (обычно лошадиную) дробно, небольшими дозами, постепенно связывая анафилактические антитела. Предварительно определяют чувствительность организма к чужеродному белку, внутрикожно вводя 0,1 мл лошадиной сыворотки, разведенной 1 : 100, в сгибательную поверхность предплечья. При отрицательной реакции, проявляющейся образованием папулы диаметром 9 мм с небольшим ободком покраснения, через 20–30 мин поочередно подкожно или внутримышечно вводят 0,1 мл и 0,2 мл цельной сыворотки, а спустя 1–1,5 ч – всю остальную дозу. При положительной внутрикожной пробе с инфильтратом более 10 мм дробному введению цельной сыворотки предшествуют четыре инъекции разведенной 1 : 100 сыворотки в объемах 0,5; 1,0; 2,0 и 5 мл с интервалами 20 мин между ними. Состояние индуцированной десенсибилизации непродолжительно, и через 5–14 дней исходная гиперчувствительность восстанавливается.

Аллогенные сыворотки или иммуноглобулины человека анафилактических реакций не вызывают и вводятся одномоментно в необходимой дозировке или объеме, в частности при профилактике кори – внутримышечно в количестве 1,5–3 мл.

Для лечения и профилактики инфекционных заболеваний иммунные сыворотки и иммуноглобулины должны вводиться как можно раньше после заболевания или заражения. Например, противодифтерийную сыворотку следует вводить не позднее 2–4 ч после постановки диагноза, а противостолбнячную – в первые 12 ч от момента ранения.

Граф 56

ВАКЦИНЫ

История открытия. Уже в доисторические времена людям было известно, что переболевшие «черной» оспой повторно ею не болеют, вследствие чего китайцы, стремясь обезопасить себя и опираясь на эмпиризм (*empeiria* – опыт), вкладывали в носовую полость высушенные оспенные струпья, а индейцы втирали порошок из них в надрезы кожи, надеясь таким образом перенести легкую форму инфекции. Нетрудно представить, что искусственное заражение здоровых людей высушенным патологическим материалом, в котором обычно поксвирусы утрачивают вирулентность, зачастую приводило к трагическим последствиям, а сами «привитые» становились источниками инфекции для окружающих.

Практически безопасное оспопрививание было начато английским врачом Эдуардом Дженнером. Твердо убедившись, что перенесшие коровью оспу крестьянки-доильщицы, на руках у которых, как и на вымени коров, возникало несколько бесследно исчезающих пустул, не заболе-

вали натуральной оспой, он 14 мая 1796 г. в кожные надрезы на предплечье 8-летнего Джеймса Фиппса привил лимфу, взятую из кисти доярки, больной коровьей оспой, а спустя 16 дней (инкубационный период натуральной оспы) заразил его гноем пустулы оспы человека без каких бы то ни было неблагоприятных последствий для здоровья ребенка. Начатая Дженнером вариоляция «из ручки на ручку», впоследствии привела к созданию производственной противооспенной вакцины, массовое применение которой во всех странах закончилось в 1977 г. полной ликвидацией натуральной оспы на Земле. За 100 лет до этого события, точнее в конце XIX в., отмечая заслуги Э. Дженнера перед человечеством, основоположник микробиологии и иммунологии великий Луи Пастер предложил все препараты, в том числе собственные, предназначенные для специфической профилактики инфекционных болезней, называть вакцинами (*vacca* – корова).

Определение и классификация. Вакцины представляют собой антигены, которые, как и все другие, активируя иммунокомпетентные клетки организма, вызывают образование иммуноглобулинов и развитие многих других защитных иммунологических процессов, обеспечивающих невосприимчивость к инфекциям. При этом создаваемый ими активный искусственный иммунитет, так же как постинфекционный, возникает через 10–14 дней и, в зависимости от качества вакцины и индивидуальных особенностей организма, сохраняется от нескольких месяцев до нескольких лет. Массовое проведение прививок позволяет создать коллективный активный иммунитет и обеспечить эпидемиологическое благополучие населения. Оно регулируется государственными законами и проводится по эпидемическим показаниям при угрозе эпидемий, риске заболевания при выезде в регионы с природной очаговостью по особо опасным инфекциям или в плановом порядке при осуществлении декретированных (*decretum* – постановление) прививок. Вакцины изредка используются для лечения.

В настоящее время для специфической профилактики инфекций предложено две группы вакцин: 1) традиционные, давно апробированные в практике, бактериальные, риккетсиозные и вирусные корпускулярные (цельноклеточные и вирионные), молекулярные (субклеточные, суб-

вирионные), моно- и ассоциированные вакцины; 2) вакцины нового типа, многие из которых пока не нашли широкого применения.

Традиционные вакцины

Корпускулярные вакцины. Это вакцины, представляющие собой суспензии или лиофилизированные массы живых ослабленных или убитых микробов (вирионов).

Живые вакцины. Принципы создания живых вакцин против инфекционных болезней разработал Л. Пастер, показав, что патогенные микроорганизмы утрачивают болезнетворность без существенного снижения иммуногенности при естественном старении, при длительном выращивании без пересевов на свежие питательные среды, культивировании при повышенных температурах порядка 42–43 °С или воздействии других неблагоприятных факторов; при пассировании через организм устойчивых к ним животных. Используя эту методологию, он получил три ослабленные (аттенуированные) вакцины для профилактики куриной холеры, сибирской язвы и бешенства, а другие ученые, идя по этому пути, – более трех десятков новых вакцин.

Живые вакцины – это, как правило, моновакцины, содержащие аттенуированные разными приемами генетически стабильные варианты (мутанты) диких штаммов микробов, индуцирующих иммунитет по отношению к соответствующей инфекции. Одни из них содержат ослабленные бактерии и риккетсии (бруцеллезная, туляремийная, чумная, сибиреязвенная, туберкулезная вакцины), другие – вирусы (против натуральной оспы, желтой лихорадки, бешенства, полиомиелита, гриппа, кори, краснухи, эпидемического паротита). Живые вакцины высоко иммуногенны и обычно создают очень напряженный и длительный иммунитет вследствие того, что мутантные штаммы сохраняют свойство размножаться (репродуцироваться) в привитом организме, вызывая миниатюрную вакцинную инфекцию, сжатую в сроках течения и сглаженную по тяжести проявления. Например, противооспенная и туляремийная вакцины обеспечивают устойчивость на протяжении 5–7 лет. Исключение составляет, пожалуй, только антигриппозная вакцина, создающая иммунитет на 6–8 мес.

К недостаткам живых вакцин относится то, что они очень реактогенны (энцефалитогенны), обладают свойствами аллергенов, за счет остаточной вирулентности могут вызвать ряд осложнений вплоть до генерализации вакцинного процесса и развития менингоэнцефалита.

Убитые вакцины. Используются в виде моно- и поливакцин для профилактики тифопаратифов, дизентерии, холеры, коклюша, лептоспироза, сыпного тифа, гриппа, полиомиелита, клещевого энцефалита. Лептоспирозная и антигриппозная вакцины, включающие несколько разновидностей (сероваров) возбудителя, поливалентны. Убитые вакцины – малоиммуногенны и создают непродолжительный иммунитет сроком до 1 года, вероятно, потому, что в процессе изготовления происходит денатурация их антигенов. Убитые вакцины готовят по методу В. Колле, для чего бактерии обычно выращивают на плотных средах, смывают, стандартизируют и обезвреживают формалином, ацетоном, фенолом, мертиолятом, хинозолом; УФ-облучением, ультразвуком; нагреванием при температуре 56–70 °С; антибиотиками и фагами.

Молекулярные вакцины. К молекулярным вакцинам относят столбнячный, дифтерийный, стафилококковый, ботулинический и гангренозные анатоксины, получаемые путем обезвреживания экзотоксинов бактерий, обрабатывая их 0,3–0,8 %-ного формалина с последующим выдерживанием смесей на протяжении 3–4 недель при температуре 37 °С; полные соматические и оболочечные протективные антигены, выделяемые при химическом расщеплении бактерий или культивировании вакцинных штаммов (например, сибиреязвенных); субъединичные вакцины из чистых гликопротеидов внешних оболочек вирусов, растворяя детергентами их липидный бислой. Молекулярные вакцины сравнительно малореактогенны и более эффективны, чем убитые вакцины, в частности, создают напряженный иммунитет сроком от 1–2 (протективные антигены) до 4–5 лет (анатоксины). Слабоиммуногенными оказались субвирионные вакцины (рис. 69). Так, противогриппозная субъединичная вакцина из гемагглютининов и нейраминидаз, обладающих свойствами протективных антигенов, создает иммунитет на 1 год.

Ассоциированные вакцины. Ассоциированные, или поливакцины, в своем составе содержат несколько разных

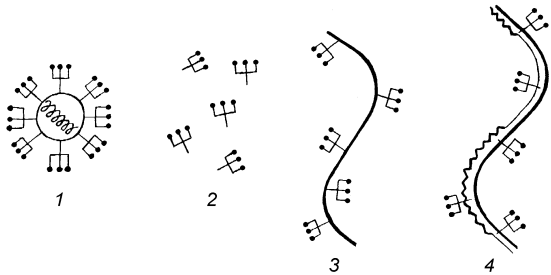


Рис. 69. Принцип конструирования субъединичных и синтетических вакцин:
1 – вирион; *2* – субъединичная вакцина без носителя; *3* – субъединичная вакцина с носителем; *4* – субъединичная вакцина с носителем и иммуностимулятором

антигенов или видов микробов, примерами которых могут служить дифтерийно-столбнячный анатоксин; коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина, состоящая из взвеси убитых бордетелл, дифтерийного и столбнячного анатоксинов; живая тривакцина, включающая ослабленные вирусы кори, эпидемического паротита и краснухи. При этом в ассоциированную вакцину подбираются такие антигены, которые не проявляют конкуренции, т. е. не угнетают выработку антител по отношению к вакцинальным сочленам в гуморальном иммунном ответе.

В арсенале традиционных вакцин насчитывается более трех десятков живых, убитых, молекулярных и ассоциированных вакцин.

Вакцины нового типа

Так как большинство вакцин нового типа не вышли пока из стадии разработок, их нередко называют также *вакцинами будущего*. Среди них имеется пять типов вакцин, которые тоже можно разделить на корпускулярные и молекулярные.

Живые аттенуированные вакцины с реконструированным геномом. Они готовятся путем «расчленения» генома микроорганизма на отдельные (индивидуальные) гены с его последующей реконструкцией, в процессе которой ген вирулентности исключается или заменяется мутантным

геном, утратившим способность детерминировать факторы болезнетворности.

Генно-инженерные вакцины. Это вакцины, представляющие собой искусственно созданные рекомбинантные штаммы вирусов и бактерий, в геном которых введены чужеродные гены, кодирующие один или несколько специфических антигенов. Таким путем, в частности, уже создан рекомбинантный вирус осповакцины, синтезирующий поверхностный HBs-антиген вируса гепатита В; кодирующий гемагглютинин вируса гриппа А; гликопротеины вирусов простого герпеса и везикулярного стоматита. Их применение осложняется тем, что кишечные палочки, которые чаще всего используются в качестве хозяина рекомбинантных молекул, не могут обеспечить синтез полноценных антигенов вирусов человека, т. е. для экспрессии их генов необходимы клетки высших эукариот. Правда, экспрессия HBs-антигена вируса гепатита В успешно осуществляется в культурах винных дрожжей, абсолютно безвредных для людей.

Синтетические вакцины. Они создаются путем искусственного синтеза детерминант антигенов, но так как их иммуногенность оказывается небольшой, то для усиления иммунного ответа они конъюгируются со специально подобранными белками-носителями и иммуностимуляторами, в качестве которых применяют бактериальные продукты мурамилдипептида. Для повышения иммуногенности сконструированные молекулы, например пептидные фрагменты вирусных белков, встраивают в липосомы (липидные пузырьки) или везикулы, образованные детергентом ISCOM, что помогает проникновению антигена в цитозоль клеток и способствует развитию цитотоксического ответа, необходимого для реализации противовирусной защиты.

Лучшими синтетическими вакцинами являются антигриппозная, антисальмонеллезная и противоящурная.

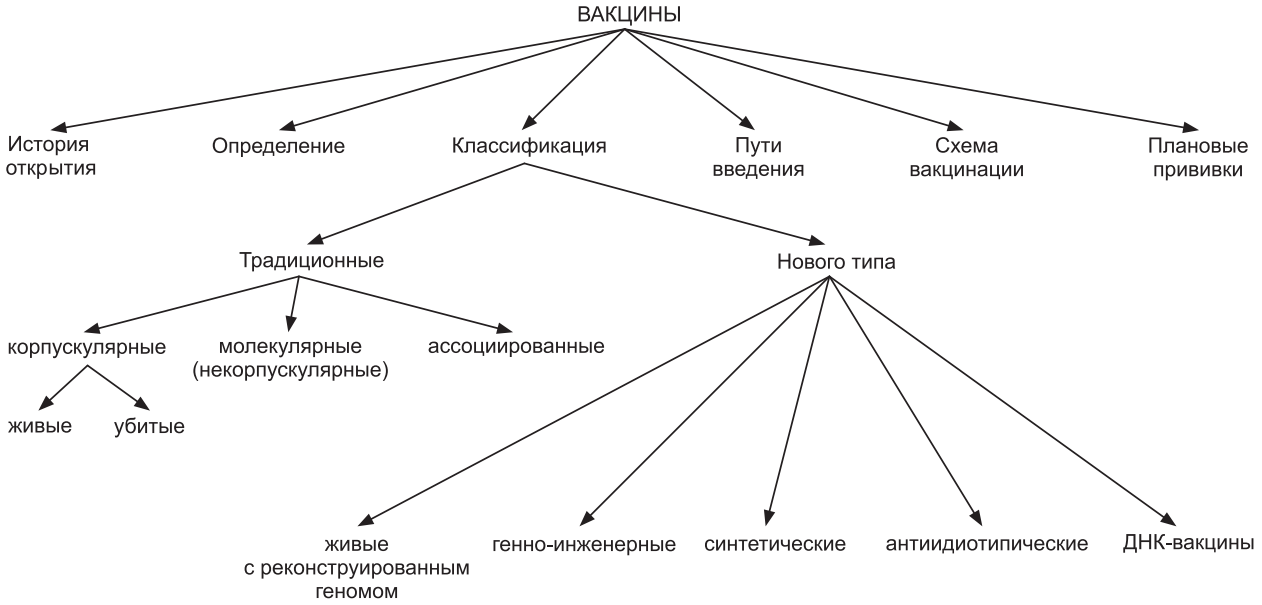
Антиидиотипические вакцины. Это вакцины, являющиеся моноклональными антиидиотипическими антителами, имеющими сходную с детерминантой антигена конфигурацию или, как чаще говорят, несущие ее «внутренний образ». Для их получения используют гибридомы, отобранные после иммунизации животных моноклональными антителами.

ДНК-вакцины. Особый тип новых вакцин из фрагментов бактериальных ДНК и плазмид, содержащих гены протективных антигенов, которые, находясь в цитоплазме клеток организма человека, способны в течение нескольких недель и даже месяцев синтезировать их эпитопы и вызывать иммунный ответ. Обычно эти гены депонируются в мышцы и затем экспрессируются миоцитами. Эффективность ДНК-вакцин доказана в экспериментах по созданию иммунитета к вирусам гепатита, гриппа, возбудителям коклюша, сальмонеллеза, туберкулеза, сибирской язвы.

Пути введения вакцин. Вакцины вводят в организм накожно, внутрикожно, подкожно, реже – через рот и нос. Широкое распространение может получить массовая вакцинация с помощью безыгольных инъекторов. С той же целью разработан аэрогенный способ одновременной аппликации вакцины на слизистые оболочки верхних дыхательных путей, глаз и носоглотки.

Схема вакцинации. С профилактической целью живые вакцины (кроме полиомиелитной) и генно-инженерные применяются однократно, убитые корпускулярные и молекулярные вводятся 2–3 раза с интервалами 10–30 сут. Ввиду того что многократная вакцинация не обеспечивает высокого охвата населения прививками, применяются депо-вакцины. В качестве депонирующих веществ, замедляющих рассасывание антигена и пролонгирующих его воздействие на организм, в экспериментах используют сложные адъюванты типа Фрейнда (неполные – водно-жировая эмульсия, вазелиновое масло, ланолин и эмульгатор – и полные – с добавлением вакцины БЦЖ), а при иммунизации людей – чаще всего алюминиевые квасцы. При этом полный адъювант Фрейнда активирует Тх1-хелперы, способствуя развитию клеточно-опосредованного ответа типа ГЗТ, а алюминиевые квасцы – Тх2-хелперы, направляя иммунный ответ в сторону антителообразования.

Плановые прививки на первом году жизни. Детей прививают против вирусного гепатита (в первые 24 ч после рождения, в возрасте 1 и 5 мес.), туберкулеза (на 3–4-й день), полиомиелита (на 3, 4 и 5-й мес.), коклюша, дифтерии и столбняка (на 3, 4 и 5-й мес.), кори, эпидемического паротита и краснухи (в 12 мес.).


ВАКЦИНЫ
История открытия
Определение
Классификация
Пути введения
Схема вакцинации
Плановые прививки
Традиционные
Нового типа
корпускулярные
молекулярные (некорпускулярные)
ассоциированные
живые
убитые
живые с реконструированным геномом
генно-инженерные
синтетические
антиидиотипические
ДНК-вакцины

Граф 57

РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Современная иммунология разработала большой комплекс простых и очень точных иммунологических реакций, широко используемых при оценке реактивности организма, в диагностике инфекционных болезней, аллергии, аутоиммунных и других иммунопатологических процессов.

Клеточные реакции иммунитета

Среди клеточных реакций иммунитета практические лаборатории чаще всего используют традиционные методы определения фагоцитарной способности лейкоцитов крови. При этом об их роли в иммунитете судят по фагоцитарной активности, фагоцитарному и опсонофагоцитарному индексам, показателям опсонофагоцитарной пробы и завершенности фагоцитоза.

Определение фагоцитарной активности лейкоцитов. В узкую стерильную пробирку наливают 0,2 мл 2 %-ного цитрата натрия, 0,1 мл исследуемой крови, взятой из пальца, и 0,5 мл бактериальной взвеси (500 млн м. т. в 1 мл). В качестве тест-бактерий используют, например, стафилококк или эшерихии. Смесь инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин, затем готовят мазки, фиксируют в смеси Никифорова и окрашивают по Романовскому – Гимзе. При микроскопии подсчитывают не менее 100 нейтрофильных лейкоцитов. Их фагоцитарная активность выражается процентом фагоцитов к общему числу нейтрофилов.

Определение фагоцитарного индекса. Фагоцитарный индекс – это среднее число фагоцитированных бактерий в 1 лейкоците. Для его определения в препаратах подсчитывают 100 нейтрофильных лейкоцитов и количество поглощенных ими бактерий. Фагоцитарный индекс вычисляется делением числа фагоцитированных бактерий на общее число подсчитанных нейтрофилов. Например, 100 лейкоцитов фагоцитировали 540 бактериальных тел – фагоцитарный индекс равен: 540 : 100 = 5,4.

Определение опсонофагоцитарного индекса. Установлено, что в иммунной сыворотке резко повышается титр

особых антител, стимулирующих фагоцитоз. Они называются опсонинами (*opsonion* – снабжение пищей). О содержании их в крови можно судить по *опсонофагоцитарному индексу,* который вычисляется делением фагоцитарного индекса иммунной сыворотки на соответствующий индекс нормальной.

Опсонофагоцитарная проба. Более достоверные данные об опсонизирующих свойствах сывороток получают в опсонофагоцитарной пробе. Ее ставят следующим образом: в небольшую пробирку последовательно наливают 0,25 мл 2%-ного раствора натрия цитрата, 0,25 мл крови и 0,25 мл двухмиллиардной взвеси возбудителя. Пробирку помещают на 30 мин при температуре 37 °С в термостат, затем готовят мазки, фиксируют метиловым спиртом и окрашивают по Романовскому – Гимзе. В препаратах подсчитывают количество микроорганизмов, фагоцитированных 25 нейтрофилами.

Для оценки опсонофагоцитарной пробы предложен *числовой показатель*, представляющий собой сумму произведений, полученных в результате умножения количества лейкоцитов на соответствующее число плюсов, характеризующих интенсивность фагоцитоза (табл. 7).

Таблица 7. **Схема учета опсонофагоцитарной пробы**

Количество фагоцитированных бактерий в 1 лейкоците	Оценка фагоцитоза	Количество фагоцитов	Вычисление цифрового показателя
0	0	3	$3 \cdot 0 = 0$
1–20	+	4	$4 \cdot 1 = 4$
21–40	++	6	$6 \cdot 2 = 12$
41 и более	+++	12	$12 \cdot 3 = 36$

В данном примере показатель опсонофагоцитарной пробы равен 52 (4+12+36). Максимальный показатель выражается цифрой 75, если фагоцитоз всех 25 лейкоцитов оценен тремя плюсами. Показатель в пределах 10–24 характеризует слабо положительную реакцию, 25–49 – ясно выраженную и 50–75 – резко положительную (у здоровых людей он равен 1–3).

Показателем завершенности фагоцитоза может явиться количество деградированных бактерий в расчете на 100 лейкоцитов, но самым точным его индикатором будет от-

сутствие роста бактерий на питательной среде, засеянной лейкоцитарно-бактериальной массой, которая использовалась для вычисления цифрового показателя опсонофагоцитарной пробы.

Определение функциональной активности фагоцитов на различных стадиях фагоцитарного процесса. Степень функциональной активности фагоцитов на первых стадиях фагоцитоза определяют по хемотаксическому индексу, исследуя скорость передвижения фагоцитов к хемоаттрактанту и проникающую их способность сквозь мелкопористые фильтры, а на последующих – микробоцидную активность пероксидазы, супероксиддисмутазы, лизоцима, кислой и щелочной фосфатаз.

Методы определения количества и функционального состояния В-лимфоцитов. В периферической крови В-лимфоциты обнаруживают по наличию у них рецепторов к 3-й фракции комплемента (реакция ЕАС-розеткообразования), иммуноглобулиновых рецепторов (реакция иммунофлюоресценции), рецепторов к эритроцитам мыши (реакция МЕ-розеткообразования).

Реакция ЕАС-розеткообразования ставится в два этапа: вначале готовят реагент, состоящий из эритроцитов быка, антител к ним и комплемента, после чего иммунный комплекс прибавляют к лимфоцитам крови человека – на внешней мембране В-клетки образуется розетка из нескольких эритроцитов.

В *МЕ-розеткообразовании* используются мышиные эритроциты, сорбирующиеся в виде розеток на лимфоцитах периферической крови, а в *реакциях иммунофлюоресценции* – антиглобулиновые сыворотки, меченные люминофорами.

О функциональных свойствах В-лимфоцитов судят по *количественному содержанию антител в иммунных сыворотках*. Чаще других используют метод радиальной иммунодиффузии в агаре. Применяя его, на стеклянную пластину наливают агар, содержащий антитела к тому или иному классу иммуноглобулинов. После застывания агара выбитые в нем лунки заполняются исследуемыми сыворотками. В результате иммунопреципитации вокруг них образуются радиальные полоски, диаметр которых зависит от концентрации соответствующего иммуноглобулина.

Методы определения количества и функционального состояния Т- лимфоцитов. Количественное содержание Т-лимфоцитов определяют по реакциям Е-розеткообразования, бластной трансформации лимфоцитов, подавления миграции макрофагов или гранулоцитов.

Суммарное количество Т-лимфоцитов в реакции розеткообразования определяют, используя плазму крови человека и эритроциты барана. Плазму получают из венозной гепаринизированной крови (20–30 ЕД гепарина/мл). При этом для ускорения оседания эритроцитов кровь помещается в термостат при температуре 37 °С на 30–60 мин. Второй ингредиент реакции – эритроциты от нескольких баранов трижды отмываются изотоническим раствором хлористого натрия и разводятся средами Хенкса или 199-й до 1 %-ной концентрации.

Схема исследования: 1. Для получения Т-лимфоцитов плазму по стенке пробирки наслаивают на фиколл-верографин с градиентом плотности 1,077 в соотношении 4 : 1 по объему. Пробы центрифугируют при комнатной температуре 25 мин при 400 g. Полученное кольцо мононуклеаров отсасывают в пробирку с 2 мл среды Хенкса и вновь центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин.

2. Осадок лимфоцитов взвешивают в среде Хенкса, разводят до концентрации 10–15 клеток на большой квадрат камеры Горяева и в объеме 50 мкл вносят в лунки круглодонной планшеты, прибавляя к ним такой же объем эритроцитов барана.

3. Для более тесного взаимодействия между лимфоцитами и эритроцитами планшета 3–5 мин центрифугируется при 1000 об/мин и помещается в холодильник на 1 ч при 4 °С.

4. Удалив надосадочную жидкость, в лунки вносят по 50 мкл 1 %-ного глютарового альдегида на фосфатном буфере (по 0,4 мл на 10 мл буфера). Смесь выдерживается 10 мин, ресуспендируется автоматической микропипеткой, и полученная суспезия наносится на предметные стекла.

5. Мазки сушат, красят пиронином-метиловым зеленым и подсчитывают 100 лимфоцитов, определяя процент розеткообразующих.

Реакция бластной трансформации Т-лимфоцитов проявляется с фитогемагглютинином или соответствующими антигенами. При этом они превращаются в круп-

КЛЕТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА
Тесты первого ориентировочного уровня
Тесты второго аналитического уровня (методы определения)
Фагоцитарная активность
Индексы
Опсоно-фагоцитарная проба
фагоцитарный
опсоно-фагоцитарный
функциональной активности фагоцитов
количества и функционального состояния
фенотипирования Т-лимфоцитов в реакции розеткообразования
реакция подавления миграции макрофагов-гранулоцитов
Т-лимфоцитов в реакции розеткообразования
В-лимфоцитов (реакции)
Т-лимфоцитов (реакции)
ЕАС-розеткообразования
иммуно-флюоресценции
радиальной иммунодиффузии в агаре
МЕ-розеткообразования
Е-розеткообразования
бластной трансформации

Граф 58

ные молодые клетки-бласты, процент которых вычисляют, подсчитывая в препарате не менее 200 лимфоцитов.

Реакция подавления миграции макрофагов-гранулоцитов возникает под действием цитокинов, которые продуцируются Т-лимфоцитами, контактирующими с антигенами. Ставят ее, смешивая лимфоциты человека со специфическим антигеном (опыт) и без него (контроль). Через 18 ч в обе капли культуральной жидкости опускают капилляр, наполненный фагоцитами. Спустя сутки определяют индекс подавления миграции, сравнивая скорость миграции макрофагов-гранулоцитов во взвеси лимфоцитов с антигеном и без него.

Фенотипирование лимфоцитов в тестах розеткообразования с помощью моноклональных антител. Для определения $CD4^+$-Т-хелперов и $CD8^+$-Т-киллеров используются фиксированные на эритроцитах или частицах латекса моноклональные антитела против CD3, CD4, CD8 молекул, для определения В-лимфоцитов – к CD22 или CD19, для выявления NK-клеток – к CD16 или CD56.

Техника фенотипирования. В круглодонные лунки иммунологических планшет или микропробирки вносят 0,025 мл CD-диагностикума антител и добавляют равный объем лимфовзвеси. Смеси инкубируют 25 мин при 37 °С, центрифугируют при 500–1000 об/мин и помещают на 1 ч при 4 °С в холодильник. Надосадочную жидкость сливают. К осадку добавляют 0,025 мл 0,12 %-ного раствора глютарового альдегида, осторожно ресуспендируют и делают мазки на площади 1 $см^2$. Препарат высушивают, фиксируют спиртом и окрашивают по Романовскому – Гимзе, после чего подсчитывают процент розеткообразующих лимфоцитов.

Серологические реакции иммунитета

Серологическими называют такие реакции, для постановки которых используют сыворотку *(serum)*, содержащую антитела. В их основе лежит специфическое взаимодействие антитела с антигеном.

Серологические реакции применяют для идентификации микроорганизмов, токсинов, любого антигена с помощью известных иммунных диагностических сывороток и для определения природы антител в сыворотке крови с

помощью известных антигенов-диагностикумов. При этом метод определения видовой принадлежности (идентификация) микробов называют *серологическим типажем*, а способ определения титра антител в сыворотке крови – *серологической диагностикой*.

Основными серологическими реакциями являются традиционные реакции агглютинации, преципитации, лизиса, связывания комплемента, нейтрализации и различные их модификации.

Общие закономерности серологических реакций: 1) реакции ставятся *in vitro* (исключение составляет анафилаксия); 2) они проявляются при иммунологическом соответствии (гомологичности) антигена и антитела, в оптимальных температурных условиях и pH среды; 3) протекают в две фазы – взаимодействие антигена с антителом, или специфическая фаза, образование комплекса антитело–антиген, или неспецифическая фаза.

Иммунные диагностические сыворотки получают путем многократного введения животным в нарастающих дозах убитых или живых микроорганизмов, продуктов их распада, обезвреженных или нативных токсинов.

После определенного цикла иммунизации животных делают пробное кровопускание (2–3 мл) и определяют титр сыворотки. Если в сыворотке содержится достаточное количество антител, делают массивное кровопускание или тотальное обескровливание животного. Кровь, собранную в стерильную посуду, сначала помещают в термостат при температуре 37 °С на 4–6 ч для ускорения свертывания, затем – в ледник на сутки. Полученную прозрачную сыворотку отсасывают в стерильную посуду, добавляют консерванты (мертиолят, хинозол), определяют титр антител, проверяют на стерильность и разливают в ампулы.

Используются *неадсорбированные* и *адсорбированные* диагностические сыворотки. Неадсорбированные сыворотки обладают высокими титрами антител, но способны давать групповые (перекрестные) реакции. Адсорбированные сыворотки отличаются строгой специфичностью действия, но имеют низкий титр антител – от 1 : 40 до 1 : 320.

К диагностическим сывороткам относятся: 1) агглютинирующие сыворотки, применяемые для определения рода, вида и серовара бактерий; 2) преципитирующие сыво-

ротки, предназначенные для выявления высокодисперсных антигенов и токсинов; 3) гемолитическая сыворотка, используемая в реакции связывания комплемента; 4) антитоксические сыворотки, нейтрализующие токсины; 5) антивирусные сыворотки, употребляемые для типирования вирусов в реакциях нейтрализации, торможения гемагглютинации и торможения гемадсорбции.

Выпускают также сыворотки, меченные флюорохромами, ферментами, радиоизотопами, которые позволяют с высокой степенью точности обнаружить даже следы антигена.

В качестве антигенов-диагностикумов в серологических реакциях применяют взвеси живых или убитых бактерий, продукты их расщепления, токсины, вирусы. В ряде случаев используют экстракты или выделенные химическим путем антигены из микроорганизмов и тканей животных.

В основе проявления всех серологических реакций лежит образование иммунных комплексов, регистрируемых невооруженным глазом или с помощью лупы, микроскопа, специальной аппаратуры (например, агглютиноскопа, спектрофотометра, счетчика излучений) или индикатора.

Традиционные серологические реакции

Реакция агглютинации

Агглютинацией называется склеивание микробов (клеток) при действии на них специфических антител в присутствии электролита. Реакцию агглютинации (РА) используют в серотипаже микроорганизмов, главным образом, бактерий и риккетсий и в серодиагностике инфекционных болезней.

Для ее постановки необходимы три компонента: 1) антиген (агглютиноген); 2) антитело (агглютинин); 3) электролит (изотонический раствор натрия хлорида).

В качестве антигена в РА применяют суточную взвесь живых или убитых формалином, спиртом, нагреванием культур (*диагностикумы*). Обычно для приготовления бактериальных антигенов используют S-формы культур, которые в 0,5 %-ном растворе натрия хлорида образуют равномерную взвесь. R-формы бактерий как антигены не пригодны, так как агглютинируются спонтанно.

Для получения агглютинирующих сывороток иммунизируют кроликов. При этом им 5–7 раз подкожно, а затем внутривенно с интервалами 2–7 сут в возрастающих дозах вводят убитые бактерии. Заканчивают курс иммунизации животных 2–3 инъекциями живых бактерий. Через неделю определяют титр сыворотки – максимальное ее разведение, которое агглютинирует гомологичный микроорганизм. Если титр сыворотки недостаточен, иммунизацию продолжают.

Полученные таким путем агглютинирующие сыворотки называются неадсорбированными, поскольку они содержат групповые агглютинины и могут в небольших разведениях склеивать родственные в антигенном отношении бактерии. Поэтому для определения вида бактерий надо ставить развернутую реакцию с сывороткой, разведенной от 1 : 100 до ее титра. Сыворотка соответствует микробу в том случае, если агглютинирует его, как минимум, до половины титра.

Более достоверные результаты при определении вида или серовара бактерий дают адсорбированные (монорецепторные или типоспецифические) сыворотки, которые не имеют групповых агглютининов, вследствие чего нет необходимости их сильно разводить, и реакцию агглютинации в них ставят на предметном стекле.

Пластинчатая РА. Пластинчатая, или ориентировочная, РА ставится при комнатной температуре на предметном стекле (рис. 70, *а*). Для этого пастеровской пипеткой на него наносят раздельно каплю сыворотки в разведении 1 : 10–1 : 20 и контрольную каплю изотонического раствора натрия хлорида. В ту и другую бактериальной петлей вносят колонии или суточную культуру бактерий (каплю диагностикума) и тщательно их перемешивают. Реакции учитывают через несколько минут визуально, иногда с помощью лупы (х5). При положительной РА в капле с сывороткой отмечают появление крупных и мелких хлопьев, при отрицательной – сыворотка остается равномерно мутной.

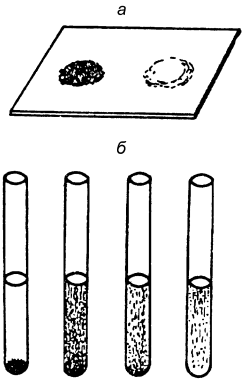


Рис. 70. Реакция агглютинации:
а – пластинчатая;
б – развернутая

В некоторых случаях, когда для агглютинации берется небольшое количество бактерий и учесть ориентировочную РА из-за этого трудно, капли сыворотки с внесенной в нее культурой высушивают, фиксируют, окрашивают фуксином Пфейффера и микроскопируют. При положительной РА во многих полях зрения микроскопа наблюдаются большие скопления бактерий, при отрицательной – бактерии распределены в мазке равномерно. Эта реакция называется *микроагглютинацией*.

Ориентировочная РА производится перед постановкой, развернутой для того, чтобы получить предварительное представление о выделенном виде или сероваре бактерий, отобрать положительно реагирующие с ними сыворотки и исключить из дальнейших исследований неагглютинирующие.

Развернутая РА для серотипажа бактерий. Ее ставят следующим образом. В агглютинационные пробирки предварительно разливают по 1 мл изотонического раствора натрия хлорида. В первую из них доливают 1 мл неадсорбированной сыворотки, разведенной 1 : 100, и, перемешав, 1 мл переносят во вторую, из второй – в третью и т. д. Получив двукратные разведения диагностической сыворотки от 1 : 100 до 1 : 1600 и более, в них вносят по 1–2 капле 2-миллиардной взвеси бактерий. Контролями служат изотонический раствор натрия хлорида с антигеном и исследуемая сыворотка без него. Пробирки энергично встряхивают и помещают на 2 ч в термостат при температуре 37 °С, затем осуществляют предварительный учет, начиная с контролей. Отсутствие агглютинации в контроле и наличие взвешенных хлопьев в двух-трех и более пробирках опыта свидетельствуют о положительной реакции (рис. 70, *б*). Окончательные результаты учитывают через 18–20 ч, выдерживая штатив с пробирками при комнатной температуре. Интенсивность реакции выражается плюсами: «++++» – сыворотка прозрачная, с хлопьевидным осадком склеившихся бактерий на дне пробирки; «+++», «++» и «+» – убывающие просветления с уменьшением бактериального осадка. Заостряя внимание на агглютинате и его характере, следует отметить, что жгутиковые бактерии агглютинируются в виде рыхлых легко взбиваемых хлопьев спустя 2 ч, а безжгутиковые бактерии и риккетсии склеиваются через 18–20 ч с образовани-

ем мелкозернистых трудноразбиваемых при встряхивании осадков.

Развернутая РА для серодиагностики инфекционных болезней. Обнаружение в сыворотке больных антител к определенным видам патогенных микроорганизмов – косвенный, но очень важный диагностический показатель, так как они образуются только под воздействием возбудителя соответствующего заболевания. Техника постановки развернутой РА для серодиагностики такая же, как в серотипаже. Получив сыворотку больных, ее, как и диагностическую, разводят изотоническим раствором натрия хлорида от 1 : 100 до 1 : 1600.

В качестве антигена в этой реакции используют диагностикумы – заведомо известные взвеси убитых бактерий, с которыми безопасно работать.

Реакция учитывается так же, как развернутая РА для идентификации бактерий. Обычно клинический диагноз подтверждает наличие агглютината в титре 1 : 200 и выше. При агглютинации бактерий в более низких титрах сыворотки, которая может происходить за счет нормальных антител, имеющихся у здоровых людей или больных с другим заболеванием, реакцию агглютинации ставят повторно, спустя 3–4 дня, в надежде выявить нарастание титра антител. Нередко динамику нарастания антител прослеживают с самого начала заболевания, для чего исследуют «парные» сыворотки, полученные от больного в разгар заболевания и спустя 7–10 и более сут, когда титр агглютининов под воздействием патогенного микроба повышается в 2–4 и более раз.

В тех случаях, когда в качестве антигена предполагается использовать мельчайшие микроорганизмы, например микоплазмы и вирусы или экстракты и лизаты бактерий, другие высокодисперсные вещества, комплексы которых с агглютининами увидеть невозможно даже в агглютиноскопе, прибегают к постановке реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), сорбируя их на бараньих эритроцитах. Она ставится в лунках полистироловых планшет. По чувствительности и наглядности результатов РНГА намного превосходит развернутую РА.

РНГА для серодиагностики инфекционных болезней. Используя данную реакцию для обнаружения антител в сыворотках больных, готовят эритроцитарные антигенные диагностикумы. Для этого бараньи эритроциты в течение 15 мин обрабатывают раствором таннина в разведении

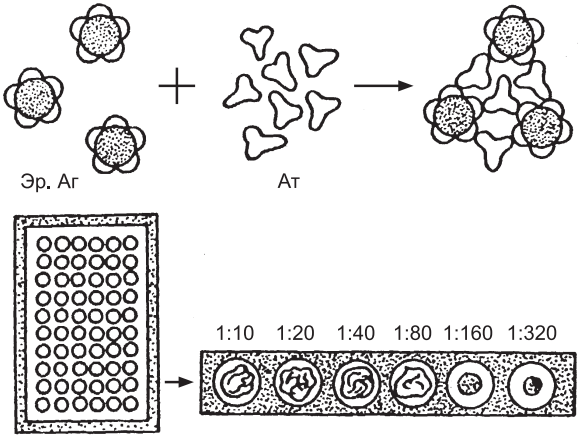


Рис. 71. РНГА для серодиагностики инфекционных болезней:
Эр.Аг – эритроцитарно-антигенный диагностикум; Ат – антитела

1 : 20 000–1 : 200 000, что придает им устойчивость и повышает адсорбционную способность. Затем их смешивают с известным антигеном и инкубируют 2 ч при температуре 37 °С. Сенсибилизированные антигеном эритроциты 2–3 раза отмывают 0,85 %-ным раствором натрия хлорида и в количестве 0,1–0,25 мл 0,5 %-ной взвеси добавляют к сыворотке, разведенной от 1 : 10 до 1 : 1280 и разлитой по 0,25–0,5 мл в лунки планшет (рис. 71). В качестве контроля используют взвеси интактных и нагруженных специфическим антигеном эритроцитов, которые вносят в сыворотки, дающие заведомо отрицательную и положительную реакции.

Результаты учитывают через 2 ч после инкубации в термостате. РНГА оценивают плюсами: «++++» – эритроциты равномерно покрывают всю лунку планшеты в виде зонтика с неровными краями, «+++» и «++» – осадок эритроцитов в виде зонтика, в центре небольшое кольцо из несклеившихся эритроцитов, «+» – в основном несклеившиеся эритроциты. При отрицательной реакции эритроциты спонтанно агглютинируют в виде плотного диска («пуговицы») на дне лунок.

РНГА для идентификации высокодисперсных антигенов. Применяя ее в определении видовой принадлежности антигенов, готовят антительный диагностикум, сорбируя на эритроцитах иммуноглобулины известной иммунной сыво-

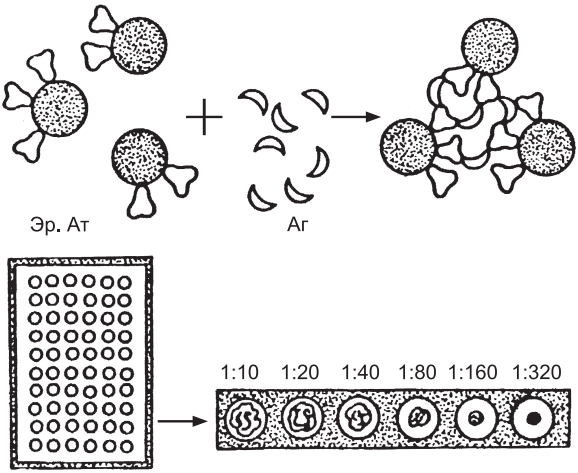


Рис. 72. РНГА для выявления высокодисперсных антигенов:
Эр. Ат – эритроцитарно-антительный диагностикум; Аг – антигены

ротки. Параллельно в лунках полистироловых пластин делают двухкратные разведения антигена в объеме 0,25–0,5 мл и к каждому из них добавляют 0,1–0,25 мл сенсибилизированных антителами эритроцитов (рис. 72). Учет и оценка антительной РНГА для идентификации антигенов производится в те же сроки и по тем же показателям, которые используются в аналогичной ей реакции для серодиагностики болезней.

Реакция Кумбса. С помощью этой РА выявляют неполные антиэритроцитарные антитела при анемиях, вызванных системными заболеваниями крови, коллагенозах, резус-конфликте. Различают *прямую и непрямую* реакции Кумбса (рис. 73).

Прямая реакция Кумбса позволяет выявлять неполные антитела, фиксированные на эритроцитах больных. Для их обнаружения каплю 5 %-ной взвеси эритроцитов, трижды отмытых теплым изотоническим раствором натрия хлорида, вносят в каплю антиглобулиновой сыворотки, полученной иммунизацией кроликов глобулинами человека. Результат учитывают через 5–15 мин. В качестве контроля служит реакция с одногруппными эритроцитами заведомо здорового человека.

Непрямая реакция Кумбса выявляет свободные неполные антиэритроцитарные антитела. Их адсорбцию осуще-

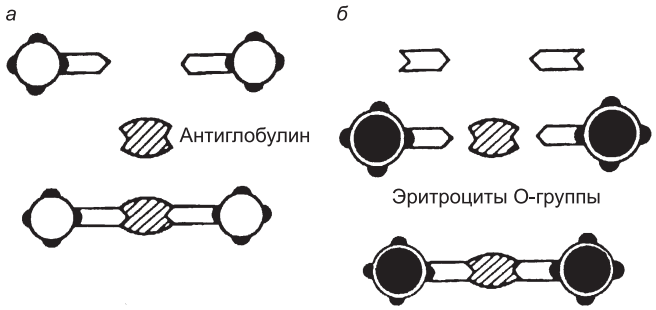
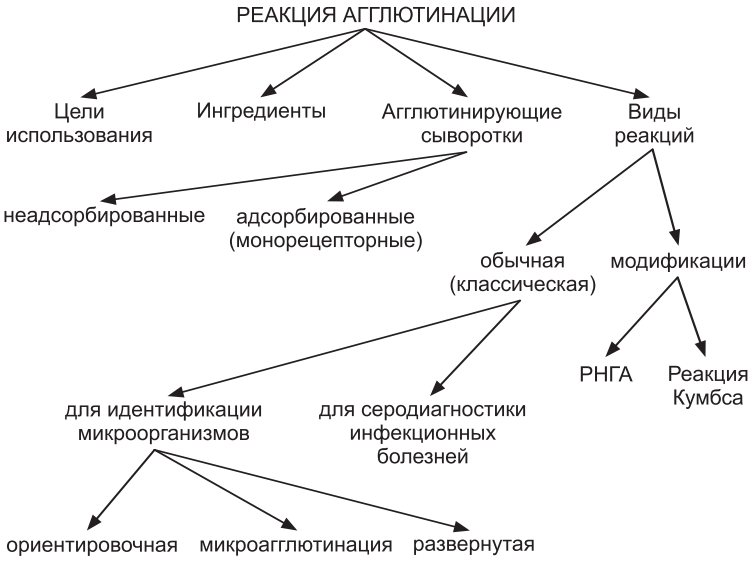


Рис. 73. Реакция Кумбса:
а – прямая; *б* – непрямая

ствляют 5–10 %-ной взвесью трижды отмытых эритроцитов 0-группы крови здорового человека, которые прибавляют к трем частям исследуемой сыворотки больных. Смесь ставят в термостат при температуре 37 °С на 1 ч. Трижды отмытые эритроциты добавляют затем к антиглобулиновой кроличьей сыворотке.



Граф 59

Реакция преципитации

Реакцией преципитации (РП) называется осаждение из раствора антигена (преципитиногена) при воздействии на него иммунной сыворотки (преципитина) и электролита. Посредством РП можно выявить антиген в разведениях 1 : 100 000 и даже 1 : 1 000 000, т. е. в таких малых количествах, которые не обнаруживаются в химических реакциях.

Преципитиногены представляют собой ультрамикроскопические частицы белково-полисахаридной природы, экстракты из микроорганизмов, органов и тканей, продукты распада бактериальной клетки, их лизаты, фильтраты патологического материала. Так как преципитиногены обладают термоустойчивостью, то для их извлечения материалы подвергаются кипячению. В РП используются жидкие и прозрачные антигены.

Преципитирующие сыворотки обычно получают путем гипериммунизации кроликов в течение нескольких месяцев, вводя им бактериальные взвеси, фильтраты бульонных культур, аутолизаты, солевые экстракты микроорганизмов, сывороточные белки.

Титр преципитирующей сыворотки в отличие от титра других диагностических сывороток определяется максимальным разведением антигена, который преципитируется в ней. Это объясняется тем, что преципитиноген, участвующий в РП, содержит в единице объема гораздо больше частиц, чем антител в преципитирующей сыворотке такого же объема. В связи с этим преципитирующие сыворотки выпускают с титром не ниже 1 : 100 000.

Реакция кольцепреципитации Асколи. В узкую пробирку диаметром 0,5 см с неразведенной преципитирующей сывороткой в количестве 0,5–1 мл, держа ее в наклонном положении, пастеровской пипеткой медленно по стенке наслаивается такой же объем антигена. Пробирку осторожно, чтобы не смешать жидкости, ставят вертикально. При правильном наслоении преципитиногена на сыворотку четко обозначается граница между двумя слоями жидкости.

Результаты реакции учитывают в зависимости от вида антигена и антител через 5–10 мин, 1–2 ч или через 20–24 ч. В случае положительной реакции в пробирке на границе между сывороткой и исследуемым экстрактом появляется

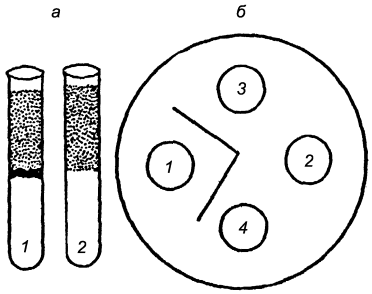


Рис. 74. Реакция преципитации:
а – реакция Асколи: *1* – опыт, *2* – контроль; *б* – реакция Оухтерлони: *1* – специфическая иммунная сыворотка; *2* – нормальная сыворотка, *3* – известный антиген, *4* – неизвестный антиген

преципитат в виде кольца белого цвета (рис. 74, *а*). Постановка реакции обязательно сопровождается контролями сыворотки и антигена (см. «Возбудитель сибирской язвы»).

Реакцию кольцепреципитации широко используют не только в диагностике инфекционных болезней бактериальной природы, но и в судебной медицине – для определения видовой принадлежности белка, в частности кровяных пятен; в санитарной практике – при выявлении фальсификации мясных, рыбных, мучных изделий, примесей в молоке. С ее помощью удается определить степень родства различных видов животных и растений.

Недостаток реакции кольцепреципитации – нестойкость преципитата (кольца), который исчезает даже при легком встряхивании. Кроме того, с ее помощью нельзя определить качественный состав антигенов, участвующих в формировании преципитата.

Реакция преципитации Оухтерлони. Так как реакцию Оухтерлони ставят на чашках Петри в лунках пластинчатого агара, то ее также называют реакцией преципитации в агаровом геле (РПГ). При этом исследуемые и известные антигены вносятся в одни противостоящие лунки, а иммунные и нормальные сыворотки – в другие, после чего РПГ помещают на 24–48–72 ч в термостат. Диффундируя в агар навстречу друг другу, антитела и антигены при положительной реакции образуют иммунные комплексы, визуально обнаруживаемые в виде белых полос между лунками (рис. 74, *б*). В различных модификациях реакция Оухтерлони используется в диагностике вирусных и бактериальных заболеваний.

Реакция нейтрализации токсина антитоксином в агаровом геле. Эта издавна используемая РП, предложен-

ная для определения токсигенности коринебактерий дифтерии, ставится на фосфатно-пептонном агаре в чашке Петри. По ее диаметру помещают полоску стерильной фильтровальной бумаги, смоченную антитоксической сывороткой. После всасывания сыворотки на расстоянии 1 см от края полоски бляшками диаметром 10 мм подсевают выделенные культуры. В одной чашке можно засеять от 3 до 10 культур, одна из которых, контрольная, должна быть заведомо токсигенной. Посевы помещают в термостат. Учет реакций проводят через 24–48–72 ч. Если культура токсигенная, на некотором расстоянии от полоски бумаги возникают линии преципитата, совпадающие с линиями преципитата контрольной культуры. Они имеют вид «стрел-усиков», которые хорошо видны в проходящем свете (рис. 75).

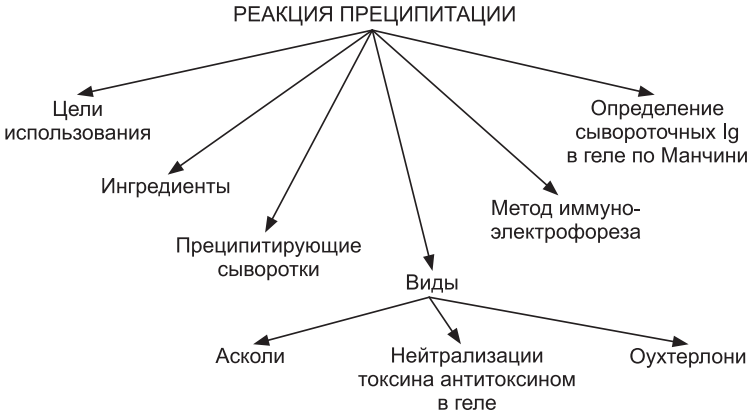
Рис. 75. Реакция нейтрализации экзотоксина коринебактерий дифтерии в агаровом геле

Метод иммуноэлектрофореза. С помощью этого метода можно провести более тонкий анализ антигенной структуры бактерий, белков, тканей, идентифицировать антигены в многокомпонентной системе.

В основе метода лежит электрофорез антигенов в геле с последующей их преципитацией иммунной сывороткой. Для постановки реакции иммуноэлектрофореза используют пластины из стекла, на которые нанесен слой агара. Помещенный в центре такой пластины антиген вначале разделяется в электрическом поле, а затем в канавку ага-

ра, идущую вдоль линии его разделения, добавляют иммунную сыворотку. Диффундируя навстречу друг другу, антигены и антитела в месте их встречи образуют дуги преципитации.

Определение содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови человека методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини. Содержание иммуноглобулинов по Манчини определяется в свежеполученной сыворотке, предварительно отцентрифугированной при 2000 об/мин, и параллельно в контрольной, последовательно разводимой вдвое пятикратно методом переката. Ту и другую вносят в лунки *ex tempore* приготовленных пластинок 1,5 %-ного агара Дифко на веронал-мединаловом буфере, содержащего половинную концентрацию рабочего титра моноспецифических сывороток, растворенных в том же буфере. Поместив планшеты с исследуемой сывороткой в эксикаторы, их ставят для определения концентрации IgG и IgA на 14–18 ч в холодильник (+ 4 °С), а для выявления IgM – на то же время в термостат (+37 °С). Далее с помощью стереоскопического микроскопа подсчитывают и измеряют диаметр преципитационных колец. Уровень иммуноглобулинов исследуемой сыворотки определяют, пользуясь графиком на логарифмической бумаге или на компьютере, который отражает их концентрацию в контрольных сыворотках здоровых людей.



Граф 60

Реакция гемолиза

При постановке реакции гемолиза используют бараньи эритроциты, гемолитическую сыворотку, содержащую специфические к ним гемолизины, и комплемент. Протекает она в две фазы: в первой из них эритроциты взаимодействуют с гемолизинами сыворотки, во второй – сенсибилизированные лизинами эритроциты растворяются под действием комплемента.

Гемолиз происходит при наличии строго определенного соотношения используемых в реакции ингредиентов (табл. 8).

Бараньи эритроциты для реакции гемолиза получают в день ее постановки. Кровь дефибринируют во флаконе со стеклянными бусами, далее готовят 3 %-ную взвесь, отмывая эритроциты изотоническим раствором натрия хлорида при центрифугировании.

Гемолитическую сыворотку готовят в производственных институтах, вводя кроликам парентерально 3–4 раза по 2–5 мл 50 %-ной взвеси бараньих эритроцитов. Для реакции гемолиза пригодна сыворотка с титром не ниже 1 : 1200, но в опыт берется в тройном титре, т. е. если титр гемолитической сыворотки равен 1 : 1200, то используют титр 1 : 400. Титром гемолитической сыворотки называют ее максимальное разведение, которое в присутствии комплемента при 37 °С вызывает полный гемолиз бараньих эритроцитов в течение 1 ч.

В качестве комплемента применяют сыворотку крови морских свинок, точнее, производственный сухой комплемент, который при правильном хранении не теряет своей активности 1–2 года.

Таблица 8. **Схема постановки реакции гемолиза**

Ингредиенты, мл	Номер пробирки			
	1 (опыт)	2 (контроль комплемента)	3 (контроль гемолитической сыворотки)	4 (контроль эритроцитов)
Гемолитическая сыворотка	0,5	0,5	–	–
Взвесь эритроцитов барана	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент, разведенный 1 : 10	0,5	–	0,5	–
Изотонический раствор натрия хлорида	–	0,5	0,5	1,0

Учет реакции производят через 1 ч после инкубации пробирок в термостате при температуре 37 °С.

Реакцию гемолиза используют для определения количества комплемента в сыворотке крови людей, но чаще – как индикатор в реакции связывания комплемента.

Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК) – сложная двухэтапная реакция, в которой используются пять ингредиентов, составляющих две системы: антиген, антитело и комплемент (первая система), эритроциты барана, сенсибилизированные (обработанные) гемолитической сывороткой, содержащие специфические к ним антитела (вторая, или гемолитическая индикаторная система). При этом взаимодействие антитела с антигеном на первом этапе реакции приводит к образованию иммунного комплекса, что сопровождается активацией (адсорбцией) на нем комплемента, но визуально обнаружить это невозможно. Ввиду этого Дж. Борде и О. Жангу предложили на втором этапе постановки реакции в качестве индикатора фиксации комплемента на комплексе антиген–антитело использовать гемолитическую систему, которая, являясь иммунным комплексом, тоже способна связывать его. В конечном итоге возможны два результата реакции. Если антитело и антиген соответствуют друг другу и комплемент связывается образовавшимся комплексом, гемолиза эритроцитов гемолитической системы не произойдет. При несоответствии антитела антигену комплемент, оставаясь свободным, присоединится к гемолитической системе и вызовет гемолиз (рис. 76).

Как и другие серологические реакции, РСК может быть использована для выявления специфических антител по известному антигену или для определения антигена по известным антителам.

Накануне постановки РСК исследуемая сыворотка прогревается на водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин для инактивации в ней собственного комплемента, а затем разводится, начиная с 1 : 5. Антигеном для РСК могут быть культуры убитых бактерий, их лизаты, экстракты из патологически измененных и нормальных органов, тканевые липиды, вирусы и вируссодержащие материалы. Су-

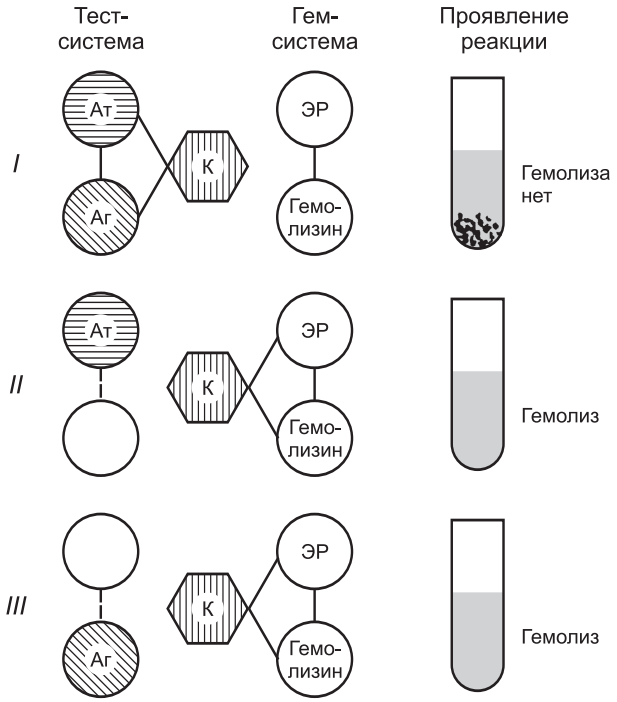


Рис. 76. Реакция связывания комплемента:
I – положительная, II, III – отрицательные; Ат – антитело; Аг – антиген; К – комплемент; Эр – эритроциты барана

хой комплемент или свежая сыворотка морской свинки перед титрованием разводятся 1 : 10. Гемолитическая система, или смесь равных объемов гемолитической сыворотки в тройном титре и 3 %-ной взвеси бараньих эритроцитов (по осадку) для сенсибилизации эритроцитов выдерживается в термостате при температуре 37 °С в течение 30 мин.

Перед постановкой РСК комплемент и антиген титруются. Необходимость в титровании комплемента диктуется тем, что его содержание в крови морских свинок непостоянно. Для этого основной раствор комплемента (1 : 10) разливают в ряд пробирок от 0,05 до 0,5 мл и в каждую из них прибавляют 0,85 %-ный раствор натрия хлорида, доводя объем до 1,5 мл. Пробирки ставят в термостат при

температуре 37 °С на 45 мин, после чего к ним добавляют гемолитическую систему и вновь инкубируют в термостате 30 мин. Затем определяют титр комплемента – его наименьшее количество, вызывающее гемолиз (табл. 9).

Таблица. 9. **Схема титрования комплемента**

Ингредиенты, мл	Номер пробирки											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Контроль	
											11	12
Комплемент в разведении 1 : 10	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	-
0,85 %-ный раствор натрия хлорида	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5
В термостат при температуре 37 °С на 45 мин												
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
В термостат при температуре 37 °С на 30 мин												
Результаты	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

Если, например, он будет составлять 0,25 мл, то в РСК вводят рабочую дозу комплемента, которая на 20–30% выше титра, т. е. используют следующую дозу (0,3 мл), вызвавшую полный лизис эритроцитов, доводя ее до 0,5 мл изотоническим раствором натрия хлорида.

Необходимость в титровании антигена, используемого в РСК, связана с тем, что он может адсорбировать некоторое количество комплемента, т. е. обладать антикомплементарными свойствами. Для определения титра антигена его разливают в ряд пробирок в уменьшающихся дозах от 0,5 до 0,05 мл и добавляют 0,85 %-ный раствор натрия хлорида, доводя объем жидкости до 1 мл. Затем в каждую пробирку доливают по 0,5 мл рабочей дозы комплемента и помещают их в термостат на 1 ч при температуре 37 °С. После этого во все пробирки прибавляют по 1 мл гемолитической системы, вновь инкубируют в термостате 1 ч и учитывают результаты (табл. 10).

Таблица 10. **Схема титрования антигена**

Ингредиенты, мл	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6
Антиген основного разведения	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
Раствор натрия хлорида 0,85 %-ный	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0,95
Комплемент в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
В термостат при 37 °С на 1 ч						
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
В термостат при 37 °С на 1 ч						

Титром антигена считается его наименьшая доза, при которой наступает полный гемолиз. В РСК используют рабочую дозу антигена, составляющую примерно 1/2–2/3 титра. Если титр комплемента в присутствии антигена снижается более чем на 30 %, то он непригоден для реакции.

Оттитровав комплемент и антиген, ставят основной опыт РСК (табл. 11).

Таблица 11. **Схема постановки реакции связывания комплемента**

Номер системы	Ингредиенты реакции, мл	Номер пробирки		
		1 (опытная)	2 (контроль сыворотки)	3 (контроль антигена)
Первая	Исследуемая сыворотка, разведенная 1:5	0,5	0,5	–
	Антиген в рабочей дозе	0,5	–	0,5
	Комплемент в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5
	Раствор натрия хлорида 0,85 %-ный	–	0,5	0,5
В термостат при 37 °С на 1 ч				
Вторая	Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0
В термостат при 37 °С на 1 ч				

Для этого берут три пробирки, в каждую вносят по 0,5 мл соответствующих ингредиентов. На начальном эта-

пе в первую (опытную) наливают все три компонента РСК – сыворотку, антиген, комплемент; во вторую – сыворотку, комплемент, а вместо антигена – изотонический раствор натрия хлорида (контроль сыворотки); в третью – антиген, комплемент, а вместо сыворотки – тот же раствор натрия хлорида (контроль антигена). Пробирки ставят в термостат при температуре 37 °С на 1 ч. На втором этапе реакции в каждую пробирку вносят гемолитическую систему, и после перемешивания пробирки вновь помещают в термостат на то же время, а затем учитывают результаты РСК.

Интенсивность реакции отмечается плюсами: «++++» – полная задержка гемолиза, жидкость в пробирке бесцветна, все эритроциты оседают на дно (резкоположительная РСК); «+++», «++» – слабый гемолиз, уменьшенное количество эритроцитов в осадке (положительные РСК); «+» – выраженный гемолиз, жидкость окрашена в розовый цвет, незначительное количество эритроцитов в осадке (слабоположительная РСК). Отрицательная РСК отмечается минусом: «–». При этом наблюдается полный гемолиз, жидкость в пробирке имеет цвет артериальной, или «лаковой» крови.

Чувствительность РСК повышается, если связывание комплемента проводить на холоде при температуре 4 °С в течение 18–20 ч. В такой модификации РСК широко применяется в диагностике вирусных инфекционных болезней. Антигены из высоковирулентных вирусов инактивируют добавлением слабых концентраций формалина (1 : 500 – 1 : 1000) или УФ-облучением.

Несмотря на сложность постановки РСК нашла широкое применение в диагностике хронической формы гонореи, коклюша, актиномикоза, всех риккетсиозов и вирусных инфекций.

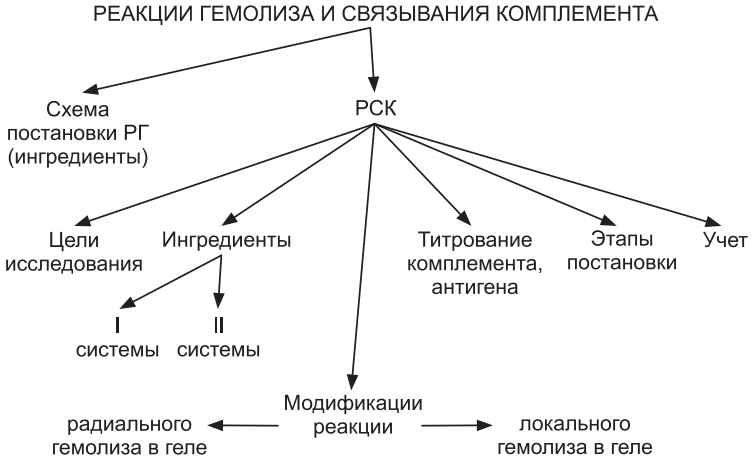
Модификации РСК

Основными модификациями РСК являются реакции радиального и локального гемолиза в агаровом геле.

Реакция радиального гемолиза в геле. Реакция ставится в чашках Петри, в которые вносится агаровый гель, содержащий комплемент и эритроциты барана. После застывания агара в пластинке делают лунки, которые заполняются специфической гемолитической сывороткой. Реакцию учи-

тывают по зонам гемолиза, образующимся вокруг лунок. Размеры их будут варьировать в зависимости от титра антител в исследуемой сыворотке. При использовании реакции радиального гемолиза в диагностике инфекционных болезней эритроциты барана «нагружают» специфическими антигенами, а в агаровые лунки вносят сыворотку больных.

Реакция локального гемолиза в геле. Используя данную реакцию, в агаровый гель вносят эритроциты барана и суспензию антителопродуцирующих клеток, после чего наслаивают на питательную среду комплемент. Результаты учитывают по образованию зон гемолиза вокруг отдельных плазмоцитов, секретирующих антитела к эритроцитам барана. Метод дает возможность установить наличие антителообразующих клеток в разных органах и тканях иммунной системы при воздействии на организм антигенов и иммуномодуляторов.



Граф 61

Реакции с использованием меченых антител

Мечеными называются антитела, связанные с индифферентными для них веществами, которые, не изменяя их специфичности и антигенной структуры, придают иммуноглобулинам характерные свойства, что облегчает идентификацию антигенов в иммунных комплексах.

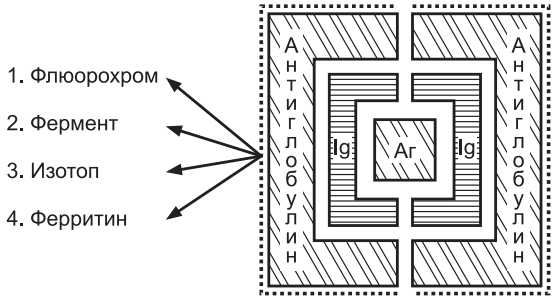


Рис. 77. Серологические реакции с использованием меченых антител:
Ag – антиген; Ig – иммунная сыворотка

Наибольшее распространение как «метки» получили: 1) флюорохромы, в частности флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) – в реакциях иммунофлюоресценции (РИФ) и антикомплементарной РИФ; 2) железосодержащий белок ферритин – в иммуноэлектронной микроскопии вирусов и бактерий (иммуноферритиновая реакция); 3) ферменты (чаще пероксидаза) – для проведения иммуноферментного анализа (ИФА); 4) радиоактивные изотопы (^{125}J) – для радиоиммунного анализа. При этом в данных реакциях вместо антител метятся также антигены (рис. 77).

Серологические реакции с использованием меченых антител прочно вошли в практику экспресс-диагностики вирусных и бактериальных инфекций, широко используются в идентификации и дифференциации антигенов микробного, животного и растительного происхождения.

Реакции иммунофлюоресценции

Имеются два варианта постановки РИФ (реакции Кунса) – прямая и непрямая реакции иммунофлюоресценции.

Прямая РИФ – простая одноэтапная реакция, но так как для ее выполнения требуется наличие большого количества меченых антимикробных сывороток, то ставится она реже непрямой, постановка которой обеспечивается одной меченой антисывороткой.

Непрямая РИФ – двухэтапная реакция, в которой антиген вначале связывают немеченой видовой сывороткой, а затем образованный иммунный комплекс антиген–анти-

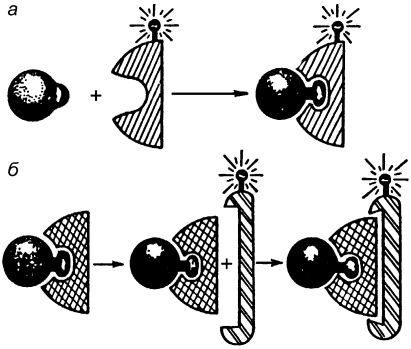
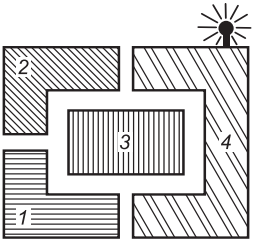


Рис. 78. Реакция Кунса:
а – прямая; *б* – непрямая

тело обрабатывают меченной ФИТЦ антисывороткой, содержащей антитела против иммуноглобулина этого комплекса. Обычно на I этапе ее постановки в качестве видовой сыворотки используют иммунную кроличью сыворотку, полученную путем иммунизации животных соответствующим микроорганизмом, а на втором – меченную ФИТЦ антикроличью сыворотку ослов или других животных, иммунизированных гамма-глобулинами кролика (рис. 78).

Постановка прямой РИФ. На обезжиренном предметном стекле из исследуемого материала делают тонкие мазки, а из органов и тканей – мазки-отпечатки. Препараты высушивают, фиксируют, наносят на них люминесцирующую сыворотку, взятую в рабочем разведении, и помещают во влажную камеру при температуре 37 °С на 20–30 мин (на 25–40 мин – при комнатной температуре). Затем для удаления избытка флюоресцирующих антител препарат промывают в забуференном изотоническом растворе хлорида натрия в течение 10–15 мин с последующим ополаскиванием в дистиллированной или проточной воде в течение 10 мин. Сушат препарат при комнатной температуре и исследуют под люминесцентным микроскопом с использованием масляной иммерсионной системы. Для оценки интенсивности специфической флюоресценции бактериальных клеток используется четырехплюсовая шкала: «++++» и «+++» – очень яркая и яркая, «++» и «+» – выраженная и слабая ободочная зеленая флюоресценция клеток. Обязательными являются три контроля: 1) обра-

Рис. 79. Антикомплементарная реакция иммунофлюоресценции:
1 – антитело; *2* – антиген; *3* – комплемент; *4* – антикомплементарная сыворотка, меченная ФИТЦ



ботка флюоресцирующими антителами гомологичных бактерий (положительный контроль); 2) гетерологичной культуры (отрицательный); 3) незараженного материала (отрицательный).

Антикомплементарная РИФ. Реакция является модификацией РСК, индикаторной системой в которой служат антикомплементарные антитела, меченные ФИТЦ (рис. 79).

Непрямая антикомплементарная РИФ ставится следующим образом. Препарат-антиген готовится на предметном стекле, как для РИФ, но на I этапе обрабатывается не одной иммунной сывороткой, а ее смесью с комплементом морской свинки, а на II – антисывороткой, содержащей меченные ФИТЦ антитела к комплементу. Широкое использование антикомплементарной РИФ ограничено трудностью получения антикомплементарных антител и способа их мечения.

Иммуноферментный анализ

ИФА основан на обнаружении иммунного комплекса, один из компонентов которого (антитело или антиген) мечен ферментом, способным разлагать субстрат (хромоген) с образованием окрашенных продуктов.

В настоящее время используется только твердофазная модификация ИФА, при которой антитела или антигены сорбируются в лунках полистироловых планшет (на твердой фазе). В большинстве случаев к твердой фазе присоединяются антитела, которые при инкубации с материалом улавливают специфический антиген в ближайшие 30 мин. К образовавшемуся при этом иммунному комплексу затем на те же 30 мин прибавляются меченные пероксидазой ан-

титела, специфические то ли к его антигену, то ли к его антителу. В результате образуется иммунопероксидазный тройной комплекс, при добавлении к которому ортофенилендиамина с H_2O_2 как хромогенного субстрата для пероксидазы через 10 мин происходит пожелтение. Результаты твердофазной модификации ИФА учитываются с помощью специального спектрофотометра.

Иммуноблотинг

В основе иммуноблотинга (*blot* – пятно) лежит идентификация антигенов и антител на пленке-носителе с помощью ИФА. Его используют, например, в диагностике ВИЧ-инфекции, разделяя белки вируса иммунодефицита человека методом электрофореза в полиакриловом геле. Затем на полосы преципитата в геле накладывают нитроцеллюлозную пленку и, продолжая электрофорез, переносят их на нее. Затем пленку смачивают исследуемой сывороткой, а после инкубирования и отмывания от несвязавшихся антител наносят на нее меченую пероксидазой антисыворотку к Ig человека и ортофенилендиамин как хромогенный субстрат. При образовании комплексов Аг+Ат+антисыворотка на пленке появляются окрашенные пятна.

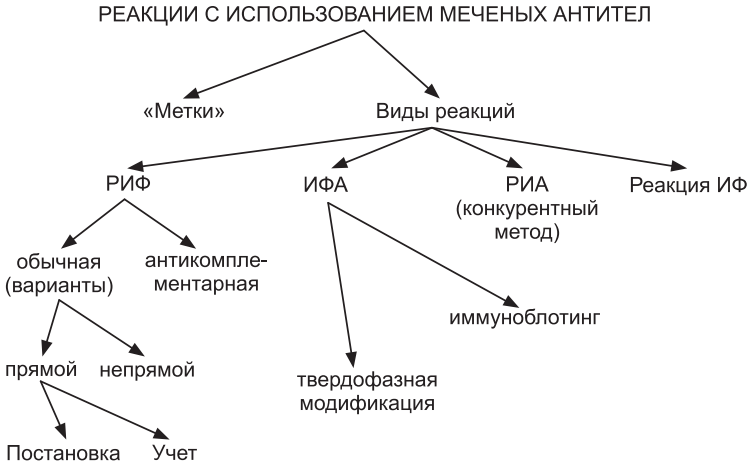
Радиоиммунный анализ

Для проведения РИА антитела или антигены метят радиоактивными изотопами, и в зависимости от метода и целей исследования те или другие сорбируются на твердом носителе. Так, при *конкурентном методе РИА* в лунках полистироловых планшет сорбируются антитела. Затем к этим иммобилизованным антителам прибавляется исследуемый материал, содержащий специфический к ним антиген. После образования иммунного комплекса, добавляют меченый ^{125}J антиген, обладающий той же специфичностью к иммобилизованным в лунках антителам. Внесенный меченый антиген будет реагировать лишь с той частью активных центров иммобилизованных антител, которые остались незаблокированными антигеном исследуемого материала. В сравнении с контролем расход меченого антигена будет тем меньше, чем больше заблокирова-

ны иммобилизованные антитела, на что укажет радиоактивность жидкой части реагируемой смеси. Для этого, естественно, необходима специальная радиометрическая аппаратура.

Иммуноферритиновая реакция

Иммуноферритиновая реакция применяется чаще всего в вирусологии. Соединяясь с антителами, меченными ферритином, вирусы становятся электронно-плотными и легче выявляются при электронной микроскопии.



Граф 62

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Экологическая иммунология изучает влияние антропогенных факторов на иммунную систему человека, прежде всего, химических веществ и радионуклидов, обладающих высокой биологической активностью.

Влияние химических веществ на иммунореактивность. В настоящее время химическая промышленность синтезирует более 10 млн соединений, из них – 20 000 биологически активных веществ и агентов, способных вызывать не только токсикозы, но в целом ряде случаев оказы-

вать также неблагоприятное влияние на иммунную систему, которая является одной из наиболее чувствительных систем человека.

Основными химическими загрязнителями являются диоксид серы и оксиды азота, ядохимикаты и соли тяжелых металлов. По токсичности загрязнителем номер один считают *оксиды серы и азота (*NO*x),* на основе которых в атмосферной влаге образуются серная, сернистая и азотная кислоты. На 1 га площади Европы каждый год с кислотными дождями выпадает 30–60 кг серы и 15–30 кг азота. В Москве и Санкт-Петербурге ежегодно на 1 км^2 рассеивается 1500 кг серы, а с учетом всей территории России – 4 млн т серы и 1,25 млн т нитратного азота. Прямого действия на людей кислотные дожди не оказывают, а газообразные оксиды серы и азота вызывают у них слезотечение, кашель, конъюнктивиты, бронхиты, астму и другие соматические болезни, которым сопутствуют скоропреходящие вторичные иммунодефициты.

Более вредное действие на иммунореактивность человека оказывают ядохимикаты. В конце 80-х гг. их было произведено в общей сложности 3,2 млн т, т. е. примерно 0,6 кг на каждого жителя планеты. По данным ВОЗ, ежегодно с отравлениями ядохимикатами за врачебной помощью обращается от 0,5 до 2 млн человек (тысячи погибают от токсикоза). По химической структуре и механизму действия они весьма разнообразны. Общим для них является высокая биологическая активность, позволяющая проникать в организм человека различными путями, легко преодолевать иммунологические барьеры и разрушать иммунокомпетентные клетки.

Проиллюстрируем это на 2,3,7,8-тетрахлордибензол-n-диоксине (диоксине) и полихлорированных бифенилах, обладающих высокой степенью генотоксического и иммунодепрессивного действия.

Диоксин является сверхтоксическим соединением. Он относится к классу полихлорированных дибензодиоксинов. Время распада диоксина в почве 10–20 лет, а в человеческом организме – не менее нескольких месяцев. Он образуется при производстве, обработке и сжигании любых хлорированных углеводородов. Впервые был использован в джунглях во время войны во Вьетнаме как дефолиант, полностью оголявший местность от тропической рас-

тительности. Попав в самых малых количествах в организм американских солдат, применявших его в препарате «оранж», диоксин вызывал такую высокую степень подавления иммунной системы, как никакой другой современный иммунодепрессант. На этом фоне возникает тяжело протекающее хлоракне – дерматит лица, рецидивирующее воспаление сальных желез, часто с поражением внутренних органов. Количество диоксина, которое человек может получить из внешней среды без угрозы здоровью, составляет не более 1–10 пикограмм на 1 кг веса.

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) вызывают болезнь Юшо, характеризующуюся у взрослых потемнением кожи с поражением внутренних органов и рождением темнокожих детей. К настоящему времени синтезировано около 1 млн т ПХБ. Используются они в разных отраслях промышленности, но в особенности – в электротехнической.

Большинство ядохимикатов являются аллергенами, некоторые – вызывают моноклональную гаммапатию. Доброкачественная ее форма является обратимой, а злокачественная – сопровождается множественной миеломой. У пожилых и хронически больных людей они провоцируют вторичные иммунодефицитные состояния. Так, фосфорорганические соединения резко уменьшают количество Т-хелперов и Т-супрессоров, а хлорорганические – ингибируют В-лимфоциты.

Не уступают ядохимикатам по токсичности *соли тяжелых металлов* с удельным весом более 8 г/см^3. Ежегодно в атмосферу и почву при плавке руд в домнах, например, стало попадать около 250 млн т цинка, 210 млн – меди, 100 млн – свинца, 45 млн – кадмия, более 20 млн – ртути, а с учетом никеля, кобальта, сурьмы, висмута, олова, ванадия, хрома и марганца – около 800 млн т. Все они, подобно радиоактивным элементам, накапливаются в органах и тканях человека и животных, вызывая иммунодефицитные состояния. Среди них лучше всего изучены сатурнизм, болезнь Минамато, Итай-итай.

Сатурнизм – хроническое отравление свинцом, проявляющееся быстрой утомляемостью, бледностью, нервозностью, образованием «свинцовой» каймы на деснах, постепенно развивающимся слабоумием. К сатурнизму может приводить употребление растительных продуктов, накапливающих большое количество свинца. В частнос-

ти, особенно много его поглощают плодоовощные культуры, которые выращиваются на землях вдоль транспортных магистралей, где в окружающую среду с выхлопными газами автомобилей ежегодно поступают около 400 тыс. т свинца.

Болезнь Минамато – быстро развивающееся заболевание с поражением центральной нервной системы, сопровождающееся парезами и параличами, слепотой и слабоумием. Первые случаи ее возникновения были отмечены в 1956 г. в бухте Минамато на юге Японии. Причиной этого заболевания явилось употребление в пищу крабов и рыбы, аккумулировавших высокие концентрации метилртути, которая поступала со стоками фабрики по производству азотных соединений. Всего заболело 292 человека, 62 из которых умерли. Повторная массовая вспышка болезни Минамато была отмечена в Ираке, население которого использовало для выпечки хлеба закупленное у Мексики для посева протравленное метилртутью зерно. В результате отравились 6 530 и погибли 495 человек. Основными источниками солей ртути являются сульфидные руды.

Итай-итай – болезнь, связанная с хроническим отравлением кадмием. Впервые описана в 1940-х гг. в Японии. Характеризуется сильными болями, деформацией скелета, переломами костей, поражением почек. Выброс кадмия в окружающую среду связан с производством цветных металлов и сжиганием твердых кадмийсодержащих отходов.

Особое место в экологической иммунологии занимают хлорфторуглероды (ХФУ), в частности *фреон*. Безвредные для людей ХФУ оказывают на иммунную систему человека опосредованное действие, разрушая озонный экран Земли, защищающий все живое от жестких УФ-лучей, гамма- и рентген-излучений. При этом каждый потерянный грамм озона в масштабах планеты сопровождается возникновением 150 тыс. случаев слепоты из-за катаракты и на 2,6% увеличивает частоту рака кожи. Учитывая это, в 1996 г. промышленно развитые государства прекратили производство фреонов, галлонов и тетрахлорида углерода. Развивающиеся страны намерены приобщиться к ним только в 2010 г.

Иммунодефициты, вызванные действием ионизирующей радиации. В отличие от химических соединений, ионизирующие лучи вызывают стойкие и иногда необрати-

мые вторичные иммунодефициты. Развиваются они почти немедленно вслед за облучением, в результате того, что ионизирующая радиация обладает избирательным действием на иммуноциты. При этом клетки, находящиеся в стадии деления, погибают в результате некроза, а покоящиеся – вследствие развития апоптоза. Наиболее чувствительны к ионизирующему облучению Т- и В-лимфоциты на стадиях осуществления селекции, погибая в этот период, как и покоящиеся клетки, от апоптоза.

Радиационное повреждение иммуноцитов отмечается, начиная с дозы 1 Грей (Гр). После действия радиации дозой 4–6 Гр они погибают в течение 3–4 сут, правда, NK-клетки более устойчивы, чем Т-хелперы и Т-киллеры, а последние – чем Т-супрессоры и В-клетки.

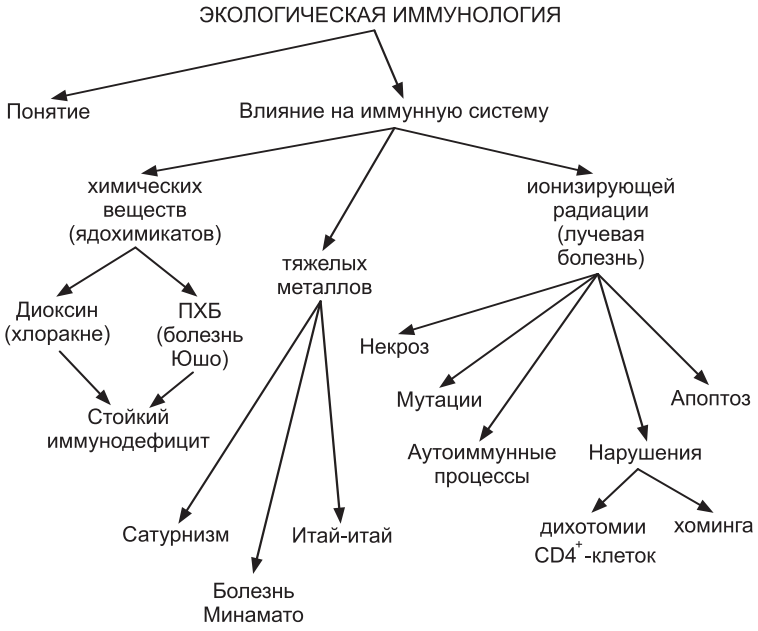
Сильно сказывается радиационное облучение на процессе дихотомии $CD4^+$-клеток, они чаще дифференцируются в Т-хелперы клеточного ответа (Тх1). Может быть, это происходит потому, что реакции гуморального иммунного ответа оказываются более радиочувствительными, чем клеточного ответа. Радиоустойчивость иммуноцитов возрастает вскоре после их активации антигенами или митогенами и особенно сильно – по завершении фазы пролиферации. Интересно, что у лимфоцитов, переживших облучение, снижается способность взаимодействовать с антигенами и возвращаться в процессе рециркуляции в лимфатические узлы и групповые лимфатические фолликулы, т. е. нарушается присущий им хоминг («домашний инстинкт»).

В период прогрессирующего опустошения иммунной системы, вызванного ионизирующей радиацией, в организме включаются восстановительные процессы. Нормализация численности клеток иммунной системы, однако, происходит с явным запаздыванием восстановления утраченных ими функций. Так, число лимфоцитов у мышей после облучения их дозами 4–5 Гр нормализуется через 2 мес., а способность к образованию антител при иммунизации тимусзависимым антигеном остается сниженной даже через 6 мес. В поздние сроки после облучения часто на фоне иммунодефицита развиваются аутоиммунные процессы. Полагают, что причиной накопления аутоантител является ослабление супрессорного звена иммунной системы. В пострадиационном периоде в организме могут

накапливаться радионуклиды. Инкорпорирование их в различных органах и тканях вызывает еще более тяжелые иммунодефициты, чем те, которые индуцируются внешним облучением. Нужно также иметь в виду и стрессорный эффект радиации, во многом аналогичный иммунотропному действию облучения.

Очень большие дозы радиации с перечисленными сдвигами в иммунной системе, которые человек получает вблизи эпицентра ядерного взрыва, подобного произошедшему на Чернобыльской АЭС, смертельно опасны, так как вызывают тяжелейшие поражения органов и тканей, а повышенные, вдали от него, – индуцируют лучевую болезнь, рак и генетические дефекты. Так, при облучении дозами, которые превышают десятки кЗв, наступает коллапс, кома и смерть в течение 1–2 ч, а при облучении 1–10 кЗв – через 1–2 дня. Дозы 2–10 Зв вызывают лучевую болезнь. Самая ее тяжелая форма развивается при облучении дозами 6–10 Зв. Она заканчивается смертью от кишечного кровотечения в первые 3–12 дней. Дозы 4–6 Зв вызывают тяжелую форму лучевой болезни с летальным исходом у 50 % людей в течение 1–2 мес., в основном от поражения костного мозга. Лучевая болезнь средней тяжести без летального исхода возникает при дозах от 4 до 2 Зв.

Следует отметить, что непосредственной причиной перечисленных выше болезней цивилизации, порожденных научно-технической революцией, является всевозрастающее загрязнение окружающей среды, приводящее к распаду генома человека вследствие накопления распадных мутаций в его генофонде (*genos* – рождающий, *fond* – основание), под которым понимают сумму генов (геномов) особей человеческой популяции. До определенного порога распадных мутаций человек сохраняет ту же конкурентоспособность, что и люди с меньшим числом распадных мутаций. Накопление мутаций у человека ниже порога чувствительности приводит к увеличению генетического груза, который сейчас в группе людей до 20 лет повсеместно составляет около 15 %, а с учетом наследственных болезней, которые провоцируются в процессе жизни антропогенными факторами и проявляются во всех возрастных группах, он, по данным венгерских генетиков, может в некоторых регионах утраиваться.


ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ
Понятие
Влияние на иммунную систему
химических веществ (ядохимикатов)
тяжелых металлов
ионизирующей радиации (лучевая болезнь)
Диоксин (хлоракне)
ПХБ (болезнь Юшо)
Стойкий иммунодефицит
Сатурнизм
Итай-итай
Болезнь Минамато
Некроз
Мутации
Аутоиммунные процессы
Нарушения
Апоптоз
дихотомии CD4+-клеток
хоминга

Граф 63

РАЗДЕЛ II
МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Пиогенные кокки

Таксономия. Для человека болезнетворными являются четыре рода пиогенных (гноеродных) кокков: *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria* и *Peptostreptococcus,* включающий анаэробные виды стрептококков, которые иногда выделяются из гангренозных ран и крови при сепсисе.

Род стафилококков по наличию коагулазы подразделяют на две группы – коагулазоположительные (*S. aureus*) и коагулазоотрицательные (*S. epidermidis* и *S. saprophyticus*).

S. aureus отличается от родственных ему эпидермальных и сапрофитических видов стафилококков образованием золотистого (*aureum*) пигмента, а главное – более высокой вирулентностью из-за наличия у него адгезинов, взаимодействующих с муцином слизистых оболочек и протеогликанами соединительной ткани, и мембранотоксинов, разрушающих эритроциты, клетки крови и тканей. Другими по значимости факторами вирулентности у *S. aureus* являются капсула и аллергены.

Стрептококки классифицируются по структуре С-полисахаридов в клеточной стенке на 17 групп, обозначаемых латинскими заглавными буквами от А до О. Внутри каждой из них выделяют серовары, отличающиеся М-, Р- и Т-антигенами. При этом заболевания у людей вызывают преимущественно стрептококки группы А, главным обра-

зом *S. pyogenes,* основными факторами вирулентности которого являются белок М, ингибирующий фагоцитарную реакцию и маскирующий его рецепторы к комплементу и антителам, и β-гемолизин, вызывающий ярко выраженный гемолиз крови. Не имеющие групповых антигенов зеленящие стрептококки (*S. viridans*), продуцирующие α-гемолизин, пневмококк (*S. pneumoniae*), в составе которого насчитывают 84 серовара, энтерококки, или фекальные стрептококки (*S. faecalis, S. faecium*), обитающие в кишечнике человека, выделяют в отдельные группы.

Менингококки по группоспецифическим полисахаридам капсулы подразделяют на A, B, C, D, H, I, K, L, X, Y, Z, 29E и W135 серогруппы, внутри которых выделяют отдельные серовары.

Антигенная структура гонококков тоже неоднородна. По составу белков клеточной стенки у них различают 16 сероваров.

Стафилококки и стрептококки были выделены в последней четверти 19 в. Р. Кохом, Л. Пастером, Ф. Розенбахом, Т. Бильротом, гонококки – А. Нейссером, а менингококки – А. Вейксельбаумом.

Клинические проявления гнойных инфекций. Стафилококки и стрептококки, обладая биологическим политропизмом, вызывают воспалительные процессы кожи, подкожной клетчатки и слизистых оболочек (фурункулы, карбункулы, абсцессы, панарициии, маститы, конъюнктивиты, блефариты), костной системы (остеомиелиты), внутренних органов (пневмонии, аппендициты, пиелонефриты, холециститы), воспаление твердой мозговой оболочки (менингиты), брюшины (перитониты), а также сепсис. Они осложняют течение гриппа, кори и других инфекционных заболеваний, вызывают послеоперационные и послеродовые нагноения. Вместе с тем стрептококк является этиологическим фактором рожи, подострого септического эндокардита, возможно, скарлатины и ревматизма. У гонококков и менингококков органотропность выражена резче. Так, менингококковая инфекция чаще всего проявляется как менингококконосительство, или назофарингит, менингококкцемия, менингит, менингоэнцефалит. Гонококк вызывает гонорею и бленнорею у новорожденных, сопровождающиеся гнойными истечениями из уретры и конъюнктивы глаз (*gonos* – семя, *blennos* – слизь, *rheo* – теку).

Эпидемиология. Большинство заболеваний, вызываемых патогенными кокками, неконтагиозны. Менингококковая инфекция, скарлатина, рожа, гонорея распространяются эпидемически. Источники инфекции – здоровые носители и больные люди. Механизмы передачи разнообразны, но преобладает воздушно-капельный. Исключение составляет гонорея, передающаяся от больного человека при половом контакте. Восприимчивость людей к гнойным инфекциям неодинакова. Иммунитет отсутствует лишь к гонорее, в отношении других гнойных инфекций человек обладает высокой степенью резистентности.

Биологические особенности патогенных кокков. *Морфология.* Патогенные кокки имеют шаровидную (стафилококк), овальную (стрептококк) или бобовидную (менингококк и гонококк) форму. Размеры их варьируют в среднем от 0,6 до 1 мкм. В мазках из культур стафилококки располагаются преимущественно в виде гроздей винограда, стрептококки – цепочками (ланцетивидный пневмококк – парами), менингококки и гонококки – попарно или тетрадами, в которых вогнутые стороны обращены внутрь. В препаратах, приготовленных из гноя, стафилококки и стрептококки относительно нейтрофилов располагаются обычно внеклеточно, а менингококки и гонококки – преимущественно интрацеллюлярно (эндоцитобиоз). Патогенные кокки формируют капсулу, наиболее выраженную у *S. pneumoniae* и менингококков. Спор и жгутиков не имеют (исключение составляют энтерококки). По Граму стафилококки и стрептококки окрашиваются положительно, менингококки и гонококки – отрицательно.

Условия культивирования. Патогенные кокки – факультативные анаэробы. Облигатными анаэробами являются пептострептококки и некоторые разновидности золотистого стафилококка. Оптимальной температурой роста для них является 37 °С, а pH среды – 7,2–7,6. Для культивирования стафилококка используются простые среды, остальные патогенные кокки выращиваются на МПБ и МПА, к которым прибавляются глюкоза, сыворотка, асцитическая жидкость, кровь.

Чистая культура стафилококков вырастает уже через сутки после посева. Стрептококки и нейссерии растут медленно, и полный цикл развития у них завершается чаще всего к концу 2–3 сут. На пластинчатом агаре колонии

стафилококков круглые, выпуклые, с ровными краями, диаметром 1–4 мм, пигментированы в золотистый (*S. aureus*), белый (*S. epidermidis*), лимонно-желтый (*S. saprophyticus*) цвета. Пигменты стафилококка быстро образуются при хорошей аэрации на свету. На кровяном агаре вокруг колоний золотистого стафилококка образуется зона гемолиза.

Стрептококки на сахарном, сывороточном, асцитическом питательных агарах дают мелкие (до 1 мм) мутные серовато-белые или бесцветные колонии; на кровяном агаре они у вирулентных стрептококков окружены четко выраженной прозрачной зоной гемолиза (β-гемолитические варианты) или узкой мутно-зеленоватой каймой (α-гемолитические стрептококки). Невирулентный *S. anhaemolyticus* гемолиза не вызывает.

Менингококки и гонококки формируют на излюбленных для них средах точечные бесцветные колонии-росинки.

Характер роста пиогенных кокков на жидких средах тоже отличается. Так, стафилококк и менингококк вызывают диффузное помутнение МПБ, иногда через 3–4 дня появляется пленка. Гонококк вызывает едва заметное помутнение бульона, а стрептококк совсем не изменяет его прозрачности, вырастая в виде зерен на стенках и дне пробирки.

Биохимические свойства. Грамположительные стафилококки и стрептококки обладают большим набором ферментов, чем грамотрицательные менингококки и гонококки. Они расщепляют все углеводы короткого ряда Гисса и свертывают молоко, а стафилококки, кроме того, разжижают желатин, образуют индол, аммиак, сероводород, восстанавливают нитраты в нитриты. Менингококки ферментируют глюкозу и мальтозу, гонококки – только глюкозу.

Токсины и факторы патогенности. Стафилококки и стрептококки продуцируют экзотоксины, обладающие свойствами лизировать эритроциты и оказывать цитотоксическое действие (α-, β-, γ- и δ-токсин у *S. aureus* и O-, S-стрептолизины – у стрептококков), разрушать фагоциты и нарушать водно-солевой баланс в клетках (лейкоцидины), вызывать некроз кожи (некротоксины) и смерть животных (летальные токсины). Штаммы стафилококка, поражающие кожные покровы у детей, выделяют эксфолиатины A и B, а вызывающие пищевые отравления – энтеротоксины A, B, C_{1-2}, D и E. Стрептококки скарлатинозных

больных продуцируют эритрогенные (пирогенные) токсины. Кроме экзотоксинов стафилококки и стрептококки образуют многие ферменты инвазивности (см. «Инфекция»).

Болезнетворные свойства менингококков и гонококков обусловлены эндотоксинами липополисахаридной природы, IgA-протеазами, расщепляющими IgA, белками и полисахаридами их оболочек и капсул.

Идентификация кокков. Видовую принадлежность патогенных кокков устанавливают по морфолого-культуральным и биохимическим свойствам. Нередко прибегают к исследованию вирулентности и токсигенности. Высоковирулентными для белых мышей являются стафилококки, стрептококки и особенно пневмококки, вызывающие сепсис. При внутрикожном введении кролику взвесей стафилококков и стрептококков возникает местная воспалительная реакция, часто с некрозом (дермонекротическая проба). Вирулентность стафилококка определяется также по наличию гемолизинов и α-токсина, плазмокоагулазы и других ферментов агрессивности. К менингококку и гонококку экспериментальные животные невосприимчивы. Выделенную культуру патогенных кокков необходимо исследовать на чувствительность к ряду антибиотиков. Особенно важно получить антибиотикограмму для стафилококков, среди которых часто встречаются штаммы не только с высокой антибиотикоустойчивостью, но и с полирезистентностью к различным сульфаниламидам. Фаготипировать можно только стафилококки. Для этого применяется типовой набор умеренных стафилококковых фагов. Серологический метод используется в диагностике гонореи (РСК) и менингококковых инфекций (РП и РНГА).

Особенности диагностики гонореи и бленнореи

Материалами исследования при гонорее являются отделяемое уретры, влагалища, шейки матки, предстательной железы, сперма и моча, а при бленнорее – отделяемое конъюнктивы глаза.

Гной из уретры у мужчин получают после обработки наружного отверстия мочеиспускательного канала ватным тампоном, смоченным стерильным изотоническим раствором натрия хлорида, надавливая пальцем на заднюю стенку уретры. Материал из шейки матки извлекают

тампоном с помощью зеркала Куско. Отделяемое конъюнктивы при бленнорее снимают ватным тампоном.

Мазки окрашивают щелочным раствором метиленового синего и по Граму. В гнойном содержимом мазка гонококки располагаются в нейтрофилах в виде бобовидных диплококков, количество которых может достигать многих десятков особей (см. рис. 57).

В связи с тем, что в исследуемом материале находится посторонняя микрофлора по морфологии сходная с гонококками, применяют прямую и непрямую РИФ. При прямом методе мазки обрабатывают флюоресцирующими антителами против гонококков. При непрямой РИФ используют сыворотку больного гонореей с последующим использованием флюоресцирующей антисыворотки человека.

Бактериологическое исследование проводят в тех случаях, когда гонококки в мазках не обнаруживают или находят нетипичные по размерам и форме особи в виде шаров и «пылинок», неодинаково красящихся по Граму (формы Аша). Ввиду быстрого отмирания гонококков вне организма больных содержащий его материал транспортировке не подлежит. Засевать его на среду желательно сразу же после взятия и не раньше 1–2 дней после прекращения лечения больных, так как терапия антибиотиками резко снижает его жизнеспособность. Обычно используется агаризованная среда, содержащая гидролизат казеина или дрожжевой аутолизат и нативную сыворотку крупного рогатого скота. Процент высеваемости гонококка повышается на асцит-агаре Бейли или 2,5 %-ном МПА, приготовленном на кроличьем мясе. Для подавления банальной микрофлоры к средам добавляют ристомицин и полимиксин М в дозах 10 ЕД/мл. Гонококки быстрее растут при помещении чашек Петри с посевами в эксикатор с 10 %-ным оксидом углерода. Через сутки инкубации при температуре 37 °С на поверхности среды вырастают колонии, напоминающие капельки росы (рис. 80). Об их принадлежности к гонококку судят по положительной оксидазной пробе – при нанесении 1 %-ного раствора хлористоводородного парадиэтилфенилендиамина они розовеют. Для выделения чистой культуры и определения антибиотикочувствительности колонии гонококка пересевают на скошенный сывороточный агар.

При хронической гонорее, когда прекращается гноевыделение, ставят РСК, РНГА с сывороткой крови больного. В

качестве антигена используют гонококковую вакцину или диагностикум, приготовленный из убитых гонококков.

Особенности диагностики менингококковых инфекций

Исследованию подлежат налет с задних дужек миндалин, спинномозговая жидкость и кровь больных.

Основным методом диагностики менингококковых инфекций является обнаружение в ликворе и слизи носоглотки бобовидных диплококков в цитоплазме лейкоцитов (см. рис. 57). Мазки из носоглотки и спинномозговой жидкости окрашивают водным раствором основного фуксина и метиленовым синим, реже – по Граму.

Слизь из носоглотки снимают специальным тампоном, изогнутым под углом. Ликвор получают интралюмбальной пункцией, кровь – венепункцией. Менингококки, как и гонококки, весьма чувствительны к колебаниям температуры, поэтому пересылаемые в лабораторию материалы заворачивают в вату с грелкой. Ликвор больных заливают сывороточным агаром или агаром с дефибринированной кровью лошади, быка или барана; слизь из носоглотки засевают на поверхность этих же сред; кровь больных в соотношении 1:10 – в сывороточный или асцитический бульон. Колонии менингококков – точечные, круглые, выпуклые, прозрачные (рис. 80), на агаре с дефибринированной кровью слегка кремовые, розовеющие при нанесении оксидазного индикатора. Для изучения агглютинабельности и антибиотикочувствительности культуры ее засевают на скошенный сывороточный агар.

Рис. 80. Колонии гоно- и менингококка и их морфология

Дифференциация менингококка от родственных ему сапрофитических нейссерий (*N. sicca* и *N. catharalis*), которые могут находиться в носоглотке, основывается на их способности расти при комнатной температуре на простых питательных средах.

РП применяется в целях определения серовара выделенной культуры для установления источника ин-

фекции. Густую взвесь микробов наливают в 3 пробирки по 3 капли, затем в них вносят по 3 капли неразведенной менингококковой сыворотки серогрупп А, В и С. Смесь взбалтывают в течение 2–5 мин, после чего в каждую пробирку доливают 10–20 капель 0,85 %-ного раствора натрия хлорида и результаты учитывают по резкому помутнению смеси.

Для обнаружения антител в крови больных ставят РНГА, ИФА и РИА с использованием группоспецифических полисахаридных диагностикумов.

Особенности диагностики стафилококковых инфекций

При заболеваниях, вызванных стафилококками, исследуют гной, отделяемое слизистых оболочек, кровь, мокроту и мочу, рвотные массы, испражнения больных. Из открытых поражений гной берут ватным тампоном, из закрытых гнойников – шприцем, кровь – венепункцией.

Жидкие материалы, исключая кровь, микроскопируют, окрашивая мазки по Граму. Стафилококки располагаются небольшими скоплениями, попарно, короткими цепочками (см. рис. 9, *а*).

При выделении чистой культуры стафилококка материалы высевают в чашки Петри с 3–5 %-ным кровяным агаром. Широко используют молочно-солевой или желточно-солевой агар (100 мл 6,5 %-ного солевого агара + 10 % молока или желточной смеси). Чашки помещают в термостат при 37 °С на 18–24 ч. Спустя сутки золотистые стафилококки на плотных средах образуют средней величины выпуклые непрозрачные колонии гомогенной или мелкозернистой структуры (рис. 81) с зоной гемолиза вокруг на кровяном или зоной помутнения на желточно-солевом агаре (лецитовителлазная реакция).

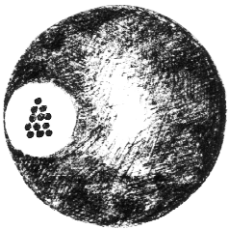


Рис. 81. Колония стафилококка и его морфология

Для дальнейшего исследования колонии стафилококков пересевают на скошенный агар, а получив на третий день чистую культуру, исследуют плазмокоагуляционную актив-

ность, засевая ее в пробирку с цитратной плазмой. В положительных случаях через 2 ч находящаяся в термостате плазма свертывается. Одновременно 2-миллиардную взвесь культуры в объеме 0,2 мл вводят внутрикожно кролику светлой масти – на следующие сутки на месте ее введения возникает некроз кожи.

Для окончательной идентификации стафилококков применяют фаготипирование с помощью 4 групп международного набора 23 фагов (см. «Фаги») и серотипирование типовыми адсорбированными сыворотками. Определение чувствительности выделенных стафилококков к антибиотикам является обязательным.

Для выделения гемокультуры стафилококков 5–10 мл крови высевают в 50–100 мл сахарного бульона, выдерживают в течение 18–24 ч в термостате при 37 °С. На вторые сутки из бульонной культуры готовят мазки, затем делают пересев ее в чашку Петри с кровяным агаром для выявления гемолитической активности и на скошенный МПА. Полученную агаровую гемокультуру изучают так же, как и любую другую, выделенную из гноя.

При пищевых токсикоинфекциях рвотные массы и кал сеют в две чашки с МПА, а для обогащения бактериями – в бульон с 1 % глюкозы и на кровяной агар с 6–7 % поваренной соли, где ингибируется рост кишечных, спороносных бактерий и протея.

Для определения продукции энтеротоксина культуру стафилококка сеют в специальную питательную среду: к 100 мл дистиллированной воды прибавляют 20 г пептона, 1 г однозамещенного фосфата натрия, 1 г однозамещенного фосфата калия, 5 г NaCl, 0,1 г кальция хлорида, 0,2 г магния хлорида, 0,8 г агар-агара; pH 7,0–7,2. Стерилизуют в автоклаве 20 мин при температуре 115 °С. Посевы помещают в эксикатор с 20 % CO_2 и инкубируют при 37 °С в течение 3–4 сут, затем фильтруют через мембранные фильтры № 3 и 4. Полученный фильтрат (10–15 мл) смешивают с равным количеством теплого молока и вводят через зонд в желудок котятам. При наличии энтеротоксина через 30–60 мин у них наступает рвота, спустя 2–3 ч – понос, продолжающийся в течение 2–3 сут. Токсигенность выделенных культур стафилококка можно определить также *in vitro* диффузионной преципитацией в агаре, используя для реакции неразведенную антитоксическую сыворотку.

Для обнаружения патогенных стафилококков в операционных, перевязочных, родильных палатах воздух больничных помещений засевают на желточно-солевой агар: к 100 мл расплавленного МПА, содержащего 7,5 г натрия хлорида, добавляют 20 мл гомогенной стерильной желточной взвеси куриного яйца в изотоническом растворе, хорошо перемешивают и разливают в чашки Петри.

Определение стафилококкового антитоксина в сыворотке крови производится при диагностике хронических стафилококковых инфекций (остеомиелит, септикопиемия). В основе реакции лежит нейтрализация стафилококкового гемотоксина антитоксином сыворотки больного. Для этого к стафилококковому токсину, взятому в дозе Lh (*Limes haemolyticus*), прибавляют сыворотку больного, разведенную 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20 и т. д., тщательно перемешивают и к смеси добавляют 0,05 мл эритроцитов кролика. Результаты реакции учитывают спустя 1 ч, поместив пробирки в термостат при температуре 37 °С, а затем еще раз, выдерживая смеси такое же время при комнатной температуре. За титр сыворотки принимают объем, задерживающий гемолиз.

У здоровых людей титр стафилококкового антитоксина невысок, у больных с хроническими стафилококковыми инфекциями – превышает титр здоровых в несколько раз.

Особенности диагностики стрептококковых инфекций

Для исследования берут гной, отделяемое слизистых оболочек, мочу, фекалии, кровь, спинномозговую жидкость.

В мазках, окрашенных по Граму, стрептококки располагаются короткими цепочками (см. рис. 9, *б*), часто попарно, поодиночно или небольшими группами, вследствие чего их трудно дифференцировать от стафилококков.

Для выделения чистой культуры материалы высевают на пластинчатый сахарный и кровяной агар (кровяной агар Гарро с 0,2 мл 0,1 %-ного раствора генцианвиолета на 100 мл), на которых через сутки в термостате вырастают мелкие, плоские, суховатые колонии зернистой структуры (рис. 82) с наличием зоны гемолиза (*S. pyogenes*), зеленой каемки метгемоглобина вокруг них (*S. viridans*) или

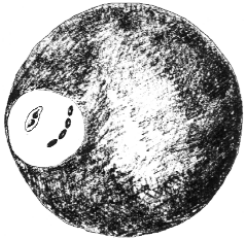


Рис. 82. Колония стрептококка и его морфология

без них (*S. anhaemolyticus*). Для дифференциации стрептококков группы А применяют тест чувствительности к бацитрацину, к которому β-гемолитические стрептококки обычно высоко резистентны.

При засевах фекалий, пузырной желчи, мочи, смывов с бытовых предметов могут выделяться энтерококки, отличительными признаками которых являются рост в широком температурном диапазоне (10–45 °С) на щелочных средах с пенициллином и высокими концентрациями поваренной соли.

Гемокультуру при сепсисе получают, засевая 5–10 мл крови в соотношениях 1 : 10 на сахарный бульон, а также на среду Китта – Тароцци с целью выделения анаэробных пептострептококков. Через 24–48 ч инкубирования в термостате на дне флаконов появляется хлопьевидный придонный осадок, в котором при микроскопии мазков можно обнаружить длинные цепочки стрептококков. Для выявления гемотоксина культуру из бульона пересевают в чашку Петри с кровяным агаром.

Для определения вирулентности стрептококка исследуют токсинообразование, в частности продукцию фибринолизина (стрептокиназы). Для этого к плазме крови человека, разведенной 1 : 3, добавляют 0,5 мл 18-часовой культуры стрептококка и 0,5 мл 0,25 %-ного раствора кальция хлорида. Пробирки осторожно встряхивают и помещают на водяную баню при 42 °С. Выделяющие фибринолизин стрептококки растворяют образующийся сгусток фибрина в ближайшие 40–50 мин, реже – через 2 ч.

Серологическое обследование больных при стрептококковых инфекциях предполагает определение в крови стрептококкового антигена и титра специфических антител к О-стрептолизину.

Стрептококковый антиген определяют при помощи РСК на холоде, используя антистрептококковую иммунную сыворотку, полученную путем гипериммунизации кроликов культурой стрептококка группы А. За титр антигена принимают наибольшее разведение исследуемой сыворотки, вызывающее задержку гемолиза не менее чем на «+».

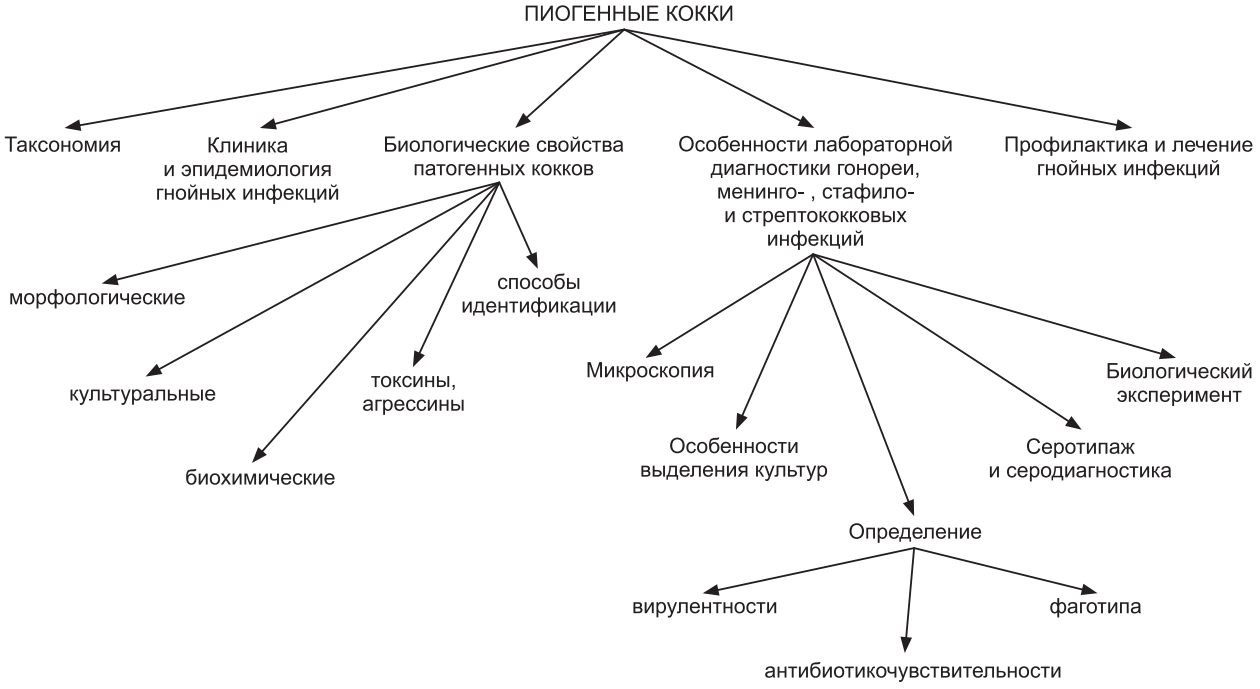
Определение О-антистрептолизина, содержащегося в сыворотках больных, основано на его способности нейтрализовать гемолитическую активность О-стрептолизина. Для этого делают кратные разведения сыворотки больного, прибавляя к ним О-стрептолизин (коммерческий препарат). Смеси выдерживают 15 мин в термостате при 37 °С, после чего во все пробирки вносят по 0,2 мл взвеси эритроцитов кролика. Пробирки вновь инкубируют в термостате в течение 1 ч и затем учитывают результаты. Титр О-антистрептолизина в сыворотке выражают числом $АЕ_{Sto}$ в 1 мл (Sto – международная единица стандарта О-стрептолизина).

При исследовании мокроты больных пневмонией, гнойных выделений из среднего уха и гайморовой полости, спинномозговой жидкости и крови при менингитах и сепсисе следует иметь в виду возможность выделения *S. pneumoniae*. Его основные свойства: имеет ланцетовидную форму и капсулу, окружающую две особи кокка; высоковирулентный для мышей; растворяется в желчи; расщепляет инулин.

Посев мокроты, гноя обычно положительного результата не дает, так как наличие в них большого количества сапрофитов и гнилостных бактерий подавляет рост стрептококков пневмонии.

В таких случаях комочки мокроты эмульгируют в изотоническом растворе натрия хлорида и полученной взвесью внутрибрюшинно заражают белых мышей. Животные погибают через 18–72 ч от септицемии. Чистую культуру пневмококка выделяют посевом капельки крови из сердца, эмульсии внутренних органов и перитониальной жидкости в чашку Петри с кровяным агаром и в пробирку с сывороточным бульоном. Для дифференциации от зеленящих стрептококков 1 мл бульонной культуры вносят в 0,5 мл бычьей желчи. Через 10–15 мин пребывания в термостате стрептококки пневмонии лизируются. При отсутствии лизиса определяют способность пневмококка ферментировать инулин.

Профилактика и лечение гнойных инфекций. Специфическая профилактика инфекций, вызываемых патогенными кокками, разработана недостаточно. Имеется химическая противоменингококковая вакцина из группоспецифических полисахаридов серогруппы А, которая применяется по эпидемическим показаниям. Вводят ее од-


ПИОГЕННЫЕ КОККИ
Таксономия
Клиника и эпидемиология гнойных инфекций
Биологические свойства патогенных кокков
Особенности лабораторной диагностики гонореи, менинго- , стафило- и стрептококковых инфекций
Профилактика и лечение гнойных инфекций
морфологические
культуральные
биохимические
токсины, агрессины
способы идентификации
Микроскопия
Особенности выделения культур
Определение
Серотипаж и серодиагностика
Биологический эксперимент
вирулентности
фаготипа
антибиотикочувствительности

Граф 64

нократно подкожно в объеме 0,25 мл (25 мкг) детям от 1 до 7 лет или 0,5 мл (50 мкг) детям 9 лет и взрослым. Невосприимчивость к менингококковой инфекции у детей создается на 2 года, а у взрослых – на 10 лет. Готовится также гонококковая вакцина, использующаяся при лечении хронической гонореи. Для предупреждения гонобленнореи в конъюнктивальный мешок новорожденных (девочкам также в половую щель) вносят 2 капли 30 %-ного раствора сульфацила натрия. Лечение гнойных инфекций проводят бензилпенициллином и его полусинтетическими аналогами, цефалоспоринами, аминогликозидами, тетрациклинами, макролидами, фузидином, рифампицином. В терапии стафило-стрептококковых нагноительных процессов применяются антистафилококковые иммуноглобулин и гипериммунная плазма, анатоксин, стафилококковые и стрептококковые фаги, изредка аутовакцины, в частности для лечения рецидивирующих фурункулезов и пиодермий.

Инфекции, вызываемые псевдомонадами

Синегнойная инфекция

Таксономия. Синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa* является возбудителем внутрибольничных инфекций, вызывая, в частности, 20–30 % нагноительных процессов у хирургических и урологических больных. Относится к сем. *Pseudomonadaceae*, являясь типовым видом бактерий рода *Pseudomonas* (*pseude* – ложная, *monada* – неделимая единица). Открыта в 1862 г. А. Люкке. Широко распространена в природе. Ее обнаруживают у здоровых людей на коже и слизистых оболочках носоглотки, в фекалиях и других выделениях, в воде, почве, на разных бытовых предметах, объектах и медицинской аппаратуре.

Биологические свойства. *Морфология. P. aeruginosa* – грамотрицательная, прямая, подвижная палочка размером 1,5–3,0 × 0,5–0,8 мкм, обладает 1–2 полярными жгутиками. В мазке располагается поодиночно, парами, короткими цепочками.

Культивирование. Оптимальная температура инкубации 37 °С, но может расти при температуре 4–42 °С. Для выращивания синегнойной палочки достаточно одного органического соединения, например цитрата как источни-

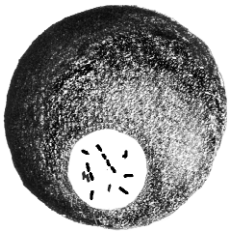


Рис. 83. Колония бактерий синегнойной палочки и их морфология

ка углерода и энергии. Вырастая на простых питательных средах, образует выпуклые с неровным краем и металлическим блеском пигментированные колонии (рис. 83), издающие характерный запах, напоминающий аромат жасмина. Большинство штаммов продуцирует два пигмента – зеленый пигмент флюоресцеин, диффундирующий в питательную среду, и пиоцианин, растворяющийся в воде и хлороформе (в нейтральной и щелочной среде – синий, а в кислой – красный). Некоторые штаммы образуют коричнево-красный пиорубин, красный эритроген, черный меланоген. Около 20 % штаммов синегнойной палочки безпигментные. Выделяют пиоцины.

Биохимические свойства. По сравнению с другими грамотрицательными бактериями синегнойная палочка биохимически малоактивна. В отличие от энтеробактерий не ферментирует, а только окисляет глюкозу, что выявляют в тесте Хью – Лейфсона, для чего исследуемую культуру вносят в две пробирки с МПБ, глюкозой и бромтимоловым синим, одну из которых для исключения контакта с кислородом воздуха заливают вазелиновым маслом. Эшерихии, ферментирующие и окисляющие глюкозу, вызывают подкисление среды в одной и другой пробирке, меняя цвет с бутылочно-зеленого на желтый. Синегнойная палочка вызывает изменение цвета среды, не покрытой вазелином (+ тест в аэробных условиях). Протеолитическая активность высокая: разжижает желатин и свернутую сыворотку, гидролизует казеин, расщепляет отдельные аминокислоты. Каталазо- и оксидазоположительна.

Антигены и факторы патогенности. В составе синегнойной палочки имеется группоспецифический О-антиген и типоспецифический Н-антиген. О-антиген представлен комплексом липополисахаридов и белков. По его структуре выявлено 20 серогрупп *P. aeruginosa*. Н-антиген – термолабильный белковый компонент флагеллина, по которому устанавливают принадлежность псевдомонад к определенной серогруппе (или Н-серовару). Продуцирует экзотоксин А, цитотоксины, гемолизины, коллагеназу, эллас-

тазу и другие протеазы, энтеротоксин, нейраминидазу и другие токсические субстанции.

Резистентность. Синегнойная палочка чувствительна к 0,5 %-ному раствору хлорамина, 3 %-ному раствору перекиси водорода, 2 %-ному раствору фенола.

Лабораторная диагностика. При выделении синегнойной палочки из патологических материалов используются МПА и МПБ, кровяной агар и другие среды, в которые прибавляют нитрофураны, бриллиантовый зеленый, ацетамид и другие вещества, подавляющие рост посторонней микрофлоры. Полученную культуру идентифицируют по культурально-биохимическим свойствам и в биологическом эксперименте. При наличии фагов и диагностических сывороток прибегают к фаготипированию и серотипажу с помощью реакции агглютинации.

Лечение. Для лечения синегнойной инфекции используются гентамицин, амикацин, тобрамицин и другие аминогликозиды, карбенициллин, полимиксины и сочетание аминогликозидов с карбенициллином.

Возбудитель сапа

Таксономия. Сап вызывается бактерией *Pseudomonas mallei* (*malleus* – сап) сем. *Pseudomonadaceae*. Возбудитель сапа открыт в 1882 г. Ф. Леффлером и Х. Шютцем.

Клиника и эпидемиология. Сап – генерализованное зоонозное заболевание, характеризующееся септикопиемией, тяжелой интоксикацией, поражением кожи, слизистых оболочек и внутренних органов. У человека различают острую и хроническую формы сапа.

Острая форма болезни начинается с внезапного повышения температуры до 38,5–39,5 °С, озноба, головной боли и появления на коже в месте входных ворот возбудителя красновато-багровой папулы, которая быстро превращается в пустулу и спустя 1–3 дня лопается с образованием язвы. В середине второй недели болезни на коже лица и туловища, слизистых оболочках носа и рта, иногда конъюнктивы глаза, появляются множественные пустулы и язвы, в мышцах (преимущественно икроножных) образуются абсцессы, развивается плевропневмония с выделением при кашле кровавой мокроты. В терминальном периоде сапа увеличивается печень и селезенка, присоединяют-

ся поносы, гнойные артриты, нарушается деятельность сердечно-сосудистой системы. Хроническая форма сапа развивается постепенно с периодами обострений, сменяющихся ремиссиями. Ее общая продолжительность составляет от нескольких месяцев до 3 лет. Наиболее характерным для хронической формы сапа является образование на коже множественных пустул, склонных к изъязвлению, наличие абсцессов в мышцах, пустулезных высыпаний и изъязвлений на слизистой оболочке носа, развитие плевропневмонии.

При *хронической форме сапа* имеются случаи выздоровления. Источником инфекции являются лошади, мулы, ослы. Болезнь людей носит профессиональный характер (болеют конюхи, ветеринарные работники, кузнецы). Они заражаются при попадании на кожу и слизистые оболочки гноя от больных животных. В настоящее время сап лошадей регистрируется в Монголии, Китае, Иране, Афганистане, Турции.

Биологические свойства. *Морфология*. Бактерии сапа имеют форму палочек длиной 1–5 мкм и шириной 0,5–0,8 мкм, спор, капсул, жгутиков не образуют, в мазке располагаются беспорядочно, грамотрицательны. При окраске по Романовскому – Гимзе вследствие наличия в отдельных сегментах поли-β-оксибутирата окрашиваются неравномерно, часто более интенсивно на полюсах.

Культивирование. Бактерии выращиваются на питательном агаре с добавлением 4–5 % глицерина. Колонии вырастают через 2–3 сут – круглые, выпуклые, сероватые, полупрозрачные диаметром 1–2 мм (рис. 84). На картофельных ломтиках колонии формируются на следующие сутки; к 5–6-му дню они сливаются, и образуется масса, по цвету напоминающая мед.

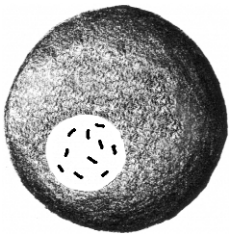


Рис. 84. Колония бактерий сапа и их морфология

Патогенность. Возбудитель сапа патогенный для морских свинок и серых мышей. При подкожном их заражении вызывает размягчение и распад тканей с образованием язв и поражением внутренних органов. При внутрибрюшинном инфицировании свинок-самцов возникает орхит (скротальный феномен Штрауса), а мыши при таком способе заражения погибают от сепсиса.

Биохимические свойства. Палочки сапа разлагают глюкозу, глицерин, маннит и левулезу с образованием кислоты без газа, синтезируют индол, образуют сероводород и аммиак, разжижают желатин, оксидазо- и каталазоположительные.

Резистентность. В выделениях животных возбудитель сапа выживает несколько недель, около 1 мес. сохраняется в воде. Устойчив к низким температурам, при кипячении погибает моментально. Чувствителен к дезинфекционным веществам, тетрациклинам, аминогликозидам. Устойчив к пенициллину.

Иммунитет. Восприимчивость к сапу у людей высокая. В процессе заболевания в организме вырабатываются антитела, развивается аллергия. Приобретенный иммунитет непродолжительный и малонапряженный.

Лабораторная диагностика. Материалами исследования являются кровь, мокрота, отделяемое язв и свищей из вскрывшихся абсцессов.

Экспресс-диагностика сапа основана на использовании прямой РИФ. С целью выделения чистой культуры кровь больных засевается на обычные селективные среды, а экскреты, богатые посторонней микрофлорой, – на те же среды с фуксином (1 : 100 000) или кристаллвиолетом (1 : 200 000) после предварительной 3-часовой обработки пенициллином (1000 ЕД/мл). Параллельно материалами заражаются золотистые хомяки. На 2–3-и сут из выросших колоний делают мазки и, окрасив их по Граму и Романовскому – Гимзе, идентифицируют с помощью диагностических агглютинирующих сывороток. Павших или забитых на 10-е сут животных вскрывают и, сделав из крови сердца, печени и селезенки мазки, производят их засев на среды с последующим серотипажем выделенных культур. Часто используется серодиагностика – реакция агглютинации и реакция связывания комплемента со стандартным антигеном. При этом диагностический титр в РА не ниже 1 : 1000, а в РСК – 1 : 20 и выше.

Аллергическая проба. Аллергизация организма при сапе возникает с 10–15-го дня от начала заболевания. Для ее выявления используют маллеин – фильтрат убитой 4–8-месячной культуры возбудителя сапа на 4 %-ном глицериновом бульоне в разведении 1 : 10 для накожного применения. Маллеин вводят путем втирания в насечки

по типу скарификационной пробы Пирке. В положительных случаях через 24–48 ч на месте введения аллергена возникает папула и инфильтрат.

Профилактика и лечение. Профилактика сапа предполагает проведение ветеринарно-санитарных и санитарно-противоэпидемических мероприятий. Ветеринарно-санитарные мероприятия – направлены на выявление больных сапом лошадей, в частности с помощью офтальмомаллеинизации (введение в конъюнктивальный мешок 3–4 капель аллергена), и уничтожение заведомо больных животных с захоронением их на спецмогильниках; проведение в неблагополучных по сапу хозяйствах дезинфекции помещений, сбруи и упряжи; сжигание малоценных предметов, остатков кормов, подстилки и навоза. Санитарно-противоэпидемические меры включают обеспечение обслуживающего персонала спецодеждой и обувью; строгое соблюдение ими правил личной гигиены. Больных людей госпитализируют в изолированные палаты и выписывают из инфекционных больниц только после исчезновения всех клинических проявлений болезни. В комплексном лечении сапа используются тетрациклины в сочетании с сульфаниламидами.

Возбудитель мелиоидоза

Таксономия. Возбудитель мелиоидоза *Pseudomonas pseudomallei* относится к сем. *Pseudomonadaceae*. Выделен военным врачом А. Уитмором в 1912 г. от человека, погибшего в столице Бирмы (соврем. Мьянма).

Клиника и эпидемиология. Мелиоидоз (*melis* – болезнь ослов) – инфекционное заболевание подобное сапу (*malleus* + *eides*), протекающее у человека с поражением кожи, слизистых оболочек, внутренних органов и формированием в них септических очагов. По клиническим проявлениям различают острый, подострый и хронический мелиоидоз. Острая форма мелиоидоза характеризуется высоким подъемом температуры, болями во всем теле, рвотой, желтухой и поносом, быстрым развитием плевропневмонии с выделением при кашле желто-зеленого цвета кровянистой мокроты, обильным высыпанием на коже пустул и пузырей и последующим их изъязвлением. Больные погибают в первые дни от коллапса, а позже – от

интоксикации. Подострая форма мелиоидоза отличается менее выраженной интоксикацией, краткими ремиссиями и более продолжительным течением болезни. Хронический мелиоидоз может продолжаться месяцами и годами. При этой форме болезни очаги нагноения возникают в одном или нескольких органах, часто вскрываются с образованием долго незаживающих язв и свищей. Источником мелиоидоза могут быть мыши и крысы, кошки и собаки, козы, овцы, свиньи, коровы, лошади и дикие животные. В эндемичных регионах Юго-Восточной и Южной Азии, где ежегодно спорадически встречается мелиоидоз, люди заражаются при работе на рисовых полях и купании в стоячих водоемах. Инфицирование мелиоидозом возможно также алиментарным и воздушно-пылевым путями.

Биологические особенности. *Морфология.* Возбудитель мелиоидоза имеет форму палочки с несколькими или одним жгутиком на полюсе (лофо- или монотрихи) размером 3–5 × × 0,3–0,5 мкм. Спор и капсул не имеет. Располагается в мазке поодиночно, короткими цепочками или небольшими группами. Грамотрицательный, хорошо окрашивается анилиновыми красителями, часто более интенсивно по полюсам, где накапливаются кристаллы поли-β-масляной кислоты.

Культивирование. Возбудитель мелиоидоза очень непритязательный к питательным веществам и может размножаться даже в водопроводной воде. Не нуждаясь в факторах роста и синтезируя все необходимые метаболиты из простых соединений, хорошо растет при температуре 37 °С (размножается в интервале 20–41 °С) на 3–5 %-ном глицериновом агаре, где через сутки образует мелкие выпуклые колонии, подобные *P. aeruginosa* (см. рис. 83). Спустя 48 ч они диссоциируют с образованием в основном R-колоний с морщинистой поверхностью, со временем приобретающих кремовую, оранжевую, желто-коричневую окраску и запах плесени. При выращивании на агаре с кроличьей кровью вызывают гемолиз, а на бульоне – помутнение среды с образованием толстой складчатой пленки.

Биохимические свойства. Свежевыделенные штаммы ферментируют с образованием кислоты глюкозу, маннит, мальтозу, маннозу, галактозу, фруктозу, трегалозу, дульцит, разжижают желатин и свернутую сыворотку, обладают каталазной и пероксидазной активностью, редуцируют метиленовый синий.

Антигены и токсины. В составе *P. pseudomallei* содержится видоспецифический термолабильный жгутиковый антиген (Н) и два общих с палочкой сапа термостабильных антигена – соматический (О) и оболочечный (К), с которым связывают его вирулентность и токсичность. Возбудитель продуцирует два экзотоксина, один из которых вызывает геморрагически-некротические поражения, а второй – гибель морских свинок и кроликов без повреждения ткани в месте его введения.

Резистентность. Устойчивость возбудителя мелиоидоза к низким и высоким температурам, высушиванию и действию дезинфекционных веществ не отличается от резистентности к ним возбудителя сапа.

Патогенность. К возбудителю мелиоидоза чувствительны золотистые хомяки, кролики и морские свинки, при внутрибрюшинном заражении которых на 2–3-й день у них возникает скротальный феномен.

Иммунитет. Чувствительность человека к мелиоидозу невысока. Об этом, в частности, свидетельствует то, что в эндемичных районах, где он часто контактирует с возбудителем (на рисовых полях в Малайзии, например, он обнаруживается в 15–35 % проб воды и почвы), мелиоидоз встречается сравнительно редко, главным образом, у лиц с пониженной резистентностью. О высокой инфицированности возбудителем мелиоидоза в рисоводческих регионах и вместе с тем устойчивости к нему у проживающих там людей говорит и тот факт, что у 20 % из них в крови наблюдаются высокие титры специфических антител. В процессе заболевания в организме человека вырабатываются антитела и возникает инфекционная аллергия.

Лабораторная диагностика. Основным методом диагностики мелиоидоза является бактериологическое исследование крови, мокроты, гноя, мочи и слизи из носоглотки больных. Материалы микроскопируют и засевают на питательный агар с 3–5 % глицерина и кристаллвиолетом, на среды Левина и Мак-Конки, ингибирующие постороннюю микрофлору. Одновременно материалом заражают хомяков и морских свинок с последующим посевом органов павших животных на те же среды. Идентификация возбудителя мелиоидоза производится по морфолого-культуральным, биохимическим, антигенным и патогенным свойствам с использованием на заключительном эта-

БАКТЕРИИ РОДА PSEUDOMONAS
Таксономия
P. aeruginosa
P. mallei
P. pseudomallei
Клиника и эпидемиология
синегнойной инфекции
сапа
мелиоидоза
Биологические особенности псевдомонад
Морфология
атрихи
моно-, лофотрихи
Культивирование
среды (наименее притязательная бактерия)
форма колоний (пигменты)
t-диапазон
Патогенность
Спектр ферментов (общность оксидоредуктаз)
Лабораторная диагностика
Микроскопия (особенности окраски анилиновыми красителями)
Выделение чистых культур (идентификация)
синегнойной палочки
псевдомонад
сапа
мелиоидоза
Аллергическая реакция с маллеином
Серодиагностика сапа
Профилактика и лечение

Граф 65

пе типажа реакции агглютинации и иммунофлюоресценции. Используется также серодиагностика, но РА, РНГА и РСК малоспецифичны; могут быть положительными у разных больных или здоровых лиц и отрицательными у больных мелиоидозом.

Профилактика и лечение. Как и при сапе, в профилактике мелиоидоза большое значение имеет выявление больных животных с помощью аллергической пробы, при которой применяют уитморин (фильтрат убитой 3–6-недельной бульонной культуры возбудителя мелиоидоза). Больных животных уничтожают. В случае возникновения мелиоидоза обслуживающий персонал работает на фермах в спецодежде и обуви. В очагах инфекции производится дезинфекция и дератизация. Больных людей госпитализируют и лечат высокими дозами левомицетина в сочетании с тетрациклином и сульфаниламидами.

Общая характеристика семейства энтеробактерий

Семейство *Enterobacteriaceae* – самое многочисленное, включающее более 20 родов, но эпидемические вспышки инфекционных заболеваний чаще всего вызывают *Escherichia, Salmonella, Shigella, Klebsiella, Serratia, Proteus* и *Yersinia*.

Отличаясь друг от друга специфическими признаками, энтеробактерии имеют форму прямых палочек с закругленными концами; размеры их колеблются от 1,5 до 3 мкм в длину и 0,3–0,5 мкм в поперечнике; спор и капсул не образуют; в мазке располагаются беспорядочно; грамотрицательны. Одни из них перитрихи, другие – атрихи. Факультативные анаэробы. К питательным средам непритязательны. Вырастают на МПА и МПБ при температуре 37 °С уже через сутки, но по характеру роста отдифференцировать их на простых средах очень трудно, а чаще всего – невозможно.

Выделяют и идентифицируют энтеробактерии на дифференциально-диагностических средах Плоскирева, Эндо, Левина и Мак-Конки, которые обычно засеваются калом, мочой, рвотными массами больных. Основным методом лабораторной диагностики кишечных инфекций, вызываемых патогенными энтеробактериями, является

выделение чистой культуры с последующим определением культурально-биохимических свойств и антигенной структуры в реакции агглютинации.

Кишечные инфекции, вызванные патогенными энтеробактериями, передаются от больных людей и бактерионосителей, изредка от животных и птиц. Механизм передачи – фекально-оральный. Пути передачи – алиментарный (пищевой), водный и контактно-бытовой. Для кишечных инфекций характерна летне-осенняя сезонность, что связано с употреблением большого количества воды, немытых овощей, фруктов и массовым выплодом мух, являющихся механическим переносчиком энтеробактерий.

Эпидемические эшерихиозы

Эшерихиозы – острые кишечные инфекции, сопровождающиеся диареей и токсикозом, по клинической картине сходные с бактериальной дизентерией и сальмонеллезным гастроэнтеритом. Вызываются эшерихиями.

Таксономия. Эшерихии относятся к трибе и роду *Escherichia*. Родовое название *E. coli* (кишечная палочка) дано ей в честь немецкого ученого Т. Эшериха, выделившего бактерии из фекалий в 1885 г.

Общая характеристика. Эшерихии – нормальные обитатели толстой кишки теплокровных, пресмыкающихся, рыб и насекомых. Составляя у здоровых людей основную биомассу аэробной микрофлоры кишечника, эшерихии, продуцирующие колицины, являются основными комменсалами, которые обеспечивают иммунитет к ряду возбудителей кишечных инфекций. Однако при попадании эшерихий в необычные биотопы они вызывают заболевания. В частности, проникая в мочеиспускательный канал, эшерихии вызывают инфекции мочевыводящих путей, а затем бактериемию и, как ее следствие, – менингит. Кроме этих и других аутоинфекционных неконтагиозных эшерихиозов, как правило, возникающих при снижении иммунитета у людей, некоторые разновидности *E. coli* вызывают эпидемические вспышки кишечных инфекций, в результате употребления воды, пищевых продуктов, овощей и фруктов, контаминированных ими. Широко обсеменяя окружающую среду, эшерихии используются как индикатор ее фекального загрязнения в санитарно-микробиологических исследованиях (см. «Санитарная микробиология»).

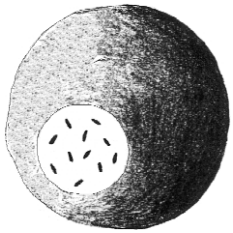


Рис. 85. Колония эшерихий и их морфология

Биологические свойства. По большинству признаков эшерихии сходны с шигеллами дизентерии и сальмонеллами брюшного тифа, паратифов и сальмонеллезных гастроэнтеритов, что всегда учитывается при их дифференциации.

Морфология и культуральные свойства. E. coli – мелкие бактерии (1,5–3 × 0,3–0,8 мкм), не образуют спор, вариабельны в отношении капсулообразования и подвижности (большинство штаммов перитрихи), грамотрицательны.

Эшерихии растут на простых и дифференциально-диагностических средах при температуре 30–37 °С в обычных условиях аэрации. В МПБ они вызывают равномерное помутнение, нередко образуют пленку, а по окружности мениска на стенках пробирки – кольцо. На пластинчатом питательном агаре эшерихии формируют круглые с ровными краями, выпуклые, влажные полупрозрачные колонии (рис. 85), на дифференциально-диагностических средах вследствие разложения лактозы – цветные (красные с металлическим блеском – на Эндо, фиолетовые – на Левина, розовые – на Плоскирева). Колонии шигелл, сальмонелл, других видов патогенных энтеробактерий на этих средах бесцветные. Эшерихии не растут на среде с цианидом калия и на цитратном агаре Симмонса.

Ферменты, токсины и плазмиды. По сравнению с другими родами семейства энтеробактерий эшерихии обладают ярко выраженной гликозидазной активностью. Они ферментируют с образованием кислоты и газа (или без него) многие углеводы, кроме адонита и инозита. Протеолитическая активность эшерихий умеренная: образуют индол и аммиак, но не расщепляют желатин и не продуцируют сероводород, непостоянно декарбоксилируют лизин, орнитин и аргинин. Особого внимания заслуживает то, что эшерихии постоянно ферментируют лактозу, не продуцируют уреазу, на глюкозофосфатном бульоне Кларка дают положительную пробу с метилротом, что проявляется его алым окрашиванием, и отрицательную реакцию Фогеса – Проскауэра (раствор α-нафтола и едкого кали не

вызывает покраснения среды). Кишечная палочка в отличие от псевдомонад и протея не обладает оксидазной активностью. Многие штаммы эшерихий содержат плазмиды, детерминирующие продукцию гемолизинов (Hly), энтеротоксинов (Ent), контролирующие синтез антигенов и адгезивные свойства (К 88), фертильность (F) и множественную лекарственную устойчивость (R). При распаде эшерихий-сапрофитов выделяются эндотоксины.

Антигены. У эшерихий обнаружены три антигена: а) соматический термостабильный липополисахаридный О-антиген; б) термолабильный жгутиковый Н-антиген белковой природы; в) капсульный полисахаридный К-антиген, быстро разрушающийся при 100 °С. По структуре О-антигена эшерихии подразделяются на 173 серовара, по Н-антигену – на 56, по К-антигену – на 80, т. е. у эшерихий-комменсалов антигены пестры и нетипичны.

Более стабильна антигенная структура сероваров у кишечных палочек, вызывающих диарейные инфекции. Среди них различают пять типов: энтеропатогенные эшерихии (EPEC – англ. ***e**ntero**p**athogenic **E**. **c**oli*) и энтероадгезивные (EAEC – ***e**ntero**a**dherence*), вызывающие диареи с повреждением микроворсинок кишечника; энтероинвазивные (EIEC – ***e**ntero**i**nvasive*) и энтерогеморрагические (EHEC - ***e**ntero**h**emorrhagic*), вызывающие еще более тяжелые повреждения кишечника с профузным кровянистым поносом; энтеротоксигенные (ETEC - ***e**ntero**t**oxigenic*), являющиеся возбудителями не только диарей, но и токсикоинфекций. При этом 14 сероваров EPEC продуцируют плазмидный фактор адгезивности, 12 сероваров EIEC обладают факторами инвазивности и проникают, подобно шигеллам, в эпителий кишечника, а серовары EHEC (3) и ETEC (21) – цитотоксины (EH), вызывающие гибель клеток, и энтеротоксины (ET), которые, подобно холерным, нарушают транспорт ростовых веществ и клеточный водно-солевой баланс (причем те и другие кодируются генами умеренных фагов).

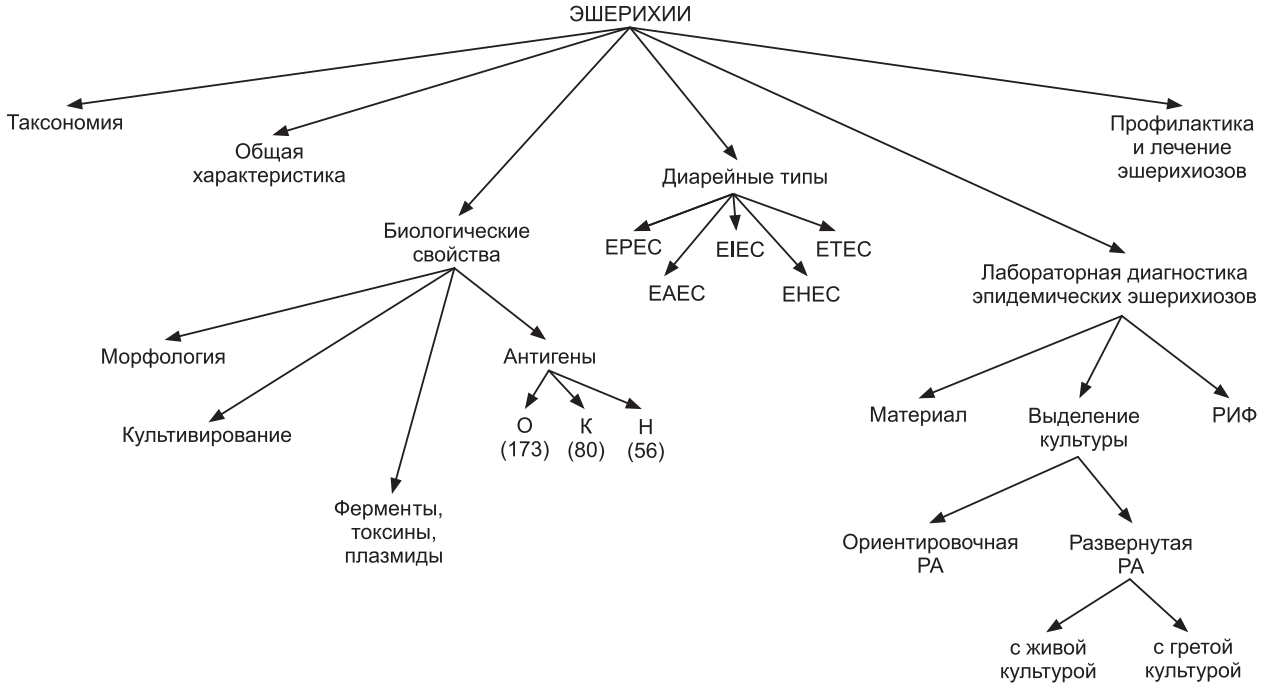
Лабораторная диагностика эпидемических эшерихиозов. Патогенные серовары эшерихий выделяют из испражнений, рвотных масс, промывных вод желудка, гноя, отделяемого слизистой оболочки зева и носа, крови при сепсисе. Исследованию подлежат также смывы рук обслуживающего персонала, воздух палат. Материалы (исклю-

чая кровь) высевают у постели больного на среду Эндо и помещают в термостат при 37 °С. Через 18–24 ч инкубации в термостате отбирают десять интенсивно-красных лактозоположительных колоний кишечных палочек и агглютинируют на стекле в поливалентной ОК-сыворотке, содержащей антитела к диарейным сероварам. Агглютинирующиеся колонии в целях накопления культуры и предварительного изучения гликозидазной активности, способности ферментировать мочевину и продуцировать сероводород пересевают на среду Олькеницкого. Полученную на следующие сутки чистую культуру на ней агглютинируют на предметных стеклах в поливалентных ОК-сыворотках с меньшим набором антител, а затем в каждой из тех которые входили в смесь, вызвавшую агглютинацию выделенных эшерихий. На заключительном этапе лабораторной диагностики ставят развернутую реакцию агглютинацию в специфической сыворотке. Для этого ее разводят в двух рядах до титра, который указан на этикетке ампулы. В один из них добавляют смытую со скошенного агара негретую культуру (К-антиген), в другой – ее кипяченую взвесь (О-антиген). Пробирки помещают на сутки в термостат при температуре 37 °С. Положительная реакция агглютинации с обеими культурами не ниже чем в 1/2 титра коли-сыворотки дает возможность установить природу патогенных эшерихий. Отсутствие агглютинации прогретой культуры (О-антигена) указывает на ее принадлежность к другой О-группе.

Параллельно культура засевается на развернутый ряд сред Гисса для определения полного набора гликозидаз; в 1 %-ную пептонную воду для выявления индола и сероводорода; в полужидкий агар для изучения подвижности.

При выявлении агглютининов в сыворотках больных используется РНГА, с помощью которой определяют О-антитела у больных колиэнтеритом.

Для полной характеристики диарейных эшерихий определяют также их вирулентность: ставят кератоконъюнктивальную пробу, интраназально заражают мышей, определяют гемолитические свойства. Энтеротоксигенность эшерихий испытывают, вводя материал мышам-сосункам в переполненный молоком желудок или через анальное отверстие. При интраназальном заражении белых мышей некоторые энтеротоксигенные штаммы эше-


ЭШЕРИХИИ
Таксономия
Общая характеристика
Биологические свойства
Диарейные типы
Профилактика и лечение эшерихиозов
Лабораторная диагностика эпидемических эшерихиозов
Морфология
Культивирование
Ферменты, токсины, плазмиды
Антигены
О (173)
К (80)
Н (56)
EPEC
EAEC
EIEC
ENEC
ETEC
Материал
Выделение культуры
РИФ
Ориентировочная РА
Развернутая РА
с живой культурой
с гретой культурой

Граф 66

рихий вызывают серозно-геморрагический отек легких. Чтобы установить источник коли-инфекции, определяют фаговар и колициновар исследуемых эшерихий.

Профилактика и лечение эпидемических эшерихиозов. В комплексе профилактических мероприятий большое значение имеет соблюдение правил гигиены и ухода за детьми, предупреждение инфицирования продуктов питания, термическая их обработка. Лечение диарейных инфекций проводят полимиксином М, ампициллином, ко-тримоксазолом, коли-протейным фагом, иммуноглобулином, бактериопрепаратами из нормальных симбионтов микрофлоры кишечника (колибактерин, бифидумбактерин, лактобактерин, бификол), обладающих антагонистической активностью к патогенным эшерихиям и резистентным к антибиотикам. Для лечения инфекций мочевыводящих путей назначают цефалоспорины и аминогликозиды.

Сальмонеллы тифопаратифов и острых гастроэнтеритов

Таксономия. Род *Salmonella*, названный в честь американского ветеринарного врача Д. Сальмона, выделившего в 1885 г. *S. cholerae-suis* при свиной холере, представлен в настоящее время одним видом *S. enterica* и 7 его подвидами: *S. cholerae-suis, S. salamae, S. arizonae, S. diarizonae, S. hountenae, S. indica, S. bongori,* включающими сотни описанных ранее сероваров, многие из которых считались видами, в частности сальмонеллы брюшного тифа (*S. typhi*), паратифов А и В (*S. paratyphi* А *и S. schottmuelleri*) и острых сальмонеллезных гастроэнтеритов (*S. typhimurium, S. enteritidis, S. heidelberg, S. galinarum, S. derby* и др.).

Клинические и эпидемиологические особенности сальмонеллезов. Сальмонеллезные инфекции – это группа кишечных инфекций, включающая брюшной тиф, паратифы А и В, острые сальмонеллезные гастроэнтериты и септицемии.

Тифопаратифы сопровождаются бактериемией, высокой температурой, резкими явлениями интоксикации, головной болью, помрачением сознания, бредом, нарушением функций нервной и сердечно-сосудистой систем, появлением на коже живота и боковых поверхностях грудной клетки розеолезной сыпи.

Среди *острых гастроэнтеритов* различают интестинальную форму, проявляющуюся в виде рвоты и диареи, и генерализованную тифоподобную и септикопиемическую с поражением центральной нервной системы и сыпью, с тяжелой интоксикацией, что может напоминать дизентерию, холеру или тифопаратифы. Правда, чаще встречаются легкие, стертые и даже бессимптомные формы гастроэнтеритов. Источниками брюшного тифа и паратифа А являются больной человек и, главное, хронические бактерионосители, а паратифа В и сальмонеллезных гастроэнтеритов, кроме того, – животные и птицы. Заразное начало выделяется из организма человека с мочой и калом, а у животных также с молоком и носовой слизью. Механизм их передачи – фекально-оральный, пути передачи – алиментарный (через молоко), водный и контактно-бытовой. Самая высокая заболеваемость сальмонеллезами наблюдается в летне-осенний период года. В их распространении участвуют многие факторы передачи: немытые овощи, фрукты, мухи.

Биологические особенности сальмонелл. *Морфология.* По морфологическим признакам сальмонеллы напоминают эшерихии, большинство штаммов перитрихи, спор и капсул не образуют, грамотрицательны.

Культурально-биохимические свойства. Сальмонеллы – факультативные анаэробы. Оптимальная температура роста для них 37 °С. Бульон равномерно мутят. На МПА через сутки от момента посева образуют круглые куполообразные влажные гладкие S-формы колоний, размером 1–2 мм, подобные эшерихиям. Сальмонеллы Шоттмюллера могут вырастать в виде крупных колоний со слизистым валиком по периферии (рис. 86). На средах Плоскирева, Эндо и Левина колонии сальмонелл бесцветны, с голубоватым оттенком; на висмут-сульфитном агаре в результате восстановления сульфита натрия до сернистого натрия – черные или коричнево-зеленые. В коротком ряду Гисса сальмонеллы тифопаратифов разлагают глюкозу, мальтозу, маннит; при

Рис. 86. Колония сальмонелл Шоттмюллера и их морфология

этом брюшнотифозные палочки ферментируют их до промежуточных продуктов, а паратифозные – до газа. Желатин не разжижают, индола не образуют, продуцируют сероводород, дают положительную пробу с метилротом и отрицательную реакцию Фогеса – Проскауэра. Брюшнотифозные бактерии по способности разлагать ксилозу и арабинозу подразделяются на четыре ферментативных типа. Один из них ферментирует ксилозу, другой – арабинозу, третий – оба углевода, а четвертый – биохимически инертный к ним. Больший набор гликозидаз содержат сальмонеллы, вызывающие гастроэнтериты. Кроме отмеченных углеводов, они, как и возбудители паратифов, ферментируют до газа сорбит, арабинозу, дульцит, непостоянно расщепляют ксилозу и рамнозу. Культуры, выделенные от заболевших в больницах, расщепляют инозит и в 50 % случаев декарбоксилируют лизин.

Токсины и факторы патогенности. Патогенность сальмонелл обусловливают факторы адгезии, связанные с пилями; факторы инвазии, индуцирующие развитие воспалительной реакции и приток жидкости в очаг поражения, термолабильный LT-токсин, сходный с энтеротоксином эшерихий; и ST-токсин, близкий по механизму действия цитотоксину шигелл. Тифопаратифозные бактерии образуют эндотоксин, который представляет собой липидопротеидный комплекс.

Антигены. Сальмонеллы брюшного тифа и паратифов содержат соматический О-антиген и жгутиковый Н-антиген. В составе каждого из них различают групповые и специфические компоненты (табл. 12). Так, О-антиген сальмонеллы паратифа А имеет 1, 2, 12-ю фракции, паратифа В и сальмонеллы мышиного тифа – 1, 4, 5, 12-ю, а сальмонеллы брюшного тифа – 9, 12-ю и Vi-антиген. Структура Н-антигена тоже сложна. У сальмонелл *schottmuelleri* и *typhimurium* он состоит из двух фаз: специфической (*b*, *i*) и неспецифической (1, 2). Возбудители брюшного тифа и паратифа А – однофазные бактерии, так как имеют только специфическую фазу Н-антигена (соответственно *d* и *a*). Общность антигенной структуры приводит к тому, что разные серовары сальмонелл агглютинируются не только в гомологичной, но и в родственных антисыворотках. Для того чтобы исключить перекрестную групповую агглюти-

нацию, готовят монорецепторные (типоспецифические) и антибрюшнотифозные Vi-агглютинирующие сыворотки, содержащие соответственно антитела против специфических фракций сальмонелл и Vi-антигена.

Таблица 12. **Антигенная структура основных сероваров *S. enterica***

Серовары	Группа	О-антиген	Н-антиген	
			1-я фаза	2-я фаза
paratyphi A	A	1, 2, 12	*a*	–
typhimurium	B	1, 4, 5, 12	*i*	1,2
schottmuelleri	B	1, 4, 5, 12	*b*	1,2
cholerae-suis	C	6, 7	*c*	1,5
hirschfeldi	C	6, 7, Vi	*c*	1,6
typhi	D	9, 12, Vi	*d*	–
gallinarum	D	1, 9, 12	–	–
enteritidis	D	1, 9, 12	*g, m*	–

Иммунитет. Врожденного иммунитета к возбудителям тифопаратифов не существует. При заболеваниях в крови повышается титр специфических антител, активируется фагоцитарная реакция. Переболевшие брюшным тифом и паратифами приобретают прочный и длительный иммунитет. У некоторых реконвалесцентов возможны рецидивы болезни и длительное бактерионосительство, обусловленное генотипическими особенностями организма.

Особенности лабораторной диагностики брюшного тифа и паратифов. Лабораторная диагностика тифопаратифов основана на определении: 1) видовой принадлежности чистых культур; 2) титра антител к ним в сыворотке больных и реконвалесцентов.

В первые две недели заболевания, когда у больных отмечается интенсивная бактериемия, культуру сальмонелл выделяют из крови, реже – из пунктатов костного мозга и соскоба розеол; на 3–4-й неделе и позже, когда они проникают в почки, желчный пузырь и кишечник – из мочи, желчи и фекалий. При этом выделенные из них культуры соответственно называют гемо-, миело-, розеоло-, урино-, били- и копрокультурами.

Каждую из данных культур получают и идентифицируют в течение 3–4 сут. При этом гемо-, миело- и розеолокультуры выделяют путем засева соответствующих пато-

логических материалов на 10 %-ный желчный бульон или среду Рапопорта–Вайнтрауба (тот же бульон с 1 % маннита или 2 % глюкозы, 1 % индикатора Андраде и поплавком для улавливания газа), а урино-, копро- и биликультуры – на среды Плоскирева, Эндо, Левина, висмут-сульфитный агар, часто с использованием селенитового бульона и среды Мюллера с тетратионатом натрия, подавляющих развитие эшерихий и другой посторонней микрофлоры, препятствующей росту сальмонелл.

Этапы выделения и идентификации тифопаратифозных культур. Для получения разных видов культур используют целый ряд приемов и методов микробиологических исследований. В частности, *гемокультуру* с наибольшим постоянством удается выделить на высоте бактериемии. Для этого в первые дни лихорадочного периода берут 5–10 мл крови, на 2–3-й неделе – 15–20 мл крови. Взятые объемы крови засевают на желчный бульон и среду Рапопорта – Вайнтрауба в соотношениях 1 : 10, что резко снижает микробоцидные свойства гуморальных факторов исследуемой сыворотки крови. Посевы помещают в термостат при 37 °С на одни сутки. При размножении сальмонелл в желчном бульоне видимых невооруженным глазом изменений среды не происходит, а среда Рапопорта – Вайнтрауба краснеет в результате ферментации маннита (глюкозы); в поплавке при росте паратифозных бактерий накапливается газ.

Обнаружив в мазках и раздавленной капле из желчных бульонов грамотрицательные подвижные бактерии, культуры отсевают на среду Плоскирева для получения отдельных колоний и на среду Олькеницкого – для предварительного учета основных биохимических свойств сальмонелл. Через 18–24 ч инкубации в термостате производят повторные микроскопические исследования лактозоотрицательных колоний на среде Эндо и культуры, выросшей на среде Олькеницкого, после чего гемокультура типируется при помощи реакции агглютинации в групповых и монорецепторных сальмонеллезных О- и Н-сыворотках, что позволяет определить в начале родовую, а затем видовую принадлежность возбудителей. При надобности для окончательной идентификации сальмонелл выросшая на среде Олькеницкого культура засевается на длинный ряд Гисса с целью определения спектра гликозидаз и ферментативного типа сальмонелл брюшного тифа.

Миело- и розеолокультуру получают на тех же желчных бульонах, а били-, копро- и уринокультуры – путем засева дуоденальной желчи, фекалий и осадков мочи после центрифугирования на дифференциально-диагностические и селективные среды. Видовую принадлежность всех этих культур устанавливают в такой же последовательности и с использованием тех же приемов идентификации, как и гемокультуры.

Особенности лабораторной диагностики острых гастроэнтеритов. У больного исследуют рвотные массы, промывные воды желудка (100–200 мл), испражнения (50–100 мл), а также кровь (5–10 мл), а у микробоносителей – испражнения, получаемые после приема слабительного. Для определения факторов и путей передачи сальмонеллезных гастроэнтеритов исследуются мясные (массой 500 г) и молочные продукты (100–200 мл), остатки пищи, соскобы со столов, разделочных досок, смывы с рук обслуживающего персонала и пр. При этом материалы густой и плотной консистенции (вырезанные из глубины туши кусочки мяса, внутренние органы, колбасы, сыры) перед посевом на питательные среды растирают в фарфоровых ступках и взвешивают в изотоническом растворе натрия хлорида.

Основным методом лабораторной диагностики сальмонеллезов является выделение чистой культуры сальмонелл и ее идентификация.

Бактериологическое исследование. Различные материалы засевают на среды Плоскирева в чашках Петри, а кровь для получения гемокультуры – в желчный бульон во флаконе. Посевы помещают в термостат. Через 6–10 ч бульонную гемокультуру пересевают на среду Плоскирева, а выросшие на ней через 18–24 ч бесцветные колонии – на среду Олькеницкого. На третьи сутки чистую культуру со среды Олькеницкого засевают на пестрый ряд Гисса и агглютинируют на предметных стеклах в сыворотках групп A, B, C, D (см. табл. 12), и в случаях получения положительного результата в одной из них производят идентификацию до вида в адсорбированных О- и Н-сыворотках.

На четвертые сутки бактериологического исследования определяют ферментативные свойства сальмонелл на средах Гисса, часто дифференцируя их с возбудителем паратифа B, обладающим близким спектром биохимической активности. С этой целью взвесью культуры или исходно-

го материала перорально заражают белых мышей. Возбудители сальмонеллезов в отличие от серовара *schottmulleri* вызывают у них сепсис, от которого животные погибают через 1–2 сут (часто позже). Правда, антибиотикоустойчивые эпидемические, или госпитальные штаммы сальмонелл мышиного тифа могут оказаться апатогенными для мышей. Окончательная идентификация сальмонелл осуществляется при помощи сальмонеллезных фагов.

Бактерионосительство сальмонелл выявляют при профилактическом обследовании работников пищевых блоков и в очаге инфекции. При этом исследуют испражнения, мочу и желчь. Выделенную культуру типируют по ферментативным свойствам в реакции агглютинации и в биологическом эксперименте.

Серодиагностика. Высокий титр антител в крови больных тифопаратифами регистрируется на 5–7-е сут (при сальмонеллезных гастоэнтеритах – на 2–3-й неделе). В разгаре заболевания бурно образуются О-антитела. Их выявляют с помощью стандартных О-диагностикумов сальмонелл брюшного тифа и паратифов *в реакции Видаля* (табл. 13).

Для ее постановки берут 2–3 мл крови из локтевой вены или 1 мл из пальца, мочки уха у детей и, получив из

Таблица 13. **Схема постановки реакции Видаля с О-диагностикумом**

Ингредиенты, мл	Номер пробирки						
	1	2	3	4	5	6 (контроль сыворотки)	7 (контроль диагностикума)
Изотонический раствор натрия хлорида	1	1	1	1	1	—	1
Сыворотка больного, разведенная 1 : 50	1 →	1 →	1 →	1 →	↓	1	—
Диагностикум в каплях	2	2	2	2	2	2	2
Полученное разведение сыворотки	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 1800	1 : 1600	1 : 100	—

нее сыворотку, последовательно разводят в нескольких параллельных рядах пробирок от 1 : 100 до 1 : 1600, внося в пробирки первого ряда брюшнотифозный, паратифозные А-, В-, О-диагностикумы, а в остальные такие же О-диагностикумы подвидов сальмонелл, вызывающих острые гастроэнтериты. Штатив с пробирками ставят в термостат. Через 2 ч производят учет реакции по наличию в сыворотках осадков (агглютинатов) и зерен-хлопьев при их взбивании. Диагностическое значение имеют титры 1 : 200. При меньших титрах, которые могут регистрироваться у привитых против тифопаратифов, реакцию Видаля ставят повторно через 3–4 дня. У больных титр реакции нарастает, у привитых – остается прежним.

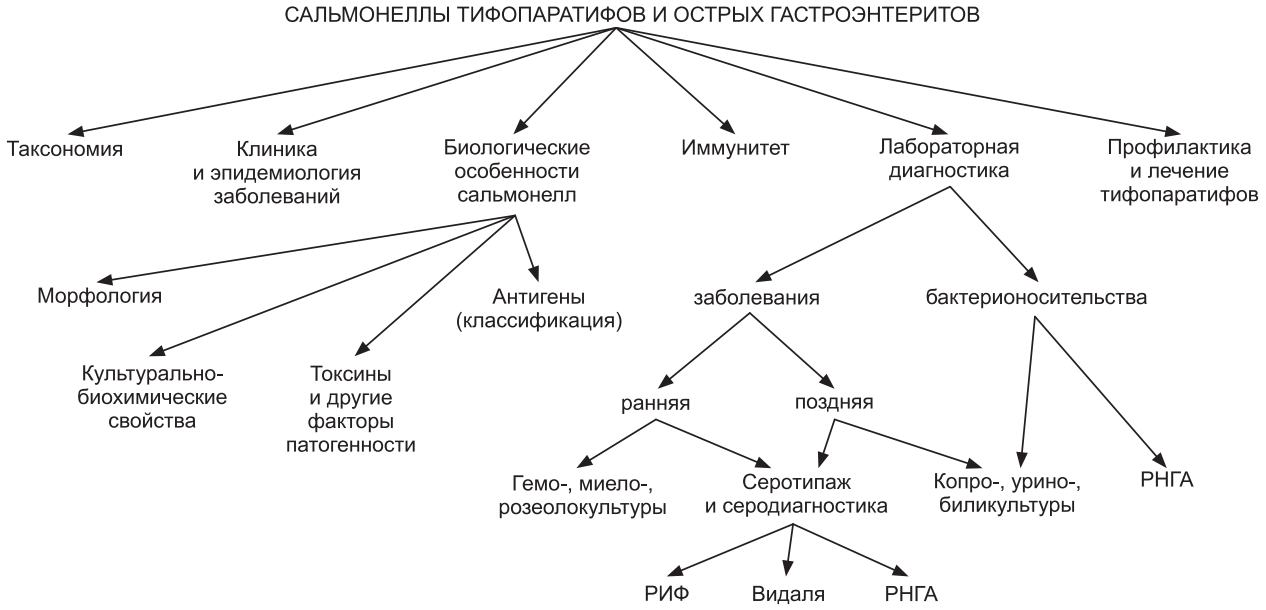
При групповой агглютинации О-диагностикумов этиологический агент определяется по самому высокому титру. Большие затруднения в оценке реакции Видаля возникают у больных брюшным тифом и паратифами, лечившимися антибиотиками, так как они могут изменять антигенную структуру сальмонелл, вследствие чего замедляется или полностью прекращается выработка специфических к ним иммуноглобулинов.

Определенное значение в серодиагностике тифопаратифов придается выявлению в сыворотке больных Н-агглютининов, которые вырабатываются в конце заболевания и Vi-агглютининов – у реконвалесцентов. Для их обнаружения готовят Н- и Vi-диагностикумы, обрабатывая сальмонеллы формалином (Н) и этанолом (Vi).

Более чувствительна и специфична РНГА с эритроцитарными О-, Н- и Vi-диагностикумами, учитывать которую тоже необходимо в динамике.

Выздоровевших от тифопаратифов выписывают из больницы после двухкратных отрицательных результатов бактериологических исследований их испражнений. Носительство сальмонелл у реконвалесцентов и здоровых людей выявляется путем выделения копро-, урино- и биликультур. Рекомендуется ставить РНГА с применением стандартного эритроцитарного Vi-диагностикума (диагностический титр – 1 : 80).

Специфическая профилактика и лечение. Специфическая профилактика брюшного тифа проводится по эпидемическим показаниям. Для этих целей предпочтительнее других брюшнотифозных вакцин использовать Vi-полисахаридную жидкую вакцину ВИАНВАК из капсульно-


САЛЬМОНЕЛЛЫ ТИФОПАРАТИФОВ И ОСТРЫХ ГАСТРОЭНТЕРИТОВ
Таксономия
Клиника и эпидемиология заболеваний
Биологические особенности сальмонелл
Иммунитет
Лабораторная диагностика
Профилактика и лечение тифопаратифов
Морфология
Культурально-биохимические свойства
Токсины и другие факторы патогенности
Антигены (классификация)
заболевания
бактерионосительства
ранняя
поздняя
Гемо-, миело-, розеолокультуры
Серотипаж и серодиагностика
Копро-, урино-, биликультуры
РНГА
РИФ
Видаля
РНГА

Граф 67

го полисахарида, извлеченного из супернатанта бактерий *S. enterica* серовара *typhi* штамма 4446, очищенного ферментативным путем. В очагах брюшнотифозной инфекции контактным лицам назначают фаг. Профилактика острых сальмонеллезных гастроэнтеритов сводится к зооветеринарному надзору на бойнях, мясокомбинатах, санитарному контролю за пищеблоками и детскими учреждениями. Для лечения тифопаратифов назначают левомицетин, антибиотики тетрациклинового ряда, ампициллин, аминогликозиды, бисептол, фуразолидон. Для стимуляции иммуногенеза и снижения процента брюшнотифозных бактерионосителей используется Vi-антиген, а реконвалесцентам-бактерионосителям рекомендуется назначать ампициллин в комплексе с иммуноглобулином.

Возбудители бактериальной дизентерии

Таксономия. Возбудителями бактериальной дизентерии (*dys* – нарушение, *entera* – кишечник) являются четыре вида бактерий, которые, по имени японского ученого К. Шига, открывшего первый из них (1898), называют *Shigella* (табл. 14).

Таблица 14. **Классификация шигелл**

Подгруппы (A, B, C, D) и виды	Серовары	Подсеровары	Ферментация		Индолообразование
			маннита	лактозы	
A *S. dysenteriae*	1–10	–	–	–	±
B *S. flexneri*	1–6 X-, Y-вар	10	+	–	±
S. boydii	1–15	–	+	–	±
D *S. sonnei*	–	–	+	+ Через 48 ч	–

Примечание. В настоящее время циркулируют в основном два вида шигелл – Зонне и Флекснера. При этом на долю первого приходится 50–80 % заболеваний. В последние десятилетия в Европе и Америке регистрируется дизентерия, вызываемая первым сероваром *S. dysenteriae*, который прежде назывался видом Григорьева – Шига.

Клинические и эпидемиологические особенности бактериальной дизентерии. Бактериальная дизентерия – острая или хронически рецидивирующая кишечная инфекция, клинически характеризующаяся симптомами воспаления толстого кишечника и явлениями общей интоксикации. В остром периоде болезни и при ее обострении отмечаются поносы с болезненными спазмами прямой кишки. В тяжелых случаях в стуле содержатся слизисто-гнойные массы с примесью крови.

Дизентерия – антропонозное заболевание. Источником инфекции являются больные различными формами дизентерии и реконвалесценты, бактерионосительство у которых может продолжаться несколько дней и более. Механизм передачи – фекально-оральный (водно-пищевой, контактно-бытовой). Особенно часто дизентерия встречается в летне-осенний сезон года, что связано с частыми приемами воды, употреблением немытых овощей и фруктов, активацией мушиного фактора.

Биологические особенности шигелл. *Морфология.* Шигеллы – палочки с закругленными концами, размером 1,5–3,0 × 0,5–0,7 мкм, неподвижны, спор и капсул не образуют, в мазке располагаются беспорядочно, грамотрицательны.

Культуральные свойства. Дизентерийные бактерии, как и эшерихии, хорошо растут на простых и дифференциально-диагностических средах, где через сутки дают бесцветные, круглые, выпуклые, гладкие, блестящие мелкие колонии. На бульоне шигеллы вызывают диффузное помутнение.

Антигены. У шигелл имеются термостабильные типовые и групповые О-антигены, по которым их подразделяют на подгруппы (виды), серовары и подсеровары. Так, *S. dysenteriae* содержит 10 сероваров; вид Флекснера – 8 сероваров и 10 подсероваров: 1 (*a*, *b*), 2 (*a*, *b*), 3 (*a*, *b*), 4 (*a*, *b*), 5 (*a*, *b*); вид Бойда – 15 сероваров; шигеллы Зонне серологически однородны (имеют лишь один серовар) – спонтанно агглютинируют во всех дизентерийных сыворотках, потому что у них блокирован биосинтез полисахаридов.

Биохимическая активность. По ферментативным признакам шигеллы подразделяют на маннитнегативные

(подгруппа А) и маннитсбраживающие (подгруппы В, С, D), индолообразующие (первый серовар *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*) и не образующие индол (*S. sonnei*).

Отличительный признак шигелл – их способность ферментировать до кислоты глюкозу. Исключение составляют шигеллы Ньюкасл 6-й серогруппы, сбраживающие глюкозу до газа. Вид Зонне расщепляет сахарозу и лактозу (обычно на 3-и сут), декарбоксилирует орнитин, а иногда и аргинин. По отношению к рамнозе и ксилозе шигеллы Зонне делят на четыре ферментативных типа. К I типу относят культуры, сбраживающие рамнозу в 1-е сут и не разлагающие ксилозу, ко II – медленно ферментирующие рамнозу (на 3–4-е сут) и не расщепляющие ксилозу, к III – ферментирующие в течение суток оба углевода, к IV типу – быстро сбраживающие рамнозу и медленно – ксилозу.

Шигеллы не разжижают желатин, не образуют сероводорода, не гидролизируют мочевину, дают положительную пробу с метилротом и отрицательную реакцию Фогеса – Проскауэра.

Факторы патогенности. Шигеллы имеют факторы адгезии и инвазии, благодаря которым они сравнительно быстро проникают внутрь энтероцитов, где выделяемый ими двухкомпонентный цитотоксин Шига нарушает внутриклеточный синтез белка, а также всасывание воды и ионов натрия. Общую интоксикацию при дизентерии вызывает эндотоксин шигелл. При обычных способах инфицирования животных вызвать заболевание у них невозможно. Это удается только при нанесении свежевыделенных культур шигелл на скарифицированную конъюнктиву глаза морской свинки, у которой закономерно возникает гнойный шигеллезный кератоконъюнктивит.

Иммунитет. Естественный иммунитет к бактериальной дизентерии обусловлен гуморально-клеточными факторами и антагонистической активностью нормальной микрофлоры кишечника. В процессе болезни в крови постепенно повышается титр агглютининов, преципитинов, комплементсвязывающих антител, возрастает бактерицидная активность сыворотки. Параллельно с этим слизистая кишечника секретирует IgAS, что сопровождается появлением в ней резистентной к шигеллам популяции эпителиальных клеток. Постинфекционный иммунитет

имеет маловыраженный видоспецифический характер и продолжается от 1–3 мес. до 1 г.

Лабораторная диагностика. Основным методом, подтверждающим диагноз дизентерии, является получение чистой культуры шигелл и ее идентификация до вида и серовара в реакциях агглютинации. Для этого испражнения больного засевают на среду Плоскирева в чашках Петри и помещают их на 18–24 ч в термостат. Вследствие того, что шигеллы Ньюкасл на ней часто не вырастают, кал высевают также на среды Левина и Эндо либо на селенитовые среды обогащения, а затем – на дифференциально-диагностические. Процент высеваемости шигелл возрастает при посеве свежевыделенного кала у постели больного до начала лечения больных этиотропными препаратами, а при дизентерии, вызванной антибиотикозависимыми штаммами шигелл, при добавлении в питательную среду 25 мкг/мл левомицетина и стрептомицина.

На 2-е сут исследования выросшие на дифференциально-диагностических средах мелкие бесцветные колонии после предварительной микроскопии в мазке и висячей капле отсевают для накопления культуры и ориентировочного определения ферментативной активности на комбинированную среду Олькеницкого. Посевы выращиваются в термостате до следующего дня.

На 3-и сут лактозоотрицательную культуру микроскопируют и, установив, что ее популяция состоит из грамотрицательных бактерий, пересевают на ряд Гисса. Параллельно на предметных стеклах ставят РА с видовыми сыворотками и набором дизентерийных адсорбированных сывороток.

На 4-е сут учитывают ферментативную активность в средах Гисса и ставят развернутую РА.

У дизентерийных больных иногда выделяются штаммы, не агглютинирующиеся специфическими сыворотками. В таких случаях рекомендуется ставить РА с кипяченой в течение 1 ч взвесью культуры в надежде обнаружить агглютинабельность термостабильного антигена шигелл. Прибегают также к фагоидентификации, для чего на засеянный шигеллами газон наносят каплю поливалентного дизентерийного фага.

В связи с широким распространением лекарственно-устойчивых штаммов шигелл обязательно определяется антибиотикорезистентность культуры.

Если выделить шигеллы от больного не удается, то с помощью РНГА с антительными эритроцитарными диагностикумами в испражнениях можно обнаружить специфические антигены шигелл. Результаты РНГА учитывают через 3 ч по наличию в лунках полистироловых пластин рыхлого осадка эритроцитов в виде зонтиков.

Серодиагностика. Антитела в крови больных появляются поздно, вследствие этого РА чаще используется для диагностики затяжных форм дизентерии. Диагностическим титром считается 1 : 100 и 1 : 200. Лучшие результаты при острой дизентерии дает РНГА с сыворотками больных и эритроцитарными диагностикумами Зонне и Флекснера. Важно учитывать не только высоту титра этой реакции, но и динамику нарастания антител. Поэтому в конце 2–3-й недели болезни рекомендуется ставить РА повторно.

В экспресс-диагностике дизентерии большие надежды возлагаются на широкое применение реакции иммунофлюоресценции.

Аллергическая проба. В диагностике дизентерии существенную роль может сыграть внутрикожная аллергическая проба с дизентерином, предложенная Цуверкаловым. У 90 % больных она становится положительной на 3–5-е сут заболевания и остается четко выраженной на протяжении 2 недель. Имеются веские доказательства возможности использования аллергической реакции в эпидемиологической практике для выявления скрытых источников инфекции и больных с легко протекающей формой дизентерией.

Специфическая профилактика и лечение. Специфическая профилактика дизентерии не разработана. Парентеральное введение убитых и химических дизентерийных вакцин иммунитета не создает. В летне-осенний период года детям можно назначать поливалентный дизентерийный фаг с пектиновым покрытием в таблетках (1–2 раза в течение 7 дней), лакто- и колибактерин.

Для лечения острой дизентерии применяются левомицетин, тетрациклины, ампициллин, полимиксин М, фуразолидон, бисептол и бактериопрепараты.

ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДИЗЕНТЕРИИ
Таксономия шигелл
Подгруппы
Виды
Серо- и подсеровары
Клиника и эпидемиология заболевания
Биологические свойства шигелл
Морфология
Культуральные свойства
Антигены
Биохимическая активность
Факторы патогенности
Иммунитет
Лабораторная диагностика (методы)
Культурно-биохимический
Выделение культуры
Идентификация
РА
Фаготипаж
Колицинотипирование
Определение антибиотикограммы
Серодиагностика
Аллергическая проба
Профилактика и лечение заболевания

Граф 68

Клебсиеллезы

Таксономия. Род *Klebsiella* в настоящее время включает два вида: 1. *K. pneumoniae* с тремя ее подвидами – а) *pneumoniae*, открытый Е. Клебсом (1875) и К. Фридлендером (1882), б) *ozaenae*, впервые изученный Р. Абелем, и в) *rhinoscleromatis*, описанный А. Фришем и Н.Н. Волковичем; 2. *K. oxytoca*.

Клиника и эпидемиология клебсиеллезов. *Клебсиеллезная,* или *фридлендеровская пневмония,* – острое лихорадочное заболевание, сопровождающееся кашлем с выделением вязкой мокроты. Начавшись с очаговой бронхопневмонии, может приобретать сливной характер, охватывая значительную часть легких. При этом пораженная ткань легких, пропитываясь массой капсульных пневмобактерий, резко уплотняется.

Озена (*ozein* – пахнуть), или зловонный насморк – хроническое заболевание, в котором различают три стадии. В начальном периоде у больных отмечается обильное слизистое отделяемое из носа, постепенно делающееся вязким, которое превращается во второй стадии в засыхающие корки, издающие резкое зловоние. В третьей стадии озены происходит атрофия слизистой оболочки носовой полости, нередко она может захватывать глотку, гортань, а также трахею и бронхи.

Склерома (*scleroma* – уплотнение) протекает в двух формах – продуктивной и дистрофической. Для продуктивной формы характерно появление грануломатозных разрастаний в виде плотных инфильтратов, возникающих в начале болезни в области носа и носоглотки (отсюда *rhinos* + *scleroma* – название возбудителя), а далее – в гортани, трахее и бронхах, что приводит к затруднению глотания, дыхания и потере голоса. При гистологических исследованиях в соединительно-тканной основе склеромных узлов вокруг врастающих в нее капилляров обнаруживаются лимфоидные клетки, плазмоциты и, главное, гигантские клетки Микулича со светлой пенистой цитоплазмой, в которой находят палочки Фриша – Волковича. Дистрофия инфильтратов приводит к атрофии слизистой оболочки дыхательных путей и развитию склеротических процессов.

Пневмония Фридлендера встречается повсеместно; склерома – чаще в западных областях Украины и Респуб-

лики Беларусь, Америке и Индонезии; озена – в Восточной Азии, Испании, Болгарии, Греции. Контагиозность склеромы и озены не доказана. Не выяснены также пути и способы заражения ими здоровых людей.

Клебсиеллез, вызванный *K. oxytoca*, клинически проявляется в виде менингита, нефрита, цистита, полиартритов, конъюнктивитов.

Биологические особенности клебсиелл. *Морфология.* Клебсиеллы – кокковидные (0,6 × 0,3 мкм) или толстые грамотрицательные бактерии (6,0 × 1,0 мкм), окруженные хорошо контурированной капсулой, которая часто покрывает не одну, а две-три особи, располагающиеся в мазке беспорядочно. Спор и жгутиков не имеют.

Культурально-биохимические свойства. Клебсиеллы растут на простых слабощелочных средах при температуре 35–37 °С. Вырастая на бульоне, вызывают его помутнение, нередко с образованием пленки. На питательном агаре формируют пышные слизистые колонии (рис. 87), которые на средах Эндо и Плоскирева приобретают красный цвет с металлическим блеском, что прямо указывает на способность клебсиелл ферментировать лактозу. Способны расщеплять глюкозу, маннит, сахарозу, мочевину. Утилизируют цитрат. Индолообразование свойственно только *K. oxytoca*.

Антигены, факторы патогенности, токсины. У клебсиелл имеются соматические О- и капсульные К-антигены, по которым соответственно различают 5 и 80 сероваров. Основными факторами патогенности у них являются полисахаридная капсула и фимбрии, обеспечивающие адгезию. Продуцируют два токсина, один из которых аналогичен энтеротоксину эшерихий, а другой, обладая цитотоксичностью, опосредует проникновение клебсиелл в кровоток.

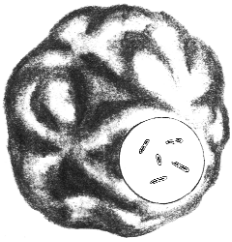


Рис. 87. Свежевыросшая колония клебсиелл и их морфология

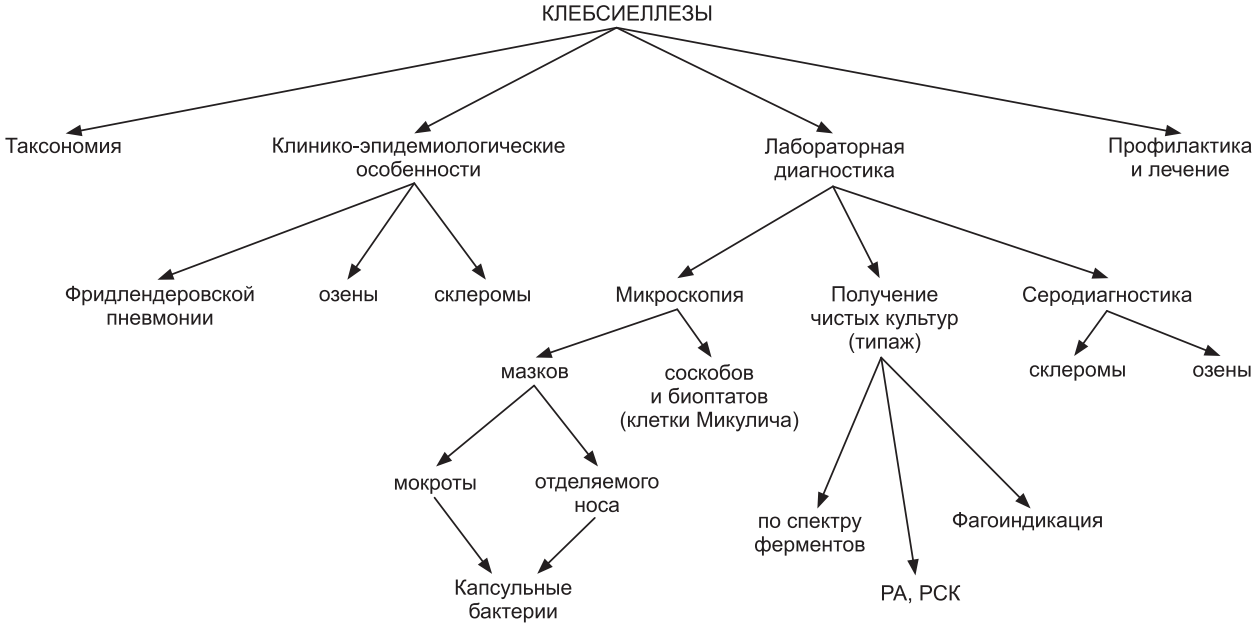
Лабораторная диагностика. Материалом исследования при фридлендеровской пневмонии является мокрота, при склероме – соскоб со слизистой оболочки верхних дыхательных путей или кусочки биоптата склерозированной ткани, при озене – секрет или корочки.

Основные методы лабораторной диагностики – выявление в мазках коротких грамотрицательных, попарно расположенных палочек, окруженных общей массивной капсулой, а в гистологических срезах биоптатов – гигантских клеток Микулича, заполненных желатинообразным веществом с наличием в нем тех же бактерий. Мазки окрашивают по Граму и по Бурри – Гинсу, а срезы – гематоксилин-эозином или по Романовскому – Гимзе.

С целью выделения клебсиелл содержащие их материалы отсевают на: 1) простой питательный агар; 2) глицериновый агар; 3) бромтимоловый и бромкрезолпурпурный агар с мочевиной, где блестящие сочные колонии клебсиелл приобретают желто-зеленый или голубой цвет. Далее колонии клебсиелл пересевают на скошенный агар для получения чистой культуры. В последующем ее отсевают на среду Симмонса и ряд Гисса и бульон Клорка для определения спектра ферментов (табл. 15). Параллельно с этим на предметных стеклах ставят реакцию набухания капсул клебсиелл и РА, используя диагностические К-антисыворотки, вводя в них для определения О-антигена автоклавированную в течение 2,5 ч культуру клебсиелл, а для выявления К-антигена – интактную. При наличии

Таблица 15. **Дифференциация подвидов *K. pneumoniae***

Признаки	Подвиды		
	Pneumoniae	*Ozaenae*	*Rhinoscleromatis*
Ферментация лактозы	+	±	–
Ферментация глюкозы	+ (до газа)	+ (до газа) +	–
Рост на среде Симмонса	+	±	–
Наличие уреазы	+	∓	–
Метилрот-реакция	–	+	+
Реакция Фогес – Проскауэра	+	–	–
Антигенная структура	O1, 3–5 K1–3, 7–80	O2B : K4 O2B : K5 O2B : K6	O2A : K3
Патогенность для белых мышей и куриных эмбрионов	+	+	–


КЛЕБСИЕЛЛЕЗЫ
Таксономия
Клинико-эпидемиологические особенности
Лабораторная диагностика
Профилактика и лечение
Фридлендеровской пневмонии
озены
склеромы
Микроскопия
Получение чистых культур (типаж)
Серодиагностика
мазков
соскобов и биоптатов (клетки Микулича)
склеромы
озены
мокроты
отделяемого носа
Капсульные бактерии
по спектру ферментов
РА, РСК
Фагоиндикация

Граф 69

специфических фагов прибегают к фагодиагностике. Изредка исследуют патогенность выделенных культур, заражая ими белых мышей и куриные эмбрионы.

Серодиагностика. Для определения иммуноглобулинов в сыворотке больных склеромой и озеной ставят РСК. В качестве антигенов используют химические диагностикумы *K. pneumoniae rhinoscleromatis* и *K. pneumoniae ozaenae*, которые готовит БелНИИЭМ. Предпочтительнее ее ставить на холоде.

Лечение. Больные начальной формой озены и склеромы чаще всего выявляются при профосмотрах. Их трудоустраивают на такую работу, где исключается вредное действие факторов, идуцирующих атрофические процессы в слизистых дыхательных путях. Лечение фридлендеровской пневмонии и озены проводится антибиотиками широкого спектра действия. Вводятся они парентерально или в виде ингаляций.

Протеи и провиденция

Таксономия. Роды *Proteus* и *Providencia* – бактерии триба *Proteae*. При этом род протея («многоликого водяного бога») включает отличающихся большим разнообразием роста *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. morganii*, *P. rettgeri*, а род *Providencia* (название местности в США) представлен двумя близкородственными видами – *P. alcalifaciens* и *P. stuartii*.

Перечисленные виды энтеробактерий широко обсеменяют окружающую среду, в частности с большим постоянством обнаруживаются в хозяйственно-бытовых сточных водах и в недоброкачественных пищевых продуктах. Являются условно-патогенными микробами, вызывающими внутрибольничные инфекции: нагноение ран, энтериты, циститы, пиелиты и даже септические процессы.

Биологические особенности протея и бактерий рода провиденция. *Морфология.* Протеи и бактерии рода провиденция – грамотрицательные, не образующие спор и капсул, подвижные (или неподвижные) палочки размером 1–3 × 0,4–0,6 мкм, располагающиеся в мазке поодиночно или короткими неправильными цепочками.

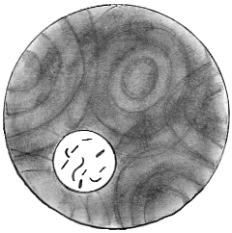


Рис. 88. Колония Н-формы протея и его морфология

Культивирование. Выращиваются при 37 °С, но могут хорошо расти при комнатной температуре. Выделяются на простых и дифференциально-диагностических средах. О-формы протеев, лишенные жгутиков, через 24 ч образуют выпуклые, сероватые, бесцветные колонии диаметром 1–2 мм, а Н-штаммы, обладающие перитрихиальными жгутиками, быстро, словно струя выдоха (*Hauch* – дыхание) по холодному стеклу, расползаются (роятся), образуя голубовато-дымчатые круги налета на поверхности питательного агара в чашках Петри (рис. 88). Учитывая это, И. Шукевич предложил выделять Н-формы *P. vulgaris* из материалов, богатых посторонней микрофлорой, засевая их в конденсационную воду скошенного агара. Быстро размножаясь и роясь на нем, они через 16–18 ч достигают верхней части косяка в чистой культуре, «самовыделяясь» из микробных ассоциаций. Дайен предложил использовать феномен роения как дифференциальный тест: посев протеев с одинаковыми Н-антигенами на противоположные полюса чашки с МПА приводит к слиянию колоний, а с разными по антигенной структуре – к образованию демаркационной линии на границе роящихся штаммов. Род *Providencia* отличается способностью утилизировать цитрат и расти на среде с цианистым калием.

Биохимические свойства. Бактерии триба *Proteae* независимо от вида ферментируют глюкозу (некоторые до газа), продуцируют триптофаназу и образуют индол. Весь род *Proteus* отличается интенсивным образованием уреазы, расщепляющей мочевину. Самым широким спектром ферментов обладают *P. vulgaris* и *P. rettgeri*. Наименее биохимически активен *P. morganii*. Бактерии рода *Providencia* кроме глюкозы ферментируют сахарозу и адонит, а *P. stuartii* – инозит и трегалозу.

Антигены. По структуре О- и Н-антигенов в составе *P. vulgaris* и *P. mirabilis* выявлено 110 сероваров, у *P. morganii* – 66, у *P. rettgeri* – 45, а у бактерий рода *Providencia* – 150.

Факторы патогенности и токсины. Основными факторами агрессивности у протеев являются протеазы, нару-

шающие структуру IgG и IgA, уреаза, разлагающая мочевину до хлорида аммония, вызывающего воспаление, гемолизины, гемагглютинины и фимбрии, склеивающие эритроциты, эндотоксины.

Антибиотикорезистентность. Протеи и, в меньшей мере, бактерии рода провиденция устойчивы к полимиксину, пенициллину (кроме *P. mirabilis*) и тетрациклину (исключая *P. morganii*). Высокочувствительны к цефалоспоринам.

Лабораторная диагностика. Микробиологическая диагностика болезней, вызванных бактериями рода *Proteus* и *Providencia*, основана на выделении чистых культур возбудителей и их дифференциации друг от друга по спектру ферментов (табл. 16).

Таблица 16. **Дифференциация *Proteus* и *Providencia***

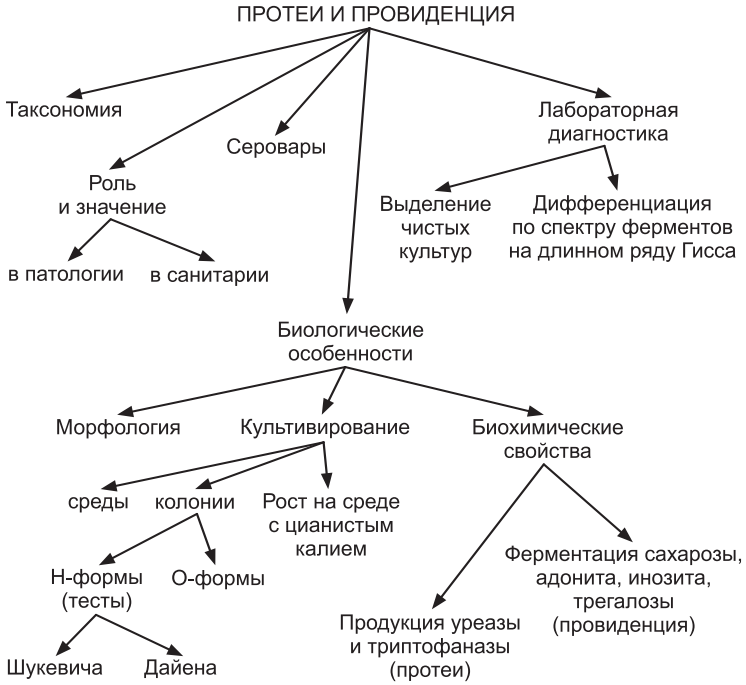
Виды	Ферментация								Образование		Разжижение желатина
	глюкозы	мальтозы	маннита	сахарозы	инозита	ксилозы	адонита	индола	сероводорода	уреазы	
P. vulgaris	+	+	−	+	−	±	−	+	+	+	+
P. mirabilis	+	−	−	+	−	+	−	−	+	+	+
P. morganii	+	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−
P. rettgeri	+	−	+	±	+	±	+	+	−	+	−
Providencia alcalifaciens	±	−	−	±	−	−	+	+	−	−	−
P. stuartii	±	−	−	±	+	−	±	+	−	−	−

Примечание. «+» – положительный результат; «−» – отрицательный; «±» – непостоянный.

От всех энтеробактерий протеи отличаются способностью разлагать фенилаланин до фенилпировиноградной кислоты, что приводит при наличии в среде $FeCl_2$ к ее окрашиванию в коричнево-зеленый цвет.

Серовариантный типаж протеев и бактерий рода провиденция проводят с помощью диагностических О- и Н-сывороток.

Лечение. Протеи и провиденция высокоустойчивы к антибиотикам. В лечении болезней, вызванных ими, используются полусинтетические пенициллины (в частности, ампициллин) и цефалоспорины третьего поколения (например, цефоперазон).



Граф 70

Холерный вибрион

Таксономия. Холеру вызывают *Vibrio cholerae* биовар *asiaticae*, *Vibrio cholerae* биовар *eltor* и серовар O139 (Бенгал). Азиатский (классический) биовар, выделенный в 1883 г. Р. Кохом в Египте; биовар *eltor*, полученный Ф. Готшлихом в 1906 г. на карантинной станции Эль-Тор; бенгальский серовар O139, идентифицированный совсем недавно, после того как в 1993 г. он вызвал вспышку холе-

ры в Юго-Восточной Азии; неагглютинирующиеся вибрионы (НАГи); галофильный *V. parahaemolyticus*, вызывающий тяжелые диареи в Азии, Африке и Южной Америке; возбудитель гнойных раневых процессов и септицемий *V. vulnificus*, чаще всего встречающийся в теплых регионах; прочие патогенные виды вибрионов-эндемиков, а также нехолерные вибрионы-кислотообразователи включены в род *Vibrio* семейства *Vibrionaceae*.

Клиника и эпидемиология холеры. Холера (желчеистечение) – острая кишечная, особо опасная инфекция, сопровождающаяся резким обезвоживанием и обессоливанием организма. В развитии болезни различают три периода: 1) холерный энтерит, или холерный понос, продолжительностью 1–2 сут; 2) холерный гастроэнтерит – обильный понос и многократная рвота, уменьшение диуреза, появление судорог; 3) холерный алгид – резкое снижение температуры, цианоз, глубокое нарушение водно-солевого обмена (дряблость кожи, охриплость голоса), ослабление сердечной деятельности. При благоприятном течении цикличность проявления холеры прерывается и наступает выздоровление, в тяжелых случаях вслед за алгидом развивается асфиксия, заканчивающаяся смертью. Возможны легкие и тяжелейшие формы инфекции, например сухая холера, которая при отсутствии поноса и рвоты в результате резкой интоксикации дает летальный исход в течение 12–24 ч.

Источником инфекции является человек – больной и бактерионоситель. Механизм передачи – фекально-оральный. Важную роль в распространении инфекции играют вода, пищевые продукты, мухи. Заболевают люди разных возрастов, но особенно восприимчивы к холере дети и старики, а также лица со сниженной резистентностью.

Биологические особенности возбудителей холеры. *Морфология и культуральные свойства.* Холерные вибрионы (*vibratio* – колебание) имеют форму тонких, изогнутых в виде запятой палочек размерами 1–4 × 0,3 мкм, с полярно расположенным жгутиком. От других жгутиковых бактерий вибрионы-монотрихи отличаются очень активной подвижностью, которую даже сравнивают с «полетом ласточки». Спор и капсул не образуют. В мазках из культур и фекалий располагаются в виде нежной паутинки или стайки маленьких рыбешек. Хорошо красятся водным фуксином, грамотрицательны.

Холерные вибрионы растут при температуре 35–37 °С, являются факультативными анаэробами, алкалифилами и самыми непритязательными к питательным веществам бактериями. Для их выделения используют жидкие среды обогащения (1 %-ная пептонная вода) и накопления (пептонная вода с теллуритом калия 1 : 100 000), щелочной МПА и другие плотные элективные и дифференциально-диагностические среды со щелочной реакцией (pH 7,4–8,6), в которые нередко добавляют ингибиторы посторонней микрофлоры и активаторы роста холерных вибрионов.

В 1 %-ной пептонной воде холерные вибрионы вырастают в виде нежной пленки-паутинки через 6–8 ч, а при наличии в ней теллурита калия – спустя 12–27 ч. На плотных средах они вырастают через 14–16–24 ч. В зависимости от состава сред образуются разные колонии: 1) на щелочном МПА – дисковидные, выпуклые, прозрачные, с голубоватым оттенком колонии-росинки (рис. 89); 2) на щелочной таурохалат-теллурит-желатиновой среде Монсура – серовато-черные; 3) на японском бакто-агаре TCBS (89 г тиосульфат-цитрат-бромтимолсахарозы на 1 л воды) – крупные, плоские, желтые; 4) на дифференциально-диагностической среде Аронсона с сахарозой, составленной по типу Эндо, – вначале мелкие, бесцветные, а затем крупные, ярко-красные, с бледно-розовым ободком.

Биохимическая активность. Холерные вибрионы расщепляют сахарозу, маннозу, но не ферментируют арабинозу и по наличию этих гликозидаз относятся к первой группе Хейберга; весьма активно, часто уже через 6 ч роста, разлагают крахмал; с большим постоянством ферментируют лактозу; декарбоксилируют орнитин и лизин; разжижают желатин; образуют индол и аммиак; свертывают молоко; обладают оксидазной активностью. Для быстрой идентификации вибрионов используется трехсахарная агаровая среда Клиглера, по углеводам и индикатору идентичная среде Олькеницкого, но вместо соли Мора и гипосульфита содержащая сернокислое закисное железо, сульфат и тиосульфат натрия как тест на сероводород.

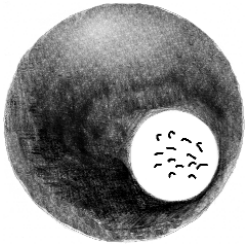


Рис. 89. Колония холерного вибриона и его морфология

Антигены. Возбудители холеры имеют видо- и типоспецифические термостабильные О-антигены и групповые термолабильные Н-антигены. По структуре О-антигена выделяют 139 серологических групп вибрионов. Агглютинирующиеся в одинаковом титре О1-антисывороткой классический вибрион и эльтор отнесены к первой серогруппе. При этом внутри каждого биовара выделяют серовары Инаба, Огава и Гикошима, отличающиеся друг от друга отдельными фракциями О1-антигена. Так, серовар Огава имеет А и В, Инаба – А и С, а Гикошима – фракции А, В и С. Дифференцируются они, естественно, типоспецифическими сыворотками. Вибрионы О139 не агглютинируются ни видовыми, ни типоспецифическими О1-сыворотками. По групповому Н-антигену вибрионы подразделяют на группы А и В. В группу А входят холерные вибрионы, а в группу В – вибрионы, отличающиеся от холерных по биохимическим свойствам.

Токсины и факторы патогенности. Холерные вибрионы секретируют эндотоксин и два типа экзотоксинов. Эндотоксин, освобождающийся при автолизе холерных вибрионов, является липополисахаридом, по активности сходным с эндотоксинами грамотрицательных бактерий. Что касается экзотоксинов, то один из них аналогичный тому, которые продуцируют токсигенные энтеробактерии, а другой – холероген, определяющий патогенез холеры. Состоит он из двух компонентов – А и В. В-компонент, взаимодействуя с рецепторами энтероцитов, обеспечивает проникновение в них А-компонента. Последний активирует аденилатциклазу, что приводит к увеличению содержания цАМФ и нарушению в последующем водно-солевого обмена, а точнее говоря – выходу жидкости и электролитов из клеток либеркюновых желез в просвет кишечника. Одновременно холерные вибрионы продуцируют цитотоксин, оказывающий цитопатическое действие на клетки, муциназу, разжижающую прикрывающую энтероциты слизь, и нейраминидазу, отщепляющую нейраминовую кислоту, что может способствовать развитию холерного синдрома.

Иммунитет. Естественная резистентность организма человека к холере объясняется высокой кислоточувствительностью холерного вибриона и быстрым его обезвреживанием в соляной кислоте желудка. Развивающийся при

холере иммунитет носит гуморальный характер и обусловлен вибриолизинами, вибриоцидинами, агглютининами и антитоксинами, нейтрализующими энтеротоксины холерных вибрионов. В сыворотке больных холерой обнаруживается IgM, IgG и IgA, а на слизистой тонкого кишечника и в копрофильтратах – сравнительно высокие титры секреторных IgAS, препятствующих взаимодействию возбудителя с эпителием слизистой оболочки.

Лабораторная диагностика. Исследованию подлежат испражнения и рвотные массы больных; фекалии реконвалесцентов, получаемые после приема ими 20–30 г сульфата магния для того, чтобы из верхнего отдела кишечника и желчного пузыря в них попали вибрионы; фекалии вибриононосителей, взятые тампоном из прямой кишки; отрезки тонкой кишки и желчного пузыря с частью печени от трупов; вода (1 л) и пищевые продукты (около 200 г). Все материалы отбирают в чистую посуду, в которой не должно быть даже следов дезинфицирующих веществ. Их необходимо исследовать в ближайшие 3 ч с момента взятия. В исключительных случаях допускается консервация в щелочной пептонной воде без или с добавкой теллурита калия.

Основным в лабораторной диагностике холеры является: 1) обнаружение в мазках из испражнений изогнутых тонких грамотрицательных палочек, располагающихся в виде стайки рыб; 2) активная подвижность вибрионов в раздавленной и висячей каплях; 3) мгновенная их иммобилизация при добавлении О-противохолерной сыворотки; 4) образование пленки-паутинки на 1 %-ной пептонной воде (5–6 ч) и характерных колоний-росинок на щелочном МПА (12 ч); 5) их агглютинабельность в противохолерных сыворотках и лизабельность типовыми холерными фагами С и Эль-Тор.

Бактериологическое исследование. Проводится круглосуточно, так как окончательные результаты должны быть выданы через 30–36 ч.

I *этап*. Из испражнений и рвотных масс готовят мазки, высушивают на воздухе, фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова. Одни из них окрашивают по Граму, другие – обрабатывают люминесцирующими холерными сыворотками. Холерные вибрионы под иммерсионным микроскопом имеют вид тонких изогнутых грамотрицательных палочек. В люминесцентном микроскопе

вокруг них наблюдаются ободки яркого свечения. Параллельно с этим изучаются раздавленные и висячие капли. Изучив морфологию и подвижность вибрионов, дают первое заключение о наличии в материале возбудителя холеры. Одновременно испражнения высевают на элективную для холерного вибриона простую 1 %-ную щелочную пептонную воду; ЩПВ с теллуритом калия или таурохолат-теллуритом; среду Монсура; TCBS и среду Аронсона. Все посевы помещают в термостат при 37 °С.

II *этап*. Через 5–6 ч инкубации в термостате на пептонной воде вырастает едва видимая пленка, из которой делают мазки, препараты раздавленной и висячей капли. Пленку агглютинируют на предметном стекле в капле О1-холерной сыворотки и выдают второе заключение о природе выделенного вибриона, сразу же производя пересев пленки на вторую пептонную воду и щелочной мясопептонный агар.

III *этап*. Спустя 12–16 ч от момента посева испражнений на среды, изучают морфологию, подвижность и агглютинабельность повторно выросшей на ЩПВ пленки и подозрительных колоний на щелочном агаре, средах Монсура, TCBS и Аронсона. Определив, что популяции пленок и колоний состоят из вибрионов, агглютинирующихся в О-холерной сыворотке, разведенной 1 : 100, и в одной из типовых сывороток Инаба и Огава (вариант Гикошима агглютинируется в той и другой), разведенных 1 : 50, колонии пересевают для накопления культуры и определения ферментативных свойств на среду Клиглера, помещая ее в термостат.

Холерные колонии можно отсевать в бульон, и после подращивания (3–4 ч) ставить с молодой культурой развернутую РА; пересевать ее на пестрый ряд Гисса, чтобы установить принадлежность к I группе Хейберга; проверять ее чувствительность к типовым холерным фагам С и Эль-Тор 2, что может ускорить идентификацию вибрионов.

IV *этап*. На заключительном этапе (18–36 ч): 1) определяют гликозидазную и протеолитическую активность полученной культуры; 2) ее чувствительность к холерным фагам; 3) агглютинабельность в развернутой РА с О-холерной сывороткой.

Дифференциация биоваров холерного вибриона. Определение биоваров основано на использовании ряда тестов.

Вибрионы Эль-Тор: 1) лизируются фагом Эль-Тор, а классические – фагом С; 2) растут на средах с полимиксином, а классические – ингибируются антибиотиком; 3) агглютинируют и лизируют эритроциты курицы и барана, а классические – по гемагглютинирующей и гемолитической способности вариабельны; 4) дают положительные реакции Фогес – Проскауэра и гексаминовый тест (табл. 17).

Таблица 17. **Дифференциальные признаки холерных биоваров**

Признаки	*V.cholerae* биовар *asiaticae*	*V.cholerae* биовар *eltor*	Серовар O139
Чувствительность к классическому монофагу	Лизируется	–	–
Чувствительность к монофагу *eltor*	–	Лизируется	–
Чувствительность к полимиксину В (50 ЕД в 1 мл среды)	Не растет	Растет	Растет
Реакция гемагглюти-нации куриных эритроитов	–	±	±
Гемолиз бараньих эритроцитов	–	+	–
Реакция Фогеса – Проскауэра	∓	±	±
Гексаминовый тест	–	+	–

Чувствительность к диагностическим фагам выявляют по обычной методике. Холерные фаги С и Эль-Тор наносят на культуры в исходных концентрациях и 10-кратных разведениях. В положительных случаях на газоне холерной культуры образуются стерильные пятна.

Чувствительность к полимиксину определяют путем высева выделенной культуры на чашки Петри с питательным агаром, содержащим 50 ЕД полимиксина М или В в 1 мл питательной среды.

РГА куриных эритроцитов ставится на предметном стекле. В капле 0,85 %-ного изотонического раствора натрия хлорида растирают петлю 18-часовой культуры вибриона и добавляют каплю 2,5 %-ной взвеси куриных эритроцитов.

Гемолиз бараньих эритроцитов (проба Грейга) наступает через 2 ч после инкубации их с бульонной культурой холерных вибрионов Эль-Тор в термостате при 37 °С.

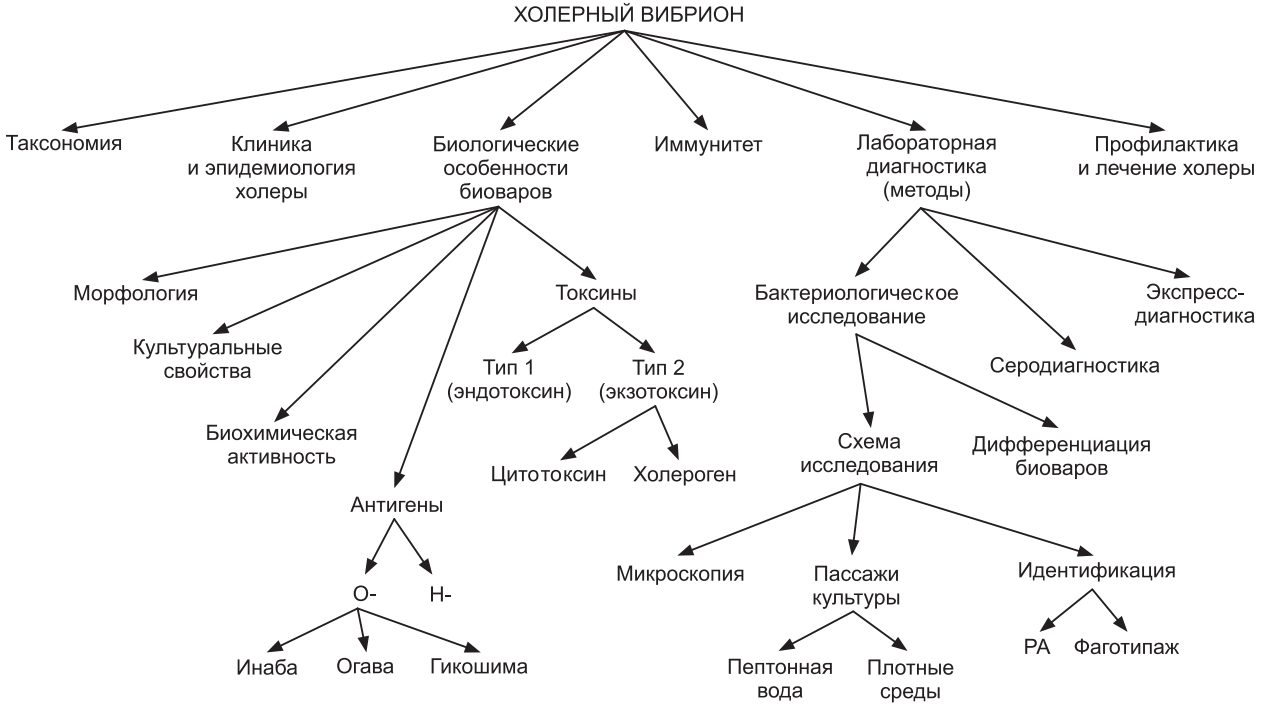
Реакция Фогеса – Проскауэра основана на способности вибрионов Эль-Тор образовывать ацетилметилкарбинол в глюкозофосфатном бульоне Кларка, что устанавливается покраснением среды после прибавления к посеву раствора α-нафтола и калия гидроксида.

Гексаминовый тест ставится с односуточной бульонной культурой вибриона, петлю которой засевают в 1 мл глюкозогексаминовой среды. После инкубации в термостате при температуре 37 °С в течение 6–24 ч вибрион Эль-Тор изменяет цвет среды из зеленого в желтый.

При выделении НАГов, часть из которых может оказаться истинно холерными, утратившими в процессе изменчивости способность агглютинироваться в О-холерной сыворотке, необходимо изучить способность культуры разжижать желатин, расщеплять крахмал (реакция Кадамо), образовывать индол; определить оксидазную и декарбоксилазную активность и, главное, путем повторных пересевов добиться восстановления исходной антигенной структуры и агглютинабельности.

Исследования на носительство. Во время вспышки холеры проводят массовое исследование на носительство холерного вибриона. Для этого фекалии от десяти обследуемых лиц засевают в одну колбу, содержащую 200 мл 1 %-ной пептонной воды и О-холерную агглютинирующую сыворотку, разведенную до половины титра. Колбу ставят в термостат при температуре 37 °С. Через 3–4 ч размножившиеся холерные вибрионы агглютинируются и хлопьями оседают на дно. Из осадка делают мазок и препарат висячей капли. Если в них обнаруживаются грамотрицательные подвижные вибрионы, то каждый из десяти обследуемых рассматривается как носитель, и взятые от него фекалии исследуются индивидуально, как от больного холерой.

Серодиагностика. Иммунологические реакции используются для ретроспективной диагностики и определения напряженности противохолерного иммунитета. Чаще ставят РА. Сыворотка крови при этом разводится не изотоническим раствором хлористого натрия, а 1 %-ной пептонной водой, в которой возможно подращивание используемых в качестве антигена холерных вибрионов. Реже определяют наличие в крови вибриоцидных анти-


ХОЛЕРНЫЙ ВИБРИОН
Таксономия
Клиника и эпидемиология холеры
Биологические особенности биоваров
Иммунитет
Лабораторная диагностика (методы)
Профилактика и лечение холеры
Морфология
Культуральные свойства
Биохимическая активность
Антигены
Токсины
Тип 1 (эндотоксин)
Тип 2 (экзотоксин)
Цитотоксин
Холероген
О-
Н-
Инаба
Огава
Гикошима
Бактериологическое исследование
Серодиагностика
Экспресс-диагностика
Схема исследования
Дифференциация биоваров
Микроскопия
Пассажи культуры
Идентификация
Пептонная вода
Плотные среды
РА
Фаготипаж

Граф 71

тел. За титр вибриоцидных антител принимают максимальное разведение инактивированной сыворотки больного, которая в присутствии определенной дозы комплемента вызывает в течение часа инкубации в термостате гибель 50 % вибрионов стандартной культуры. Положительный ответ дают при наличии агглютинирующих антител в титре 1 : 80–1 : 320, а вибриоцидных – 1 : 1000. Часто эти реакции приходится ставить повторно через 3–4 дня.

Экспресс-диагностика холеры. Ускоренная диагностика основана на: 1) использовании иммунофлюоресцентной микроскопии мазков, обработанных мечеными противохолерными антителами, и установлении в фазово-контрастном микроскопе феномена иммобилизации вибрионов при воздействии О-холерной или серовариантных специфических сывороток; 2) РА выделенных вибрионов в пептонной воде с О-холерной сывороткой или РНГА при выявлении холерного антигена с помощью антительных эритроцитарных диагностикумов; 3) определении вибриоцидных антител в сыворотках больных по феномену подавления ими сахаролитических свойств вибрионов; 4) положительной реакции лизиса вибрионов диагностическими фагами.

Специфическая профилактика и лечение. Специфическая профилактика холеры проводится корпускулярной убитой вакциной Эль-Тор из штаммов Огава и Инаба или холероген-анатоксина+соматический Аг холерного вибриона Инаба 509-В. Первый биопрепарат предназначен для взрослых и детей 2-летнего возраста, второй – для взрослых и детей старше 7 лет. Вводят их подкожно в возрасте старше 15–18 лет по 0,5 мл, а детям от 2–7 лет – 0,1–0,15 мл, старшим – от 0,2 до 0,4 мл. Вакцины создают слабый иммунитет продолжительностью 3–6 мес. Экстренная профилактика в очаге холеры осуществляется тетрациклином перорально по 300 000 ЕД 4 раза в день в течение 5 сут. Лечение основано на восстановлении водно-солевого баланса организма больного. С этой целью вводятся стандартные солевые растворы натрия и калия. Этиотропная терапия осуществляется препаратами тетрациклинового ряда.

Возбудители чумы и иерсиниозов

Таксономия. Возбудитель чумы открыт во время третьей пандемии в Гонконге А. Иерсэном (1894) и в его честь назван *Yersinia pestis* (чума). Полстолетия спустя к роду иерсиний отнесли родственные по генотипу возбудителю чумы *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, вызывающие иерсиниозы, проявляющиеся энтероколитом (илеитом, узловатой эритемой, септицемией) и псевдотуберкулезом (острым брыжеечным аденитом). Вместе взятые они входят в семейство энтеробактерий, с которыми легко коньюгируют.

Клиника и эпидемиология. Чума – особо опасная, очень тяжелая кровяная инфекция, склонная к широкому распространению и дающая высокий процент летальности (от 20 до 75 %). Она проявляется в виде бубонной, легочной, кишечной, септической форм, что обусловлено местом входных ворот инфекционного начала и политропизмом возбудителя к тканям.

Заболевание характеризуется высокой температурой и ознобами, помрачением сознания и бредом. На этом фоне при бубонной форме чумы увеличиваются, спаиваются, превращаются в плотные болезненные пакеты (бубоны) регионарные лимфатические узлы, которые могут нагнаиваться и вскрываться с образованием долго не заживающих язв. Чаще поражаются паховые, реже подмышечные и шейные лимфатические узлы. Легочная чума проявляется симптомами тяжелейшей пневмонии – резкой болью в груди, сухим, а затем резким влажным кашлем с выделением большого количества пенистой кровянистой мокроты. Кишечная форма характеризуется кровавым поносом, а септическая – обильными кровоизлияниями в кожные покровы, ткани и органы.

Чума является зоонозной трансмиссивной природно-очаговой инфекцией, поражающей около 300 видов животных. Основные источники заболевания – крысы, суслики, песчанки, полевки, сурки, мышевидные грызуны. Бубонной формой чумы человек заражается через укусы блох и других кровососущих насекомых-эктопаразитов грызунов. При возникновении сепсиса и развитии вторичной пневмонии возбудитель чумы передается аэрогенно-капельным путем, что приводит к первичной легоч-

ной чуме и ее эпидемическому распространению. Возможны и другие пути передачи инфекции (контакт с грызунами, употребление зараженных продуктов и воды).

Биологические особенности возбудителей чумы. *Морфология.* Возбудитель чумы отличается выраженным полиморфизмом, но в мазках из свежевыросшей при температуре 37 °С культуры имеет овоидную форму и небольшие размеры (1–2 × 0,3–0,7 мкм). Палочки чумы не образуют спор, неподвижны, формируют микрокапсулы. Окрашиваются всеми анилиновыми красителями, как правило, более интенсивно по полюсам, вследствие чего бактерии чумы называют биполярами. Грамотрицательны. *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* отличаются отсутствием видимой капсулы и наличием у них перитрихиальных жгутиков.

Культивирование. Палочки чумы выращиваются в широком температурном диапазоне (от 5 до 45 °С) и аэробных условиях. На МПА через 1 сут с момента посева вирулентные штаммы образуют мутно-белые с фестончатой каймой вокруг R-формы колоний, напоминающие кружевные платочки (рис. 90). Иногда они приобретают коричневатый или грязно-зеленый пигмент, при диссоциации возникают невирулентные О- и S-колонии. В бульоне бактерии чумы растут в виде рыхлой пленки со свисающими вниз нитями-сосульками, или «сталактитами». *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* на питательном агаре формируют гладкие, реже шероховатые колонии. В бульоне вызывают помутнение и образуют хлопьевидный осадок.

Биохимическая активность. Иерсинии каталазоположительны и оксидазоотрицательны. Протеолитическими свойствами не обладают. Непостоянно расщепляют ряд углеводов и оксикислот. По способности ферментировать глицерин и углевод мелибиозу различают три биовара иерсиний чумы: Среднеазиатский и Иранский *medievalis* (+, +), Центральноазиатский и Центральноафриканский *antigua* (+, –) и космополитный *orientalis* (–, –).

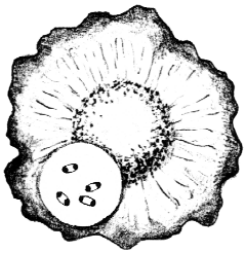


Рис. 90. Колония иерсиний чумы и ее морфология

Антигены и факторы патогенности. В составе возбудителя чумы имеется более полутора де-

сятков специфических и групповых антигенов, в частности общие антигены с родственными ему иерсиниями, эшерихиями и шигеллами; О-антиген, отождествляемый с эндотоксином, К-антиген, гликопротеиновая фракция 1 которого ингибирует фагоцитоз, V-, W-антигены, подобные Vi-антигену брюшнотифозных сальмонелл. Патогенность палочек чумы обусловливается также протеазами, например активатором плазминогена, участвующим в лизисе фибриновых сгустков, препятствующих диссеминированию иерсиний чумы, и мышиным токсином, вызывающим шок у лабораторных животных. Некоторый вклад в вирулентность возбудителя чумы вносят синтезируемые им пигменты, пурины и пестицины.

Иммунитет. Естественного иммунитета к чуме у людей нет, и заразившиеся неминуемо заболевают. Лица, перенесшие чуму, приобретают устойчивый, пожизненный иммунитет. Постинфекционный иммунитет к чуме носит преимущественно клеточный характер, в крови обнаруживаются опсонины, агглютинины, преципитины, комплементсвязывающие антитела.

Лабораторная диагностика чумы. В зависимости от клинической формы чумы материалами для исследования могут быть пунктат из бубона (бубонная форма), отделяемое язвы после его вскрытия (кожная), мокрота (легочная), испражнения (кишечная), кровь (септическая). От умерших берут кровь, внутренние органы, лимфатические узлы. В природных очагах чумы исследуются трупы грызунов и блохи, воду, пищевые продукты. Взятие материала и бактериологическое исследование проводится в противочумном костюме с соблюдением особых правил безопасности в специальных лабораториях.

Основным методом, подтверждающим клинический диагноз чумы, является обнаружение в материалах большого количества нефагоцитированных овоидных бактерий-биполяров, агглютинирующихся в адсорбированных противочумных сыворотках и подвергающихся лизису противочумным фагом. Остатки трупов животных, из которых выделить иерсинии чумы невозможно, исследуются на наличие их антигенов в реакции термокольцепреципитации Асколи.

Бактериоскопическое исследование. Из материала обычно готовят три мазка и фиксируют их в смеси Ники-

форова. Два из них окрашивают по Граму и метиленовым синим, третий – обрабатывают иммунофлюоресцирующей сывороткой (прямая РИФ). Обнаружение в иммерсионном микроскопе внеклеточно расположенных мелких грамотрицательных палочек, интенсивно окрашенных метиленовым синим по полюсам, а в люминесцентном – желто-зеленых ободков свечения вокруг них позволяет выдать предварительное заключение о наличии возбудителя чумы.

Бактериологическое исследование. Содержимое бубона, гной язвы, мокроту и другой материал высевают в чашки Петри с питательным агаром (pH 7,2 – 7,3). В целях стимуляции роста чумных бактерий к агару прибавляют 0,1 % крови кролика или лошади (среда Туманского). Для инактивации чумного фага, всегда имеющегося в экскретах, поверхность МПА равномерно орошают антифаговой сывороткой. Рост посторонней гнилостной микрофлоры угнетают прибавлением к 100 мл среды 1 мл 2,5 %-ного натрия сульфита (среда Ленской) и 1 мл насыщенного спиртового раствора генцианвиолета, разведенного 1 : 100 дистиллированной водой. Кровь больного в количестве 5–10 мл засевают в 100 мл бульона. Выращивают культуру при трех значениях температуры: 5, 20 и 37 °С. Через 10–12 ч на пластинчатом агаре могут вырастать мутно-белые шероховатые «колонии-платочки». В бульоне через 24 ч образуется рыхлая пленка со «сталактитами».

Чистую культуру чумных бактерий выделяют на скошенном агаре и после дифференциации от возбудителей иерсиниозов по морфолого-культуральным и биохимическим признакам (табл. 18) идентифицируют в РА, РНГА, ИФА и др.

Таблица 18. **Дифференциация рода иерсиний**

Тесты	*Yersinia*		
	pestis	*pseudotuberculosis*	*enterocolitica*
Подвижность при 22 и 37 °С	–	+(22), –(37)	+(22), –(37)
Уреаза		+	+
Эскулин	+	+	–
Рамноза	+	+	–
Салицин	+	+	–
Сахароза	–	–	+
Орнитиндекарбоксилаза	–	–	+
Индол	–	–	+

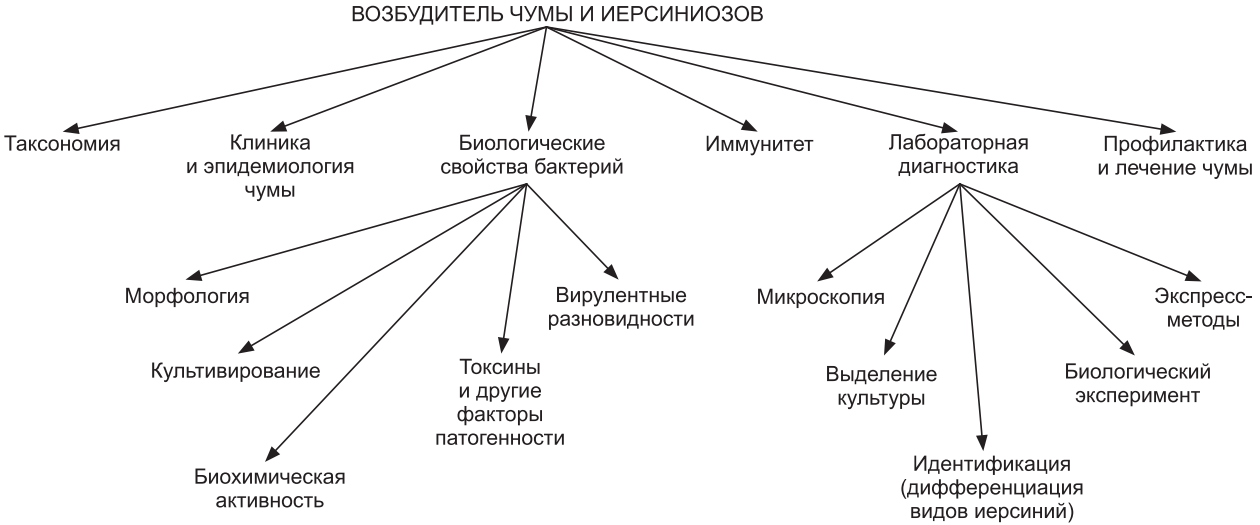
При этом обычно используют высокоспецифические капсульные сыворотки, так как соматические – дают групповую реакцию с *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*.

Испытание на фаголизабельность культуры проводят на пластинчатом агаре методом стекающей капли, а в бульоне – путем добавления к трехчасовой культуре чумного фага, разведенного 1 : 10.

Биологический эксперимент. Самой высокой чувствительностью к возбудителю чумы отличается морская свинка. Обычно она заражается материалом подкожно или внутрибрюшинно. Инфицированное животное погибает через 3–7 сут. При вскрытии трупа обнаруживают множественные геморрагии и некротические поражения внутренних органов, а в мазках-отпечатках из них – типичные биполяры. Используя биопробу как метод идентификации бактерий чумы, следует помнить, что ею можно воспользоваться для выделения бактерий из мокроты и испражнений больных, а также останков трупов грызунов, содержащих огромное количество гнилостной микрофлоры. В этих случаях исследуемый материал наносится на эпилированную в области живота кожу и втирается в нее стеклянной палочкой. Обладая высокой инвазивностью, иерсинии чумы легко проникают сквозь кожу, вызывая подкожные инфильтраты, пустулезные высыпания и сепсис. Посев гноя из пустул и капельки крови из сердца погибшей свинки на питательный агар дает рост чистой культуры возбудителя чумы.

Экспресс-диагностика. Разработано несколько ускоренных методов диагностики чумы. Наиболее простым из них является фагоиндикация. Исследуемый материал смешивают с каплей противочумного фага и засевают сплошным газоном на питательный агар. Результат учитывают через 2,5 ч по эффекту точечного фаголизиса культуры. Высокой результативностью отличается люминесцентно-серологический метод. Широкое использование нашли адсорбированные противочумные агглютинирующие сыворотки. Реакции с ними ставятся на стекле. Они технически доступны для выполнения в любых условиях.

Если исследуют загнившие трупы животных, из которых иерсинии чумы выделить невозможно, ставят РП, для чего материал тщательно измельчают, 2–3 ч взбалтывают в изотоническом растворе, 5–10 мин прогревают на


ВОЗБУДИТЕЛЬ ЧУМЫ И ИЕРСИНИОЗОВ
Таксономия
Клиника и эпидемиология чумы
Биологические свойства бактерий
Иммунитет
Лабораторная диагностика
Профилактика и лечение чумы
Морфология
Культивирование
Биохимическая активность
Токсины и другие факторы патогенности
Вирулентные разновидности
Микроскопия
Выделение культуры
Идентификация (дифференциация видов иерсиний)
Биологический эксперимент
Экспресс-методы

Граф 72

водяной бане при температуре 100 °С, после чего фильтруют. При наличии в осветленном фильтрате чумных антигенов его использование в реакции Асколи сопровождается через 2–10 мин появлением мутного кольца преципитации, а в реакции Оухтерлони – линии (дуги) преципитации в агаровом геле через 24 ч.

Аллергическая проба. Используется для ретроспективной диагностики. Для ее постановки приготовлен белковый аллерген пестин.

Специфическая профилактика и лечение. Специфическая профилактика чумы проводится по эпидемическим показаниям живой ослабленной вакциной EV, полученной из авирулентного мутанта. Она вводится однократно накожно (0,15 мл = 3 млрд м.т.), внутрикожно (0,1 = 300 млн), подкожно (0,5 = 300 млн). Поствакцинальный иммунитет непродолжителен (не более 1 г.) и недостаточно напряжен. Для лечения чумы применяют хлортетрациклин, окситетрациклин, стрептомицин в комбинации с противочумным иммуноглобулином и специфическим фагом.

Возбудитель туляремии

Таксономия. Возбудитель туляремии – *Francisella tularensis* относится к роду с невыясненным положением в систематике бактерий. Ее выделили в 1912 г. Дж. Мак-Кой и Ч. Чепин в районе озера Туляре, находящегося в Калифорнии, а всесторонне описал – Э. Франсис.

Клиника и эпидемиология. В зависимости от ворот вхождения инфекции при туляремии поражается кожа, слизистые оболочки и лимфатические узлы (кожно-бубонная, ангинозно-бубонная формы) или внутренние органы (абдоминальная и легочная туляремия). Различают также септическую, или генерализованную форму заболевания. Туляремия – природно-очаговая, особо опасная кровяная зоонозная инфекция, дающая высокий процент летальности. Возбудитель циркулирует в природе среди 70 видов позвоночных. Основные источники инфекции – водяные крысы, ондатры, зайцы, серая и черная крысы, мыши. Болеть может крупный и особенно мелкий рогатый скот (овцы), кошки и собаки. Больной человек неконтагиозен и для возбудителя туляремии является биологическим тупиком.

Механизм передачи инфекции разнообразен. В основном туляремия передается трансмиссивным путем через кровососущих членистоногих (всего около 60 видов). Среди них главное эпидемиологическое значение имеют клещи, которые являются не только переносчиками, но и резервуаром туляремии в природе, так как способны передавать возбудителя трансовариально. Нередко люди заражаются контактным, алиментарным и аспирационным путями.

Биологические особенности возбудителя туляремии. *Морфология.* Возбудитель туляремии представляет собой мелкие полиморфные микроорганизмы. В культурах чаще обнаруживаются кокковые формы (0,1–0,5 мкм), в органах животных – коккобактерии (0,7–1,0 мкм). Вирулентные штаммы образуют нежную капсулу, авирулентные часто покрываются массивным слоем слизи. Спор не образуют, неподвижны. В мазке бактерии туляремии располагаются беспорядочно, грамотрицательны (иногда наблюдается метахромазия).

Культуральные свойства. Бактерии туляремии выращиваются в аэробных условиях при температуре 37 °С на свернутой яично-желточной среде, глюкозоцистиновом кровяном или обычном агаре с лизатами дрожжей, желатина и экстрактами рыбной муки. Колонии на них появляются через несколько дней, иногда спустя 2–3 недели. Они имеют точечные размеры (1–2 мм), круглую форму (рис. 91), белый или молочно-белый цвет, а при старении образуют SR- и R-формы, в культурах накапливается слизь.

Антигены. Возбудитель туляремии содержит два антигена: соматический нуклеопротеидный О-антиген и оболочечный белково-липидный Vi-антиген, утрата которого приводит к диссоциации микроба, потере вирулентности и иммуногенности. Бактерии туляремии обладают сенсибилизирующими свойствами, имеют групповые антигены с возбудителем бруцеллеза и агглютинируются в антибруцеллезной сыворотке.

Ферменты. Биохимические свойства франциселл вариабельны. Они постоянно ферментируют глюкозу, мальтозу, маннозу, образуют сероводород.

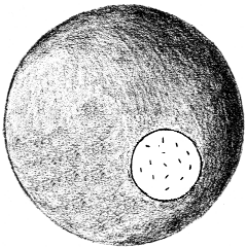


Рис. 91. Колония франциселл туляремии и их морфология

Патогенность. Наиболее чувствительны к туляремии белые мыши, в меньшей мере – морские свинки. При заражении материалом, содержащим заразное начало, животные погибают от септического процесса в течение 4–10 дней, нередко – спустя 1мес.

Географические варианты. По вирулентности и биохимической активности различают три разновидности бактерий туляремии: 1) американскую (неарктическую) – высокопатогенную для кролика (DCLM = 1 клетке), ферментирующую глицерин и содержащую цитруллинуреидазу; 2) европейскую (голарктическую) – маловирулентную для кролика (DCLM = 1 млрд м. т.) и биохимически инертную; 3) среднеазиатскую, близкую по ферментативным свойствам американской, а по вирулентности – европейской.

Иммунитет. Восприимчивость людей к туляремии высокая, но у перенесших болезнь вырабатывается очень напряженный и длительный иммунитет, отражением которого является нарастание уровня специфических антител, активация Т-лимфоцитов, фагоцитов и аллергическая перестройка организма, сохраняющаяся на протяжении многих лет.

Лабораторная диагностика. Основными микробиологическими методами, подтверждающими диагноз туляремии, являются: положительные аллергические пробы (5 сут), развернутая РА (10–14 сут) и РСК (5–7 сут).

Аллергическая реакция. Для ее выявления используют внутрикожную пробу с тулярином или в насечки кожи вводят туаллерген. Результаты аллергических реакций учитывают через 24–36–48 ч. Обычно на месте введения аллергенов развивается выраженная гиперемия и инфильтрат диаметром 5 мм. При этом нужно учитывать, что такая же положительная проба может возникать у реконвалесцентов и вакцинированных против туляремии лиц.

Развернутая РА. Антитела к возбудителю туляремии появляются на второй недели болезни (после 10-го дня). Для постановки развернутой РА у больного достаточно взять 2–3 мл крови. Полученную сыворотку последовательно разводят от 1 : 25 до 1 : 400. Затем в каждую пробирку добавляют 0,5 мл туляремийного диагностикума, в результате сыворотка разводится от 1 : 50 до 1 : 800. Контроль сыворотки и диагностикума ставят, как обычно (табл. 19).

Таблица 19. **Схема постановки развернутой РА**

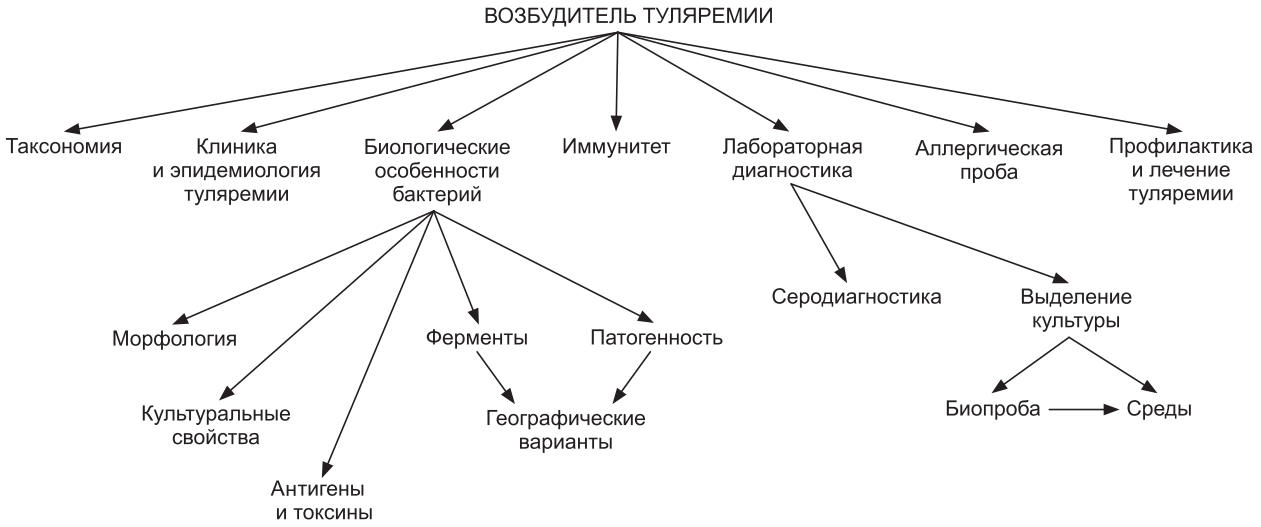
Ингредиенты, мл	Номер пробирки					Контроль	
						сыворотки	диагностикума
	1	2	3	4	5	6	7
Изотонический раствор натрия хлорида	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сыворотка больного, разведенная 1 : 25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–
	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400		
Диагностикум	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
Конечное разведение сыворотки	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 50	
Учет результатов							

Примечание. Сыворотку, разведенную 1 : 25, наливают в 1, 2 и 6-ю пробирки, после чего 0,5 мл содержимого 2-й пробирки переливают в 3-ю пробирку и т. д., а из 5-й пробирки 0,5 мл выливают.

Пробирки помещают на 2 ч в термостат и после извлечения из него выдерживают при комнатной температуре еще 18–20 ч, после чего проводят окончательный учет. Диагноз подтверждает РА в разведении сыворотки 1 : 100. При повторной постановке РА через 7–10 сут ее титр может возрастать в 4 и более раза, что очень важно при дифференциации туляремии от бруцеллеза, возбудители которого, имея общую антигенную структуру с *F. tularensis*, могут агглютинироваться в сыворотке больных туляремией. Более чувствительными считаются РНГА и РСК на холоде.

При массовых обследованиях вместо развернутой РА можно применять кровяно-капельную реакцию: на предметное стекло наносят каплю крови и гемолизируют ее в дистиллированной воде с последующим добавлением к ней туляремийного диагностикума. Мгновенная агглютинация франциселл в гемолизированной капле крови соответствует титру антител 1 : 100, а склеивание диагностикума через 2–3 мин – титру 1 : 50.

Выделение культуры. Получить чистую культуру бактерий туляремии из гноя, пунктата бубона, слизи из зева


ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУЛЯРЕМИИ
Таксономия
Клиника и эпидемиология туляремии
Биологические особенности бактерий
Иммунитет
Лабораторная диагностика
Аллергическая проба
Профилактика и лечение туляремии
Морфология
Культуральные свойства
Антигены и токсины
Ферменты
Патогенность
Географические варианты
Серодиагностика
Выделение культуры
Биопроба
Среды

Граф 73

или крови больного путем прямого посева на питательные среды не удается. Для активации ростовых потенций возбудителя материалом человека заражают 3–5 белых мышей или 2 морских свинок. Инфицированные животные погибают через 1–2 недели, а если выживают, то на 15–25-й день их убивают и эмульсией органов производят слепой пассаж интактным мышам и свинкам.

Культуру *F. tularensis* выделяют, засевая отпечатками срезов печени и селезенки инфицированных животных яично-желточную среду и глюкозоцистиновый агар с 5–10 % кроличьей дефибринированной крови или с наличием в нем 2,5 % аутолизата дрожжей, 10 % гидролизата желатина и 20 % гидролизата рыбной муки. Вырастить возбудитель туляремии удается также в желточном мешке 12-дневного куриного эмбриона.

Чистую культуру идентифицируют по наличию в мазках из колоний мелких беспорядочно располагающихся коккобактерий, агглютинирующихся в диагностической сыворотке.

Для обнаружения туляремийных антигенов у погибших грызунов в энзоотических очагах широко применяется *реакция термо-кольцепреципитации Асколи*.

Специфическая профилактика и лечение. Специфическая профилактика туляремии проводится живой сухой аттенуированной вакциной из штамма 15-й линии НИИЭТ. Вакцинации подлежат лица, подвергающиеся опасности заражения туляремией, отрицательно реагирующие на тулярин и имеющие низкие титры антител. Применяют два способа введения вакцин: накожный и внутрикожный. Первый используется при плановой вакцинации детей от 7 лет и старше, второй – по эпидемическим показаниям. Ревакцинируют привитых через 5 лет. Лечат туляремию аминогликозидами, тетрациклинами, левомицетином, сочетая их с введением убитой вакцины при торпидно протекающей форме инфекции.

Возбудители бруцеллеза

Таксономия. Возбудители бруцеллеза относятся к роду *Brucella* одноименного сем. *Brucellaceae*, названных так в честь Д. Брюса, выделившего в 1886 г. на о. Мальта козьеовечий вид *B. melitensis*. В последующем Б. Банг (1896)

получил *B. abortus* (бычий вид), а Дж. Траум (1914) – *B. suis* (свиной). В 50-х гг. XX в. идентифицирован собачий вид *B. canis*. В пределах каждого из них имеется целый ряд биоваров.

Клиника и эпидемиология. Бруцеллез – острое или хронически рецидивирующее инфекционное заболевание зоонозной природы, относящееся по основному механизму передачи к группе кишечных инфекций. Клиническая картина бруцеллеза у человека разнообразна. Наиболее характерными симптомами болезни являются волнообразная лихорадка с явлениями поражения печени, селезенки, лимфатических узлов, опорно-двигательного аппарата и нервной системы. Главные признаки бруцеллеза у животных – аборт, метриты, маститы, артриты.

Инфицирование людей происходит алиментарным путем при употреблении зараженного молока и молочных продуктов (брынзы) или при тесном контакте с больными животными, особенно во время отела и окота, когда происходит массивное выделение возбудителей в окружающую среду с абортированными плодами, плацентой и околоплодными водами.

Основным источником бруцеллеза являются козы и овцы, с которыми связано 90 % всех заболеваний у человека. Для козье-овечьего типа характерен зимне-весенний подъем заболеваемости. Менее четко выражена сезонность при заражении от крупного рогатого скота. Бруцеллез у человека – тупиковая незаразная инфекция.

Биологические особенности возбудителей. *Морфология.* Бруцеллы – мельчайшие коккобактерии размерами 0,3–0,6 мкм. Многие бактериологи называют их *мальтийскими микрококками* или *пылинками*. Реже бруцеллы имеют палочковидную форму до 1,5 мкм в длину. Спор и капсул не образуют, неподвижны, грамотрицательны.

Культуральные свойства. Бруцеллы растут медленно при температуре 37 °С, и первые генерации обычно вырастают через 2–3 недели, но не раньше 7–10 дней. Наиболее подходящими средами для бруцелл являются сывороточно-декстрозный агар, агар на картофельном настое с сывороткой, питательный агар с дрожжевым аутолизатом (агар «Д»), печеночные агар и бульон. Культивируются они также в желточном мешке неоплодотворенных куриных яиц и эмбрионах. Колонии бруцелл круглые, выпук-

лые, гладкие, беловато-мутные или бесцветные до 2 мм в диаметре (рис. 92), однако быстро диссоциируют и превращаются в шероховатые, а иногда в L-формы. Вырастая в жидких средах, бруцеллы вызывают помутнение.

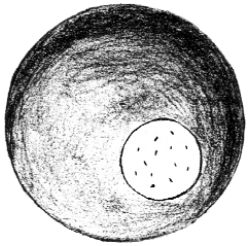


Рис. 92. Колония бруцелл и их морфология

Биохимические свойства. Бруцеллы обладают слабой сахаролитической активностью, сбраживая иногда глюкозу и арабинозу. Не разжижают желатин, не свертывают молоко, бычий и свиной виды образуют сероводород. Некоторые штаммы выделяют уреазу, каталазу, дегидрогеназы, цитохромоксидазы.

Антигены и факторы патогенности. Из гладкой формы вирулентных штаммов бруцелл выделено 15 антигенных фракций, в частности M-, A- и L-антигены, сходные с Vi-антигеном сальмонелл. Продуцируют эндотоксин и факторы инвазивности, вследствие чего способны проникать через неповрежденные кожные покровы и слизистые оболочки.

Иммунитет. Иммунитет при бруцеллезе имеет нестерильный характер, отличается относительной резистентностью к суперинфекции и гиперчувствительностью. В острой стадии заболевания повышается фагоцитарная активность нейтрофилов, возникает аллергическая перестройка организма, появляются агглютинины, опсонины, комплементсвязывающие антитела. При хроническом бруцеллезе в крови больных отмечается высокий титр неполных (блокирующих) антител. Переболевшие не приобретают прочного иммунитета к реинфекции.

Лабораторная диагностика. Основными микробиологическими методами, с помощью которых подтверждается клинически поставленный диагноз бруцеллеза, являются серологические реакции и аллергическая проба Бюрне.

Серодиагностика. Антитела в крови больных бруцеллезом появляются рано, накапливаясь в диагностических титрах в острой фазе болезни. В это время клинический диагноз чаще всего подтверждается с помощью развернутой *реакции агглютинации Райта.* Ставится она так же, как и реакция Видаля, но к разведенным сывороткам больных прибавляют бруцеллезный диагностикум, окра-

шенный генцианвиолетом или метилвиолетом, содержащий в 1 мл 1 млрд м.т. Пробирки помещают в термостат на 18–20 ч, а затем оставляют на 2 ч при комнатной температуре. Реакция считается положительной при агглютинации диагностикума в титре 1 : 200. Поскольку сыворотка больных бруцеллезом содержит групповые антитела к возбудителю туляремии, то для их дифференциации рекомендуют учитывать динамику нарастания титра антител в повторно взятой сыворотке.

При массовом выявлении скрытых форм бруцеллеза вместо реакции Райта можно ставить ускоренную *реакцию агглютинации Хаддлсона* на стеклянной пластине, нанося на нее 4 капли сыворотки (0,08, 0,04, 0,02 и 0,01 мл), в которые добавляют по 0,03 мл подкрашенного бруцеллезного диагностикума. В положительных случаях после легкого покачивания стекла спустя 2–3 мин возникают мелкозернистые агглютинаты. Наличие их в объеме 0,08 мл сыворотки оценивается как сомнительная реакция агглютинации, в 0,04 мл – как слабоположительная, в 0,02 и 0,01 мл – как положительная РА.

Более чувствительны *РНГА, РСК* и особенно *РИФ*, которые позволяют выявить даже очень низкие титры антител при хроническом бруцеллезе.

Нарастание титра опсонинов при бруцеллезе позволяет установить *опсонофагоцитарная проба* с использованием 4-миллиардной взвеси убитых бруцелл. При этом нужно учитывать, что высокая степень фагоцитоза бруцелл может наблюдаться у вакцинированных лиц и обслуживающего персонала животноводческих ферм, имевших контакты с больными бруцеллезом животными.

Неполные антитела при хронических и латентных формах бруцеллеза выявляют в непрямой *реакции Кумбса* по агглютинабельности бруцелл, нагруженных ими.

Внутрикожная аллергическая проба Бюрне. Ставят ее на 10–15–20-е сут заболевания, вводя внутрикожно в область средней трети предплечья 0,1 мл бруцеллина. При наличии морбидной реакции на месте введения аллергена через 1 сут появляются болезненность, краснота и отечность размером 10 × 10 – 60 × 60 мм. Ее, правда, необходимо дифференцировать с анамнестическими и прививочными реакциями, сохраняющимися после перенесенного бруцеллеза и вакцинации в течение многих лет.

Бактериологический метод. Так как бруцеллез сопровождается массивной бактериемией и диссеминацией возбудителя во все органы, ткани и экскреты, то бруцеллы могут быть выделены из крови, костного мозга, лимфатических узлов, спинномозговой и суставной жидкости, желчи, мочи, мокроты, гноя и молока (в том числе грудного).

Гемокультуру и миелокультуру получают в первые дни лихорадочного состояния. С этой целью кровь и пунктат костного мозга грудины засевают в два флакона печеночного или асцитического бульона или сахарно-глицеринового бульона с антифаговой сывороткой. Для предупреждения свертывания крови к средам прибавляют 0,2 % натрия цитрата. Для выделения *B. abortus* и *B. suis* один из флаконов помещают в герметически закрывающийся сосуд с 10 %-ным диоксидом углерода, поступающим через газомер из баллона. Необходимую концентрацию углекислого газа можно получить, закрыв флакон с посевом горящей ватной пробкой и втолкнув ее в горлышко так глубоко, чтобы можно было залить парафином. Посевы помещают в термостат при 37 °С и, учитывая медленный рост бруцелл, выдерживают их около 1 мес., делая регулярные пересевы на скошенные печеночный и D-агар, содержащий дрожжевой аутолизат. Выделив чистую культуру, определяют вид бруцелл (см. «Идентификацию бруцелл»). При отрицательных результатах исследование повторяют, так как бактериемия при бруцеллезе может продолжаться в течение многих месяцев после начала болезни.

Культуры бруцелл из ликвора, суставной жидкости, пунктатов лимфатических узлов, других секретов получают на более поздних стадиях болезни, засевая материалы на те же среды, что и кровь.

Для выделения урино-, били- и лактокультур используются плотные селективные среды, в которые для бактериостаза посторонней микрофлоры вводят небольшие концентрации генцианвиолета, полимиксина В, бацитрацина или других антибиотиков. При этом засевают не мочу и желчь, а их осадки, не молоко животных, а сливки, полученные после его центрифугирования.

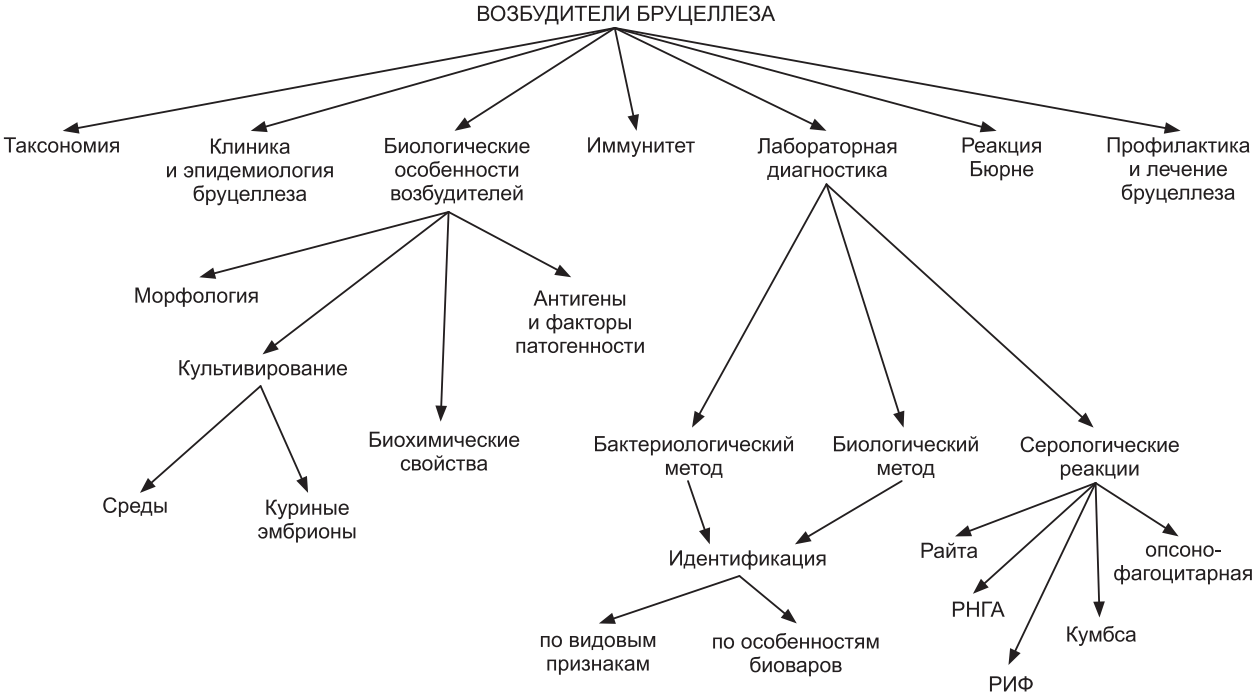
Наибольшей высеваемости бруцелл достигают при посевах 0,1–0,2 мл материалов в желток свежего куриного яйца или в желточный мешок куриного эмбриона. Для этого кровь смешивают в пропорции 1 : 3 с цитратным

бульоном, а полученные после центрифугирования осадки испражнений, мочи, мокроты, гноя, сильно загрязненных посторонней микрофлорой, – с 3–5 объемами генцианвиолета, разведенного 1 : 200 000. При этом заражают по несколько яиц или эмбрионов. Их выдерживают при температуре 37 °С. Содержимое яиц и эмбрионов на питательные среды отсевают после 5-дневного культивирования, в количестве 0,3–0,5 мл.

Наконец, с целью выделения чистых культур бруцелл материалами можно заражать морских свинок и белых мышей. Кровь предпочтительнее вводить им внутрибрюшинно, а осадки материалов – подкожно. Заболевание у животных развивается через 20–30 сут после заражения. Вскрыв животных, среды засевают кровью из сердца или взвесью печени и селезенки.

Идентификация бруцелл. Определение видовой принадлежности бруцелл затрудняется наличием групповых антигенов и различных биоваров в составе *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*. Ввиду этого при идентификации бруцелл, помимо морфолого-культуральных и биохимических признаков, необходимо учитывать ряд дифференциально-диагностических тестов: 1) способность *B. melitensis* расти на средах с фуксином (1 : 25 000) и тионином (1 : 50 000), избирательную фуксин- и тионинчувствительность *B. abortus* и *B. suis*; 2) положительную реакцию на сероводород (*B. abortus* и *B. suis*); 3) положительную РА бруцелл в монорецепторных сыворотках; 4) потребность бычьего вида бруцелл в диоксиде углерода и его чувствительность к фагу Тб (Тбилиси, раса 3).

Специфическая профилактика и лечение. Для создания иммунитета против бруцеллеза используется живая накожная вакцина из бычьего штамма 19-ВА, предложенная П.Ф. Здродовским и П.А. Вершиловой. Вакцинируются ею чабаны, доярки, работники мясокомбинатов и другие лица, по роду работы подвергающиеся опасности заражения бруцеллезом. Поствакцинальный иммунитет создается на 12 мес. Специфическое лечение осуществляется тетрациклином, левомицетином, олеандомицином, эритромицином, нередко в сочетаниях с внутривенным введением лечебной вакцины или внутримышечными инъекциями бруцеллина. Хороший результат получен при лечении бруцеллеза иммуноглобулином.


ВОЗБУДИТЕЛИ БРУЦЕЛЛЕЗА
Таксономия
Клиника и эпидемиология бруцеллеза
Биологические особенности возбудителей
Иммунитет
Лабораторная диагностика
Реакция Бюрне
Профилактика и лечение бруцеллеза
Морфология
Культивирование
Среды
Куриные эмбрионы
Биохимические свойства
Антигены и факторы патогенности
Бактериологический метод
Биологический метод
Серологические реакции
Идентификация
по видовым признакам
по особенностям биоваров
Райта
РНГА
РИФ
Кумбса
опсоно-фагоцитарная

Граф 74

Возбудители коклюша и паракоклюша

Таксономия. Возбудители коклюша *Bordetella pertussis* и паракоклюша *B. parapertussis* относятся к сем. *Brucellaceae*. Названы они так в честь Ж. Борде, который совместно с О. Жангу выделил в 1906 г. палочку коклюша. Вместе с ними в род *Bordetella* включен *B. bronchiseptica*, близкий им по О-антигену и вызывающий клинически сходный с коклюшем бронхосептикоз.

Клиника и эпидемиология. Коклюш и паракоклюш – острые инфекционные заболевания дыхательных путей, проявляющиеся в виде приступов спазматического кашля (фр. – *coqueluche*). Заболевания протекают циклично. Различают катаральную стадию (2 недели) болезни, в течение которой возбудители выделяются с капельками мокроты в окружающую среду, стадии судорожного кашля (2–4 недели) и разрешения (2 недели), когда в крови больных образуются специфические антитела. Источниками инфекции являются больные дети. Механизм передачи коклюша и паракоклюша – воздушно-капельный. Наиболее восприимчивы к этим инфекциям дети, заболевающие ими уже с первых дней жизни.

Биологические особенности возбудителей. *Морфология* и *культуральные свойства*. *Bordetella* – очень мелкие, овоидные палочки размером 0,5–1,0 × 0,2–0,3 мкм, часто образующие капсулу. Спор и жгутиков, если не считать *B. bronchiseptica*, бордетеллы не имеют, по Граму окрашиваются отрицательно.

Палочка коклюша растет медленно при температуре 37 °С на селективных средах, содержащих кровь и витамины. Лучшими из них являются картофельно-глицериновый кровяной агар (среда Борде – Жангу) и казеиново-угольный агар (КУА). На среде Борде – Жангу колонии возбудителя коклюша через 2–3 сут напоминают мелкие капельки ртути или зерна жемчуга, на КУА имеют круглую куполообразную форму, сметанообразную консистенцию, серовато-кремовый цвет, размер 0,5–1,0 мм (рис. 93).

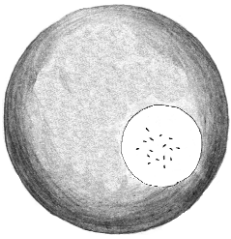


Рис. 93. Колония бордетелл коклюша и их морфология

В процессе заболевания кроме типичных S-форм колоний (I фаза) бактерий коклюша из мокроты больных в конце катаральной стадии выделяются промежуточные SR- (II и III фазы) и R-колонии (IV фаза), полностью утрачивающие видовые особенности *B. pertussis*. Возбудители паракоклюша и бронхосептикоза растут быстрее, хорошо развиваются даже на простых питательных средах и кровяном агаре. К исходу вторых суток диаметр их колоний может составлять 2–4 мм.

Ферменты. Палочка коклюша биохимически инертна, а паракоклюшная и возбудитель бронхосептикоза продуцируют уреазу.

Антигены и факторы вирулентности. Бордетеллы коклюша I фазы содержат: специфический видовой О-антиген и пили, обеспечивающие адгезию к мерцательному эпителию и их гемагглютинирующую активность; продуцируют термолабильный экзотоксин, состоящий, как у холерогена, из компонентов А и В, в результате действия которых повышается внутриклеточная концентрация цАМФ; образуют термолабильный эндотоксин, оказывающий сенсибилизирующее действие; цитотоксин, повреждающий мерцательный эпителий, и аденилатциклазу. Все эти вместе взятые факторы патогенности, свойственные также бордетеллам паракоклюша, обусловливают спазмы сосудов, мелких бронхов и голосовой щели вследствие местного раздражения нервных рецепторов слизистой оболочки дыхательных путей и общего нервнотоксического действия.

Иммунитет. Врожденный иммунитет против коклюша, паракоклюша и бронхосептикоза слабовыражен, а постинфекционный противококлюшный – пожизненный. После 10 лет коклюшем болеют редко. У многих лиц возможно здоровое бактерионосительство.

Лабораторная диагностика. Материалом для исследования служат мокрота и кровь. В первые дни болезни диагноз коклюша и паракоклюша подтверждается выделением чистых культур и идентификацией их с помощью диагностических агглютинирующих сывороток, а спустя 2–3 недели от начала заболевания, когда бордетеллы из мокроты исчезают, – по обнаружению в крови больных высокого титра специфических антител с помощью РА и РСК.

Бактериологический метод. Выделить у больных бордетеллы из мокроты, богатой посторонней микрофлорой,

быстро растущей на селективных средах, чаще всего не удается. Легче получить их из отделяемого заднеглоточного пространства, но процедура взятия его тампоном через носовые ходы у детей болезненна и вызывает страх. К ней прибегают практически лишь тогда, когда у больного ребенка исчезает кашель. В период его приступов ко рту больных детей подносят чашки Петри со свежеприготовленным КУА или средой Борде – Жангу, предварительно орошенными пенициллином, подавляющим рост сопутствующей микрофлоры. При этом так называемом методе «кашлевых пластинок» среды засеваются мелкими капельками слизи из бронхов. Выращивают бордетеллы в эксикаторе при повышенной влажности. Так как рост *B. pertussis* начинается через 2–3 сут, то для предупреждения зарастания сред рекомендуется ежедневно просматривать их и стерильным скальпелем удалять вырастающие колонии грибов, антракоидов, протеев и других ползучих и роящихся бактерий.

Получив колонии бордетелл, делают мазки, и при наличии в них грамотрицательных, овоидных мелких палочек ставят РА на стекле с коклюшной и паракоклюшной сыворотками, разведенными 1 : 10. Агглютинирующиеся колонии отсевают и чистую культуру идентифицируют по ряду тестов (табл. 20).

Таблица 20. **Сравнительная характеристика бордетелл**

Вид	Наличие		Рост на простых средах	Использование цитратов	Коричневая пигментация КУА	Гемолиз	Образование уреазы
	капсулы	жгутиков					
B. pertusis	+	–	–	–	–	+	–
B. parapertusis	–	–	+	+	+	+	+
B. bronchiseptica	–	+	+	+	–	+	+

Иногда определяется вирулентность выделенной культуры. Введенные внутрикожно бордетеллы коклюша вызывают у кролика некроз кожи.

Серодиагностика. Наличие противококлюшных антител определяют РСК и РА. Как антигены в них используются диагностикумы или инактивированные взвеси бордетелл. В связи с массовым проведением прививок и нали-

ВОЗБУДИТЕЛИ КОКЛЮША И ПАРАКОКЛЮША
Таксономия
Клиника и эпидемиология заболеваний
Биологические особенности бактерий
Иммунитет
Лабораторная диагностика (методы)
Аллергическая проба
Профилактика и лечение коклюша
Морфология
Культуральные свойства
Ферменты, антигены и токсины
Дифференциация патогенных бордетелл
Бактериологический метод
Серодиагностика
РСК
РА
«Кашлевых пластинок»
Засев тампоном
Условия выращивания
Сравнительная характеристика бордетелл

Граф 75

чием у детей специфических антител против бордетелл коклюша для подтверждения диагноза серологические реакции ставятся с парными сыворотками, и при их оценке прежде всего учитывается титр нарастания антител, а не само их наличие даже в диагностическом титре.

Кроме того, для подтверждения диагноза коклюша ставят аллергическую пробу. Больному внутрикожно вводят 0,1 мл антигена. Через 16–20 ч на месте инъекции образуется покраснение и инфильтрат диаметром 2 см.

Специфическая профилактика и лечение. Специфическая профилактика коклюша проводится вакциной АКДС с 3-месячного возраста ребенка до 4 лет и, раз начавшись, продолжается даже в тех случаях, когда ребенок контактирует с больным коклюшем. Если же контакт с больным происходит до начала иммунизации, то вакцинопрофилактика отменяется. Экстренную профилактику коклюша у непривитых и не полностью привитых детей проводят иммуноглобулином человека, вводя его дважды по 3 мл с интервалом 24 ч в максимально ранние сроки после инфицирования. Более активна профилактика эритромицином (40–50 мг/кг), но антибиотик нужно вводить на протяжении 14 дней. Лечат больных коклюшем эритромицином и тетрациклинами.

Патогенные гемофильные бактерии

Таксономия. Род *Haemophilus* (*haima* – кровь, *philos* – любитель) сем. *Pasteurellaceae* пор. *Eubacteriales* включает 16 видов бактерий, нуждающихся для своего роста в добавлении к питательной среде крови или гемоглобина, что было установлено Р. Пфейффером, выделившим на кровяном агаре в 1892 г. *H. influenzae*, до 1933 г. считавшуюся возбудителем гриппа. Позднее выяснилось, что гемофильным бактериям необходима не сама кровь, а два ее фактора: 1) термостабильный фактор X, а точнее – тетрапироллы гемина и гематина, которые *H. influenzae* может превращать в гем; 2) относительно термолабильный фактор Y, являющийся, как теперь выяснено, коферментом, включающим НАД и НАДФ, которые содержатся в тканях животных и растений и синтезируются «бактериями-кормилками», например сарцинами и стафилококками. По потребности в этих факторах гемофилы подразделяются

на три группы: 1) XY-зависимая, в состав которой входят *H. influenzae* и *H. haemolyticus*; 2) X-зависимая, включающая возбудитель мягкого шанкра *H. ducrey*; 3) Y-зависимая, в которую отнесены остальные виды гемофильных бактерий. При этом та или иная потребность в факторах роста определяется на плотной питательной среде в чашках Петри путем засева культуры с последующим наложением на нее вдоль диаметра чашки двух полосок фильтровальной бумаги, одна из которых смочена фактором X, а другая – фактором Y. XY-зависимые гемофилы будут расти между полосками, X- и Y-зависимые – вокруг той полоски, из которой всасывается в среду необходимый им фактор роста.

Гемофильные бактерии имеют кокковидную или палочковидную форму размером 0,5–2 × 0,2–0,3 мкм, спор и жгутиков не образуют, неподвижны, отдельные виды формируют капсулу. Грамотрицательны. Медленно окрашиваются анилиновыми красителями, в частности метиленовым синим 5 мин, а водным фуксином – 10 мин.

Гемофилы – аэробы или факультативные анаэробы, культивируются на кровяном, шоколадном агаре и среде Левинталя с вареной кровью при температуре 37 °С. На этих средах они формируют мелкие, круглые, бесцветные колонии, иногда с ободком гемолиза вокруг.

Ферментируют углеводы до промежуточных продуктов, желатин не разжижают. Некоторые виды гемофилов образуют индол и обладают способностью агглютинировать эритроциты человека и животных.

Патогенными для людей являются *H. influenzae* и *H. ducrey*. Три вида – *H. parainfluenzae, H. haemolyticus, H. parahaemolyticus* – условнопатогенные, а 11 видов – сапрофиты, нередко обнаруживающиеся в организме здорового человека.

Возбудитель инфлюэнцы

Инфлюэнцу (*influenza* = *grippe* – схватывать) вызывает *Haemophilus influenzae*. Проявляется болезнь в виде островоспалительных процессов верхних дыхательных путей (бронхитов, ларингитов, пневмонии). Могут возникать также менингиты, конъюнктивиты, эндокардиты, перитониты, часто осложняющие течение вирусных и других инфекций.

Биологические свойства. *Морфология и культивирование.* В патологическом материале *H. influenzae* имеет вид кокковидных маленьких палочек, располагающихся в мазках поодиночно или короткими цепочками. Некоторые штаммы могут иметь полисахаридную капсулу. Грамотрицательна. При окраске 10 %-ным водным фуксином интенсивнее окрашивается по полюсам. На кровяном агаре через 1 сут вырастает в виде точечных S-колоний, более крупные формирует на шоколадном агаре и, если они содержат капсулосодержащие варианты бактерий, то имеет вид сочных слизистых М- колоний.

Биохимические свойства. Постоянно ферментируют глюкозу, продуцируют уреазу и образуют индол, восстанавливают нитраты в нитриты.

Антигены и факторы патогенности. Некапсулированные штаммы по набору антигенов неоднородны. Капсульные *H. influenzae* содержащие К-антиген, разделены на шесть сероваров, из которых наибольшую эпидемиологическую значимость имеет *H. influenzae* типа *b*. Основными факторами патогенности у них является капсула и пили, ингибирующие фагоциты и способствующие проникновению бактерий в подслизистую оболочку и кровоток. Определенную роль играют IgA1-протеазы, разрушающие IgA.

Лабораторная диагностика. Основу лабораторной диагностики болезней, вызванных *H. influenzae*, составляет выделение ее в чистой культуре с последующей идентификацией по спектру ферментов, потребности в факторах роста и в прямой РИФ.

Лечение. В терапии инфлюэнца-болезней используются различные антибиотики.

Возбудитель мягкого шанкра

Мягкий шанкр вызывается гемофильной бактерией *H. ducrey*, описанной. А. Дюкреем (1889) и подробно изученной П. Унна (1892).

Клиника и эпидемиология. Мягкий шанкр (*chancre* – язва) – венерическое заболевание, проявляющееся образованием на ощупь мягких, болезненных язв, располагающихся у мужчин на внутреннем листке крайней плоти, уздечке и головке полового члена, а у женщин – на больших

и малых половых губах. Вначале они имеют округлую форму, в дальнейшем – края их становятся зубчатыми и подрытыми, нависая над глубоким неровным дном язв, покрытым гнойным отделяемым. Нередко мягкий шанкр осложняется лимфангоитом и паховым лимфаденитом в виде бубона, достигающего в диаметре 3–5 см. Бубоны могут рассасываться или, нагнаиваясь, вскрываться с образованием вторичных шанкров.

Биологические свойства. *Морфология и культуральные свойства.* Бактерии Дюкрея – Унна имеют вид палочек с закругленными концами длиной 1–2,5 мкм и шириной 0,5 мкм. Спор, капсул и жгутиков не имеют. Грамотрицательны, но лучше всего окрашиваются разведенным карбол-фуксином Циля при подогревании до паров с последующим выдерживанием 2–3 мин на холоде. В мазках из содержимого язв они располагаются параллельными цепями между нейтрофилами. Являясь гемофилами, стрептобактерии мягкого шанкра лучше всего растут на кровяных средах, в частности на МПА (2 части) с дефибринированной кровью кролика или барана (1 часть) и мартеновском бульоне с 20 % дефибринированной крови барана. На кровяных агарах через 24–48 ч образуют круглые, выпуклые, серовато-белые, блестящие, точечные колонии диаметром 0,5–1 мм (рис. 94), а на бульоне вызывают помутнение и хлопьеобразование.

Резистентность. Возбудитель мягкого шанкра чувствителен к дезинфицирующим веществам, которые в обычных концентрациях убивают стрептобактерии в течение нескольких минут.

Иммунитет. Естественного иммунитета к возбудителю мягкого шанкра у человека нет. В процессе болезни вырабатываются агглютинины и комплементсвязывающие антитела, развивается аллергия, но устойчивость к реинфекции у людей не возникает.

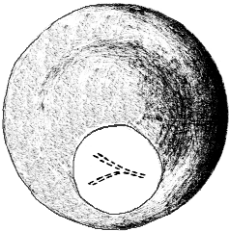
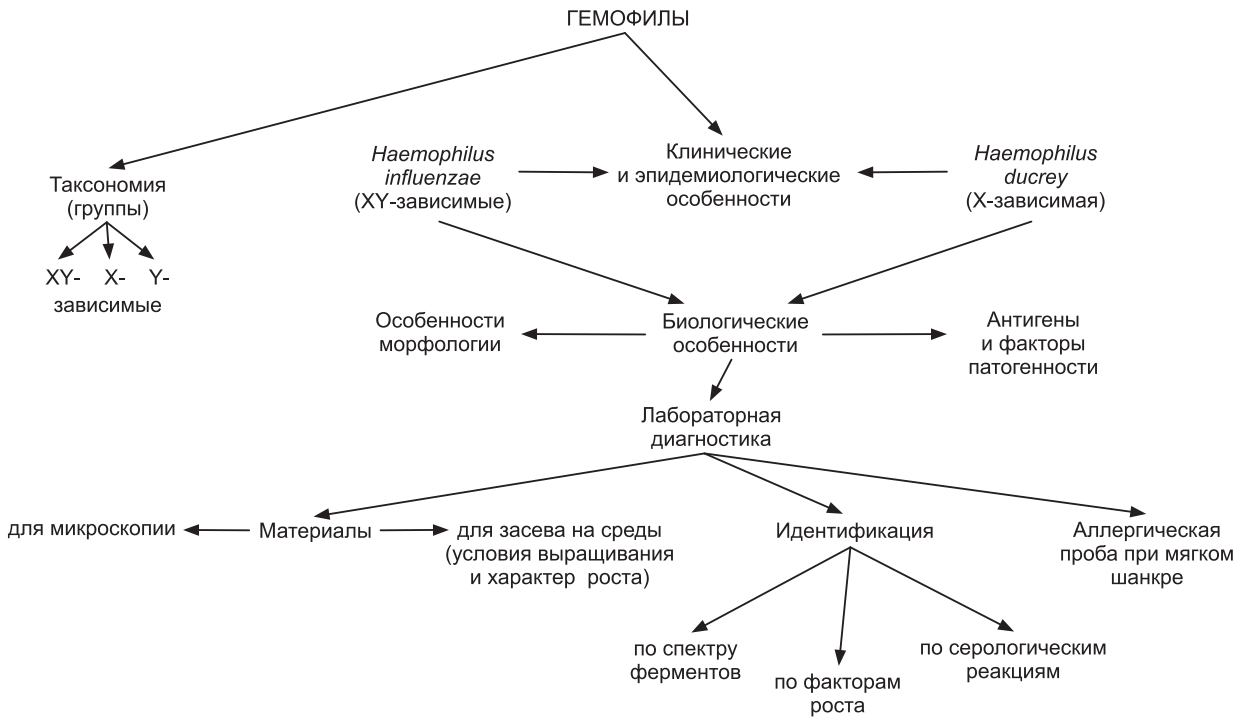


Рис. 94. Колония бактерий мягкого шанкра и их морфология

Лабораторная диагностика. В качестве материала для бактериологического исследования используют отделяемое из-под нависших краев и дна мягкого шанкра, пред-


ГЕМОФИЛЫ
Таксономия (группы)
XY- X- Y- зависимые
Haemophilus influenzae (XY-зависимые)
Клинические и эпидемиологические особенности
Haemophilus ducrey (X-зависимая)
Особенности морфологии
Биологические особенности
Антигены и факторы патогенности
Лабораторная диагностика
для микроскопии
Материалы
для засева на среды (условия выращивания и характер роста)
Идентификация
Аллергическая проба при мягком шанкре
по спектру ферментов
по факторам роста
по серологическим реакциям

Граф 76

варительно очистив его тампоном, смоченным изотоническим раствором хлорида натрия. Лучшим для засева на среды является пунктат из пахового бубона. При этом плотные среды готовятся в день засева. Выращивают бактерии при температуре 37 °С в условиях повышенного содержания диоксида углерода. Чистая культура ферментирует с образованием кислоты углеводы короткого ряда Гисса, кроме мальтозы. Ее идентифицируют в РА, используя специфическую сыворотку больных. При отрицательных результатах бактериологических исследований прибегают к внутрикожной пробе, вводя 0,1 мл лечебной стрептобактериальной вакцины (500 млн м. т. в 1 мл); через 24–48 ч на месте ее введения появляется папула с ободком воспаления вокруг.

Лечение и профилактика. Лечение мягкого шанкра комплексное. Внутрь назначают антибиотики, а наружно применяют ванночки, присыпки, мази, содержащие перманганат калия, сульфаниламидные препараты и другие бактерицидные вещества. Распространению мягкого шанкра способствует проституция. Мероприятия по его предупреждению охватывают многие социальные аспекты жизни людей, прежде всего быт, нравы, традиции, культуру.

Гарднереллезный вагинит

Таксономия. Род *Gardnerella*, названный в честь Х. Гарднера, образованный одним видом *G. vaginalis*, в систематике бактерий истинного местоположения пока не нашел.

Гарднереллезный вагинит составляет около 40 % различных воспалительных процессов влагалища. Возникает он преимущественно у женщин, пользующихся внутриматочными средствами или прибегающих к искусственным абортам. В запущенных случаях вслед за вагинитом гарднереллы поражают мочевой пузырь и почки.

Биологические особенности гарднерелл. *Морфология.* Гарднереллы – коккобактерии размером 1–2 × 0,3–0,6 мкм. Спор и капсул не образуют, жгутиков не имеют. Грамотрицательны. В мазках располагаются одиночно или парами в виде римской цифры «V».

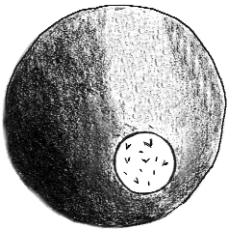


Рис. 95. Колония гарднерелл и их морфология

Культуральные и биохимические свойства. Культивируются на средах, содержащих эритроциты человека или кролика с pH 4,0 при повышенном содержании диоксида углерода и оптимальной для них температуре 37 °С. Через 24 ч образуются колонии-росинки 0,1–0,2 мм в диаметре (рис. 95), окруженные зонами гемолиза. В жидких средах гарднереллы дают равномерное помутнение и осадок. Жизнеспособность гарднерелл низкая, в частности на плотных средах они погибают спустя 24–48 ч. Ферментируют глюкозу, мальтозу, фруктозу, галактозу, арабинозу, декстрин, инулин и рибозу.

Антигены. По структуре О-антигена выделяют семь серогрупп гарднерелл. Общий для всех антиген определяют в развернутой РА и ИФА.

Лабораторная диагностика. Основана на: 1) обнаружении в нативных мазках из влагалищного отделяемого эпителиальных клеток, нагруженных большим количеством бактерий; 2) отсутствии в мазке лактобацилл и повышенного содержания лейкоцитов; 3) выявлении в нем солей аномальных аминов по рыбному запаху, который появляется при добавлении к нему капли 10 %-ного раствора едкого кали.

Лечение. В лечении гарднереллезов применяют пенициллин, линкомицин и метронидазол.

Кампило- и хеликобактериозы

Таксономия. Возбудителями кампилобактериоза у человека являются в основном четыре вида: *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* (бактерии группы *C. jejuni*) и *C. fetus* подвид *fetus* (плод), вызывающий у беременных женщин лихорадку, менингоэнцефалиты, эндокардиты, иные поражения и аборты, а возбудителями «желудочно-дуоденальных» хеликобактериозов три – *Helicobacter pylori* (чаще всего), *H. fenelliae* и *H. cinaedi*. Тот и другой род составляют семейство *Campylobacteriaceae*, в состав которого входят пять патогенных видов кампилобактеров и четыре вида хеликобактеров.

Клинические проявления и эпидемиологические особенности. По патогистологической картине поражений и клиническому проявлению кампилобактериоз является острым гастроэнтеритом, а хеликобактериоз – гастродуоденитом. Протекают они как обычные кишечные инфекции: с болями в области желудка, изжогами и отрыжками, диареями, т. е. отдифференцировать их по симптомокомплексу очень трудно, так как ни один симптом не является патогномоничным (специфичным). Источниками инфекции являются дикие и домашние животные, птицы, продукты и вода, инфицированные кампило- и хеликобактерами.

Биологические особенности. *Морфология.* Бактерии семейства кампилобактерий – спиральные S-образно изогнутые бактерии размером 0,5–5 × 0,2–0,8 мкм (кампилобактеры) и 2,5–4 × 0,5 мкм (хеликобактеры). Спор и капсул не образуют, имеют полюсные жгутики, в частности у кампилобактеров 1–2, а у хеликобактеров – пучок из 4–5, иногда покрытых чехликами. По Граму окрашиваются отрицательно. При идентификации кампилобактеров, плохо воспринимающих водные растворы анилиновых красителей, окрашивают их карболовым фуксином Циля.

Культуральные свойства. Все патогенные для человека виды семейства кампилобактерий в аэробных и анаэробных условиях не растут. Одни из них капнофилы, требующие для своей жизнедеятельности 10–15 % диоксида углерода, а другие – микроаэрофилы, развивающиеся в газовой среде, состоящей из 5 % кислорода, 85 % азота и 10 % диоксида углерода. При этом бактерии группы *C. jejuni* очень требовательны к составу питательной среды. Ее основой при выделении кампилобактеров может служить питательный агар для бруцелл с добавлением к нему 7–10 % эритроцитов и антибиотика амфотерицина В для подавления роста банальной микрофлоры. Температурный оптимум их роста – 42 °С. Хеликобактеры хорошо растут при температуре 37 °С на кровяном или шоколадном агарах с цефсулодином. На плотных средах кампилобактеры через 3–5 сут формируют двоякого рода колонии: плоские слизистые, сливающиеся (рис. 96), и мелкие диаметром 1 мм, гладкие блестящие с ровными краями.

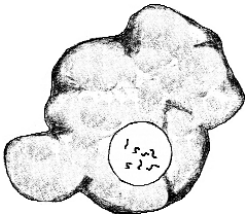


Рис. 96. Колонии кампилобактерий и их морфология

В жидких средах кампилобактеры дают гомогенное помутнение и осадок. Хеликобактеры на элективных для них агаровых средах образуют через 48–72 ч точечные колонии, иногда окруженные зоной гемолиза, на жидких средах – голубовато-серую пленку с незначительным их помутнением.

Биохимические свойства. Патогенные для человека кампило- и хеликобактеры не ферментируют углеводов. Те и другие образуют сероводород. Кампилобактеры восстанавливают нитраты и оксидазоположительны, а хеликобактеры продуцируют уреазу и каталазоположительны.

Антигены и факторы патогенности. У всех патогенных видов семейства кампилобактерий содержатся соматические, жгутиковые и белковые антигены, определяющие их типоспецифичность. Кампилобактеры быстро колонизируют слизистую верхних отделов тонкого кишечника благодаря высоким адгезивной и инвазивной способностям, которые обеспечиваются наличием у них жгутиков и поверхностных адгезинов. Отек, гиперплазия и эрозии кишечника, которые вызываются кампилобактерами, обусловлены продукцией ими двух типов энтеротоксинов. Один из них термолабильный, по механизму действия подобен энтеротоксинам эшерихий и холерного вибриона, а другой – термостабильный, высвобождающийся после их гибели, аналогичный эндотоксинам грамотрицательных бактерий.

Процесс хеликобактерного гастродуоденита объясняется способностью *H. pylori* и других близкородственных ему видов расщеплять покрывающую поверхность желудка слизь, прикрепляться к его эпителиальным клеткам и проникать в железистый аппарат. При этом обнаженная слизистая оболочка желудка повреждается желудочным соком. Развивающийся воспалительный процесс сопровождается распадом в капиллярах эритроцитов под действием гемолизина с образованием гемина и, главное, мочевины. Выделяющие уреазу хеликобактеры превра-

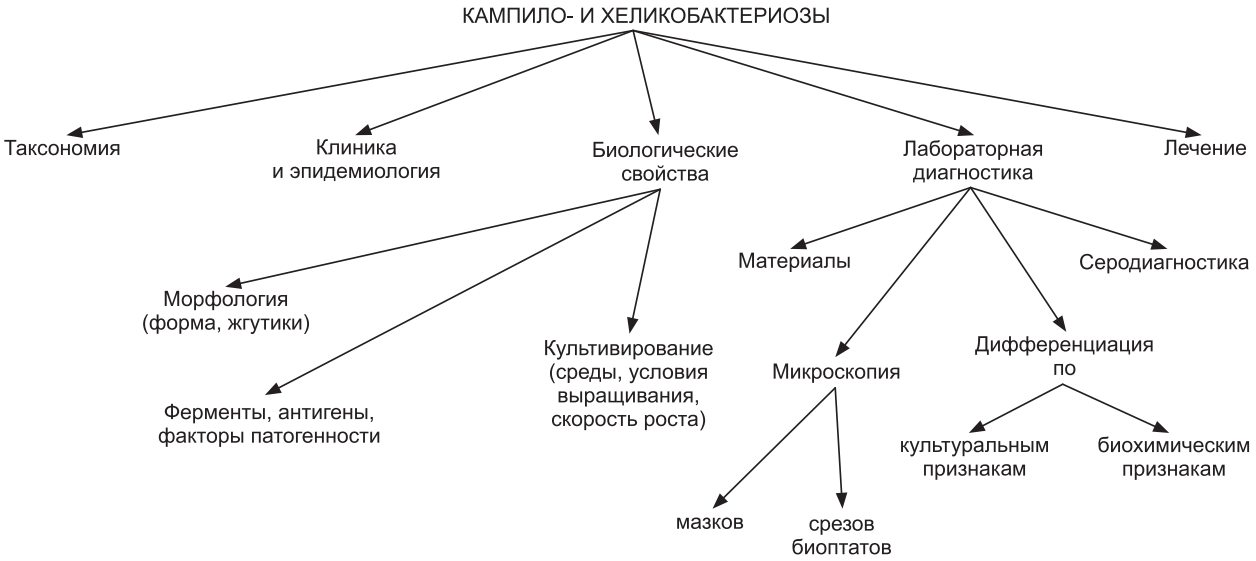
щают ее в аммиак, который, усиливая действие соляной кислоты, вызывает образование эрозий и язв желудка и двенадцатиперстной кишки.

Лабораторная диагностика. Материалами для исследований при кампилобактериозах служат испражнения и кровь, а при хеликобактериозах – биоптаты слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки. Бактерии распознают в мазках по характерным морфологическим признакам, нередко применяя фазово-контрастную микроскопию суспензий испражнений и биоптатов, позволяющую определить винтообразную подвижность бактерий. Лучшие результаты дает окраска мазков акридиновым оранжевым с последующей микроскопией в люминесцентном микроскопе. Гистологические срезы биоптатов на предмет обнаружения в них хеликобактеров окрашивают гематоксилин-эозином. Разработаны тест-системы для иммуноферментного определения в них антигенов хеликобактеров и биохимические способы определения уреазной активности, которые косвенно указывают на зараженность *H. pylori*.

Одновременно с этим получают чистые культуры и дифференцируют их по культуральным и биохимическим свойствам, определяя, главным образом, оксидазную, каталазную и уреазную активность.

Для идентификации специфических антител в диагностике кампилобактериозов применяют РА с обработанной формалином культурой. При наличии специальных антигенов и коммерческих реагентов с той же целью можно использовать РНГА, РСК, РИФ и ИФА. Для выявления видоспецифических антигенов в сыворотке больных хеликобактериозным гастродуоденитом имеются особые тест-системы. Большие надежды возлагаются на ПЦР, с помощью которой можно отдифференцировать не только кампилобактериоз от хеликобактериоза, но и разные их формы.

Лечение. В большинстве случаев кампилобактерный гастроэнтерит протекает благоприятно и больные в лечении антибиотиками не нуждаются. Приступы тяжелых болей в эпигастрии купируются метронидазолом и фуразолидоном.


КАМПИЛО- И ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗЫ
Таксономия
Клиника и эпидемиология
Биологические свойства
Лабораторная диагностика
Лечение
Морфология (форма, жгутики)
Ферменты, антигены, факторы патогенности
Культивирование (среды, условия выращивания, скорость роста)
Материалы
Микроскопия
Дифференциация по
Серодиагностика
мазков
срезов биоптатов
культуральным признакам
биохимическим признакам

Граф 77

Возбудитель сибирской язвы

Таксономия. Возбудитель сибирской язвы – *Bacillus anthracis*, описанный в 1849 г. А. Поллендером и К. Давеном, а в 1876 г. выделенный Р. Кохом, относится к сем. *Bacillaceae*.

Клиника и эпидемиология. Сибирская язва – особо опасное инфекционное заболевание из группы инфекций кожных покровов и слизистых оболочек, описанное в конце XV в. С.С. Андреевским в Сибири. В зависимости от входных ворот инфекции различают три формы сибирской язвы: кожную, висцеральную (легочную, кишечную) и септическую. У человека в 98 % случаев возникает кожная форма, при которой на месте внедрения возбудителя путем поэтапного превращения красного пятна в медно-красную папулу и везикулу формируется покрытый черной коркой карбункул (*anthrax* – углевик), характеризующийся безболезненностью и резкой отечностью окружающих его тканей. Висцеральная форма протекает в виде тяжелой интоксикации при явлениях геморрагической пневмонии или диареи с рвотой и выделением кровянистых испражнений. Сибиреязвенный сепсис, как правило, – явление вторичное, возникающее вслед за другими формами инфекции. Первичный сепсис возможен при массивном инфицировании человека высоковирулентными штаммами бацилл.

Сибирская язва – зоонозное заболевание, эпизодически встречаемое повсеместно. Источником инфекции являются травоядные, преимущественно парнокопытные домашние животные (мелкий и крупный рогатый скот, свиньи). Факторами передачи сибиреязвенной инфекции среди людей могут служить почва, сырье (кожа, волосы, щетина), шерстяные и меховые изделия, мясные продукты. Пути ее передачи разнообразны: контактный (основной), алиментарный, аспирационный. Заболеваемость сибирской язвой среди людей носит спорадический характер. Болеют, главным образом, чабаны, доярки, зоотехники, ветеринары, рабочие мясокомбинатов и предприятий, обрабатывающих сырье животных.

Биологические особенности сибиреязвенной бациллы. *Морфология и культуральные свойства*. Возбудитель сибирской язвы – крупная неподвижная стрептобацилла с

обрубленными или даже вогнутыми концами размером 4–10 × 1–2 мкм. Во внешней среде она образует не превышающую поперечник палочки центрально расположенную овальную спору, а в организме человека и животных, на сывороточных и кровяных средах – капсулу, которая нередко окружает две-три особи. Располагаются сибиреязвенные палочки в мазке цепями и при утолщении их концов могут напоминать бамбуковую трость, а после 3–6-часового подращивания на МПБ и питательном агаре с пенициллином в результате утраты пептидогликана и превращения в сферопласты-бусинки – «жемчужное ожерелье». По Граму они окрашиваются положительно.

Сибиреязвенная палочка – факультативный анаэроб, хорошо развивается на простых питательных средах в широком температурном диапазоне (от 12 до 42 °С). При оптимальной температуре 37 °С через 18–24 ч образуются серебристо-серые, грубозернистые R-колонии, окаймленные клубками переплетающихся нитей, что придает им вид расстрепанного парика, львиной гривы или головы горгоны Медузы (рис. 97).

На МПБ культура вырастает на дне пробирки в виде комочка ваты, а среда остается прозрачной. При засеве столбика желатина уколом сибиреязвенная бацилла разрастается в виде перевернутой елочки.

Биохимическая активность. Бацилла обладает большим набором ферментов, расщепляющих углеводы, белки и липиды.

Антигены и токсины. В культуре сибиреязвенных бацилл обнаруживаются три антигена: соматический, капсульный и протективный. Соматический антиген является термостойким оболочечным полисахаридом, который выявляется в реакции Асколи, капсульный, представленный полипептидами, связанными с Д-глютаминовой кислотой, ингибирует фагоциты, а протективный – особым иммуногенным белком, который секретируется бациллами на специальных средах. Возбудитель сибирской язвы продуцирует экзотоксин, состоящий из отечного и летального факторов, вызываю-

Рис. 97. Колония сибиреязвенной бациллы и ее морфология

щих у животных отек легких и некроз кожи со смертельным исходом. При этом гены, детерминирующие вирулентность (капсуло- и токсинообразование) и иммуногенность (протективный антиген) находятся в плазмидах.

Иммунитет. Характер иммунитета при сибирской язве сложный. В процессе заболевания вырабатываются протективные антитела, активируется фагоцитарная реакция и развивается гиперчувствительность замедленного типа, которая сохраняется в течение многих лет после перенесенного заболевания. Исчерпывающих эпидемиологических данных о длительности и напряженности постинфекционного иммунитета не получено.

Лабораторная диагностика. Предварительный диагноз сибирской язвы ставится на основании микроскопического исследования патологического материала, а окончательный – после определения видовой принадлежности культуры, выделенной из него. При этом на каждом этапе микробиологического исследования *B. anthracis* дифференцируют с широко обсеменяющими окружающую среду сибиреязвенноподобными почвенными бациллами – *B. cereus*, *B. cereus var. mycoides*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, – которые, попадая в продукты, могут вызывать пищевые отравления, а у ослабленных лиц – даже эндокардиты, менингиты, бактериемию. Чаще всего при антракоид-инфекциях выделяют *B. cereus*, продуцирующую экзотоксин.

Микроскопия. Материалом исследования при сибирской язве являются экссудат карбункула, мокрота, испражнения, а при сепсисе – кровь и моча. Для обнаружения сибиреязвенной бациллы делают три мазка. Один из них окрашивают по Граму, а два остальных – по Пешкову и Книги. В положительных случаях выявляют грамположительные цепи бацилл, имеющих капсулы. Основным отличительным признаком антракоидов является их подвижность, что определяют в висячей и раздавленной каплях.

Бактериологическое исследование. Материалы больного, исключая кровь, для уничтожения неспороносной микрофлоры прогревают 5–10 мин при температуре 80 °С и только затем засевают на различные среды: в чашки с МПА; в пробирки или колбы с МПБ (кровь), а еще лучше – в бульон Хоттингера или обогащенные жидкие среды, содержащие раствор Хенкса и бычью или лошадиную сыво-

ротку, на которых сибиреязвенная бацилла закономерно образует капсулу; в кровяной МПБ; в лакмусовую сыворотку; в столбик желатина. Выращивается возбудитель сибирской язвы в термостате при 37 °С в течение 24 ч.

На всех жидких средах сибиреязвенная бацилла растет придонно в виде комка ваты, не вызывает гемолиза, а антракоиды мутят их с образованием обычного осадка, морщинистой сухой пленки, вызывая лизис эритроцитов в бульоне с кровью. На лакмусовой сыворотке бациллы сибирской язвы вызывают покраснение среды, а антракоиды – ее посинение. В столбике желатина сибиреязвенная бацилла вырастает, как мы уже указывали, в виде перевернутой елочки, а через 3–4 дня разжижает его в виде чулка; антракоиды – разжижают желатин вдоль линии их засева. На пластинчатом агаре сибиреязвенная бацилла формирует крупные шероховатые колонии, напоминающие «растрепанный парик», антракоиды – шероховатые колонии-снежинки с зазубренными, бахромчатыми, завихренными вправо и влево нитями.

Подозрительные колонии микроскопируют, взвешивают в раздавленных и висячих каплях и, обнаружив типичные капсулообразующие бациллы, которые не обладают подвижностью, пересевают на скошенный агар.

Получив чистую культуру сибиреязвенных бацилл, прежде всего определяют ее вирулентность, подкожно заражая нескольких белых мышей, морских свинок или кролика. При этом мыши погибают спустя 1 сут от сепсиса с явлениями полнокровия внутренних органов и с обильными кровоизлияниями. В мазках из крови и отпечатках из органов обнаруживаются типичные капсульные стрептобациллы. Одновременно на засеянную газоном культуру в чашках Петри наносят специфические фаги «ВА-9» и «Саратов», определяя их литическое действие. И, наконец, воспроизводят тест «жемчужного ожерелья»: 3-часовую бульонную культуру засевают в чашки Петри с МПА, содержащим 0,5–0,05 ЕД/мл пенициллина, и, получив микроколонии через 3 ч роста, обнаруживают в них наряду с обычными стрептобациллами стрептомакрококки.

Стрептобациллы-антракоиды не патогенны для животных, не лизируются сибиреязвенным фагом и не дают теста «жемчужного ожерелья», но в отличие от сибиреязвенных обладают лецитиназной и фосфатазной активностью.

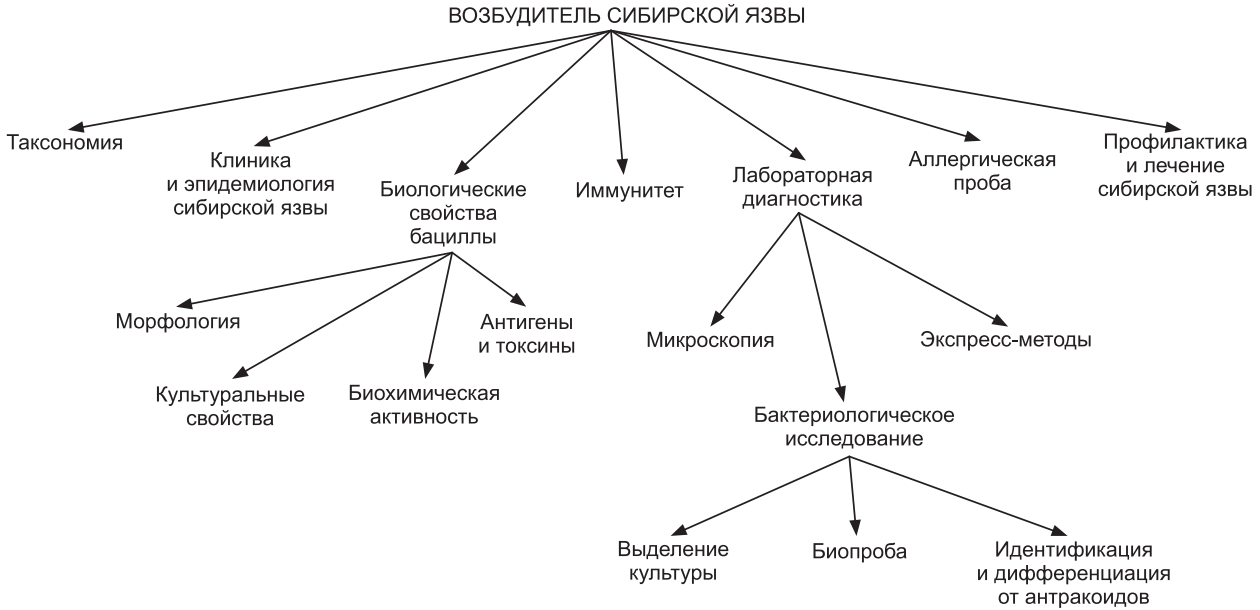
Биологический эксперимент. Как самостоятельный метод биологический эксперимент используется для выделения чистой культуры сибиреязвенных бацилл и определения их вирулентности. Обычно заражают мышей, вводя материал подкожно или внутрибрюшинно. Инфицированные мыши, как уже было отмечено, погибают спустя 24–48 ч от сепсиса. Сибиреязвенную культуру проще всего получить путем засева капли крови из сердца трупа животного на чашку Петри с МПА.

В тех случаях, когда из подозрительного материала выделить возбудитель невозможно (например, из разложившегося трупа, кожи, шерсти), прибегают к постановке *реакции кольцепреципитации Асколи.* С этой целью материал измельчают, заливают 10–20-кратным объемом изотонического раствора натрия хлорида, кипятят или выдерживают 16–20 ч при температуре 6–14 °С. Полученный экстракт фильтруют, прозрачную вытяжку, содержащую антиген-полисахарид, наслаивают на преципитирующую сыворотку. Реакция проявляется в первые 5–10 мин образованием мутного кольца преципитации на границе двух жидкостей (см. рис. 74).

Экспресс-диагностика сибирской язвы. Самый простой и доступный метод ускоренной диагностики основан на обнаружении в мазках капсул. Для этого микроскопируют материал, двухчасовые микрокультуры сибиреязвенных бацилл или перитониальный экссудат в первые часы после внутрибрюшинного заражения белых мышей. Большие возможности открывает реакция иммунофлюоресценции, позволяющая по ободочному свечению выявить в материале даже единичные особи бацилл.

Кожно-аллергическая проба. Гиперчувствительность больных и реконвалесцентов выявляют с помощью антраксина (гидролизат сибиреязвенных бацилл). Препарат вводят в количестве 0,1 мл внутрикожно в ладонную поверхность предплечья. Результаты кожной пробы учитывают через 24 и 48 ч. При положительной реакции на месте введения аллергена возникает инфильтрат и гиперемия диаметром не менее 10 мм.

Специфическая профилактика и лечение. Противосибиреязвенная вакцина впервые получена Л. Пастером, а затем Л.С. Ценковским. В настоящее время специфическая профилактика сибирской язвы у людей проводится


ВОЗБУДИТЕЛЬ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ
Таксономия
Клиника и эпидемиология сибирской язвы
Биологические свойства бациллы
Иммунитет
Лабораторная диагностика
Аллергическая проба
Профилактика и лечение сибирской язвы
Морфология
Культуральные свойства
Биохимическая активность
Антигены и токсины
Микроскопия
Экспресс-методы
Бактериологическое исследование
Выделение культуры
Биопроба
Идентификация и дифференциация от антракоидов

Граф 78

четырьмя типами вакцин: 1) вакциной СТИ из лиофилизированных спор бескапсульного мутанта *B. anthracis* для накожного (500 ± 100 млн спор) и подкожного (90 ± 10 млн спор) применения; 2) химической вакциной из сорбированного на носителе протективного антигена, который получают в процессе культивирования вакцинного штамма; 3) комбинированной, состоящей из спор ослабленных штаммов и протективного антигена, сорбированного на геле гидроксида алюминия; 4) рекомбинантной, полученной на основе *B. subtilis* и лактобацилл, в геном которых удалось ввести гены протективного антигена сибиреязвенных бацилл. Кроме того, создаются новые более иммуногенные антисибиреязвенные вакцины. В частности, испытывается полусинтетическая вакцина для пероральной профилактики у свиней, состоящая из протективного антигена с адъювантами – сапонином QS-21 и монофосфориллипидом А в эмульсии твина-80. Конструируются вакцинные штаммы возбудителя с пониженной цитотоксической активностью вследствие структурных изменений в генах летального и отечного факторов. Ведутся поиски штаммов бацилл без генов вирулентности, в плазмидах которых содержится лишь ген, детерминирующий протективный антиген. Проходят испытания сибиреязвенной ДНК-вакцины. Лицам, имевшим контакт с больными сибирской язвой животными или употреблявшими в пищу их мясо, целесообразно в течение 5–10 дней вводить внутримышечно по 20–25 мл противосибиреязвенного иммуноглобулина. Лечение сибирской язвы проводят тем же иммуноглобулином в комплексе с пенициллинами, хлортетрациклинами и аминогликозидами.

Коринебактерии дифтерии

Таксономия. Возбудитель дифтерии – *Corynebacterium diphtheriae* (coryna – булава, *bacterium* – палочка, *diphthera* – пленка) относится к роду *Corynebacterium* сем. *Corynebacteriaceae*. Открыл коринебактерии дифтерии Э. Клебс (1883), а выделил в чистой культуре Ф. Леффлер (1884).

Клиника и эпидемиология. Дифтерия – острая инфекция дыхательных путей, которая характеризуется образованием в зеве и слизистой носа серовато-белых наложений

(пленок), спаянных с подлежащей тканью и не снимаемых тампоном. Это фибринозно-дифтеритическое воспаление иногда захватывает гортань, трахею, бронхи, и тогда вследствие их отека возникает затруднение дыхания и асфиксия (дифтерийный круп). Реже встречаются экстрафарингиальные формы заболевания: дифтерия глаз, уха, кожи, наружных половых органов у девочек. Дифтерия протекает при явлениях тяжелой интоксикации, исходящей из пленки, которая содержит огромное количество коринебактерий, продуцирующих экзотоксин. Проникая в кровь, токсин поражает сердечно-сосудистую, нервную и адреналовую системы. Источником инфекции являются больные, реконвалесценты и здоровые носители. Передается дифтерия воздушно-капельным путем. В окружающей среде возбудитель сохраняется в течение нескольких дней и даже недель, вследствие чего заражение происходит также пылевым путем или через инфицированные предметы, игрушки, пищевые продукты. Наиболее восприимчивы к дифтерии дети от 6 мес. до 4 лет.

Биологические особенности возбудителя. *Морфология и культуральные свойства.* Коринебактерии представляют собой булавовидные полиморфные палочки размером 1–8 мкм в длину и 0,3–0,8 мкм в ширину. Вид булавок придает им наличие на концах одного-двух зерен волютина (зерен Бабеша – Эрнста). Эти полюсные включения окрашиваются метиленовым синим в фиолетовый цвет, а цитоплазма палочек – в голубой. Более резко контрастируют зерна волютина при окраске мазков по Нейссеру (уксусно-кислая синь – 1 мин, промыть водой, раствор Люголя – 30 с, везувин – 10–15 мин), когда бактерии окрашиваются в желтый цвет, а метахроматические включения Бабеша – Эрнста – в коричневый, черный или темно-синий.

Коринебактерии дифтерии грамположительны и равномерно окрашиваются в фиолетовый цвет. Благодаря разламывающему механизму деления их клетки в мазке располагаются под углом и образуют букву игрек или римские пятерки-десятки. Спор и капсул не образуют, неподвижны. Сапрофитические двойники *C. pseudodiphteriticum* (коринеформные бактерии), часто обитающие на слизистой оболочке носоглотки, влагалища и выделяемые из различных ран, располагаются в мазках частоколом, зерен волютина не имеют или содержат их в большом количестве.

Возбудители дифтерии – факультативные анаэробы, выращиваются при температуре 37 °С. Выделяются из патологического материала на свернутой лошадиной сыворотке (среда Ру), кровяном агаре с теллуритом калия (среда Клауберга) или сывороточном агаре с теллуритом калия и цистином (среда Тинсдаля). На элективной среде Ру коринебактерии дифтерии опережают в росте банальную микрофлору и через 8–14 ч вырастают в виде изолированных точечных выпуклых желтовато-кремовых колоний с гладкой или слегка зернистой поверхностью. На дифференциально-диагностических средах Клауберга и Тинсдаля растут медленнее (24–48 ч), но процент высеваемости возбудителей дифтерии на них намного выше, чем на среде Ру. Самым важным достоинством дифференциально-диагностических сред является то, что они позволяют провести внутривидовую дифференциацию коринебактерий дифтерии на три биовара: *gravis*, *mitis*, *intermedius*. При этом биовар *gravis* (грубый) формирует радиально исчерченные с волнистым краем R-колонии серого или серовато-темного цвета, *mitis* (тонкий) – гладкие черные блестящие выпуклые S-колонии (рис. 98), а промежуточный биовар *intermedius* – RS-формы. На среде Тинсдаля вокруг колоний всех биоваров образуется темно-коричневый ободок, а на кровяно-теллуритовом агаре Клауберга – зона гемолиза вокруг митис-колоний.

Пропись кровяно-теллуритового агара Клауберга. К 100 мл расплавленного и охлажденного до 50 °С 2–3 %-ного агара добавляют 5–10 % дефибринированной крови и 1 мл 2 %-ного раствора теллурита калия (K_2TeO_4).

Пропись цистин-теллурит-сывороточной среды Тинсдаля. К 100 мл расплавленного и охлажденного до 50 °С МПА последовательно добавляют: 1) 1 %-ный раствор цистина на 0,1 н. растворе NaOH – 12 мл; 2) 0,1 н. раствор HC1 – 12 мл; 3) 2 %-ный раствор теллурита калия – 1,5–1,8 мл; 4) 2,5 %-ный раствор гипосульфита натрия – 1,8 мл; 5) лошадиную или бычью сыворотку – 20 мл.

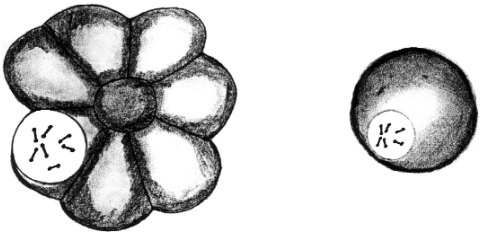


Рис. 98. Колонии коринебактерий дифтерии и их морфология

На сывороточном и сахарном бульонах биовар *gravis* дает зернистый осадок, иногда с пленкой, биовары *mitis* и *intermedius* вызывают их помутнение.

Ложнодифтерийные бактерии культивируются на всевозможных средах, в том числе и на простом питательном агаре, где образуют сухие, мелкие колонии серого цвета (размножаясь в жидких, вызывают их помутнение).

Антигены. Коринебактерии дифтерии содержат липидные и полисахаридные межвидовые О-антигены и белковой природы специфические видовые К-антигены. По К-антисывороткам дифтерийные бактерии разделены на 58 сероваров: 14 – у биовара *gravis*, 40 – у *mitis* и 4 – у *intermedius*.

Ферменты. Коринебактерии дифтерии биохимически неоднородны. Постоянно ферментируют глюкозу и мальтозу, а биовар *gravis*, кроме того, крахмал и гликоген. Ложнодифтерийные бактерии гликозидаз не имеют. Основными тест-ферментами, позволяющими отдифференцировать коринебактерии дифтерии от коринеформ, являются цистиназа и уреаза. При этом коринебактерии дифтерии продуцируют только цистиназу, а ложнодифтерийные – уреазу (см. пробы Пизу и Закса в параграфе «Определение ферментативных свойств бактерий»).

Токсины и факторы патогенности. Коринебактерии дифтерии подразделяют на токсигенные и нетоксигенные разновидности. Свойство токсигенности дифтерийным штаммам придает умеренный фаг λ, вводя в их геном *tox*-гены. Дифтерийный токсин, как и ряд других, является сложным полипептидом. Состоит он из А-фрагмента, проявляющего ферментативную активность, и В-фрагмента, который, взаимодействуя с клеточными рецепторами, способствует проникновению в цитоплазму А-компонента. Специфической мишенью для дифтерийного токсина является фактор элонгации 2 (трансфераза), который наращивает полипептидную цепь на рибосоме. Механизм его действия объясняется каталитическим переносом АТФ-рибозы цитоплазматического никотинамиддинуклеотида на гистидиновые остатки фактора 2, в результате чего модифицированная молекула элонгации не образует комплекс с ГТФ и тРНК, связывающихся с синтезируемой молекулой иРНК. Следствие такого действия – функциональные и структурные нарушения в миокарде больных, парезы и па-

раличи из-за демиелинизации нервных волокон. Помимо экзотоксина, коринебактерии дифтерии продуцируют гиалуронидазу, нейраминидазу, корд-фактор и некоторые другие факторы патогенности. Сапрофитические коринеформы не токсигенны и агрессинов не выделяют.

Иммунитет. Иммунитет к дифтерии имеет гуморальный характер и, главным образом, обусловлен антитоксинами. Степень его напряженности определяют по титру антитоксина в крови, используя РНГА с эритроцитами, сенсибилизированными дифтерийным анатоксином. Перенесшие дифтерию дети приобретают недостаточно прочный иммунитет и поэтому за день до выписки из стационара прививаются одним дифтерийным (АД-М) или дифтерийно-столбнячным анатоксином (АДС-М), если со времени последней ревакцинации прошло более 5 лет.

Лабораторная диагностика. Исследуемым материалом при дифтерии зева служит серовато-белый налет из очага воспаления. От носителей берут отделяемое носоглотки. Снимают материал двумя впрок заготовленными стерильными влажными ватными тампонами, содержащимися в пробирках с несколькими каплями изотонического раствора натрия хлорида. Один из них используется для приготовления мазков, другой – для засева на среды.

Диагностика дифтерии начинается с микроскопии мазков, которые окрашиваются метиленовым синим, по Нейссеру и Граму. Одновременно материал засевают на селективную среду Ру и дифференциально-диагностические среды Клауберга и Тинсдаля. Выделив культуру, ее идентифицируют по культурально-биохимическим признакам. Затем определяют токсигенность, испытывая культуру в РП на пластинчатом фосфатно-пептонном агаре, подсевая ее бляшками к расположенной по диаметру чашки полоске фильтровальной бумаги, смоченной антидифтерийной сывороткой. Положительная РПГ проявляется образованием на границе взаимодействия антитоксина и продуцируемого экзотоксина равномерно сливающихся полос преципитатов (см. «Реакцию преципитации»). Токсигенность штаммов коринебактерий дифтерии *in vivo* определяют на морских свинках. Введенная внутрикожно культура вызывает у них местный некроз, а подкожная инъекция – летальный исход с экссудацией в

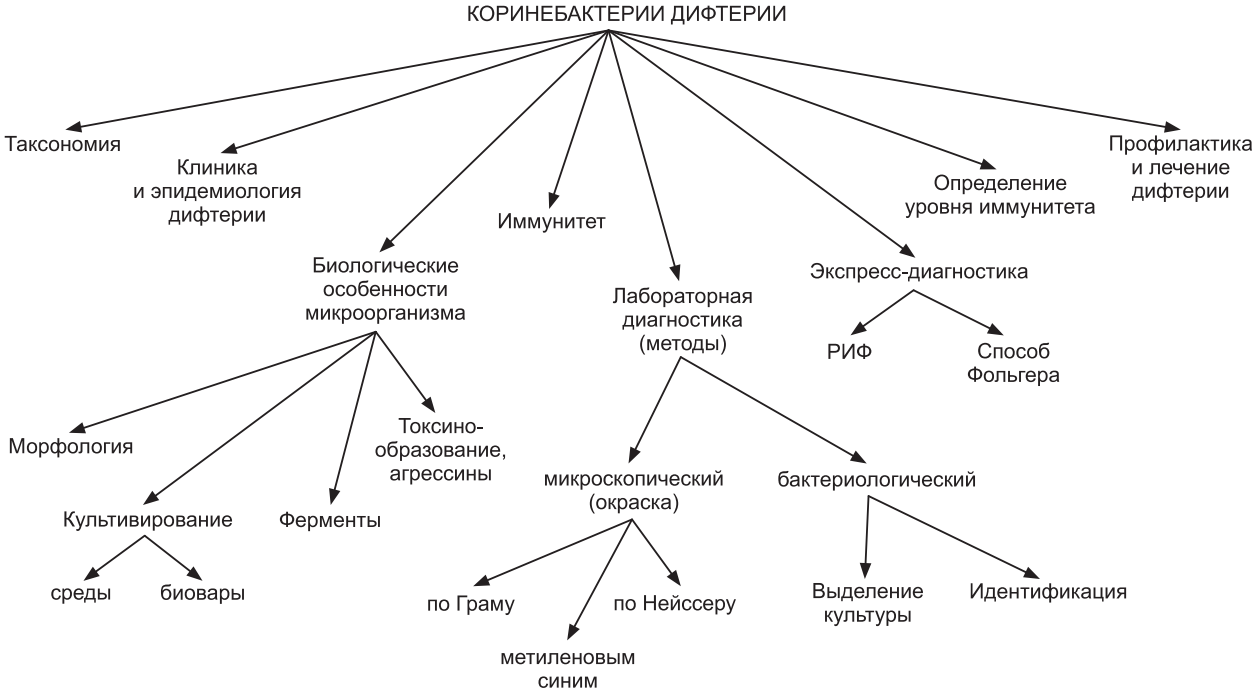
серозные полости и увеличение надпочечников до размера вишни.

Одновременно ставят РА на предметном стекле и в пробирках, используя полигрупповые и моноспецифические сыворотки к сероварам дифтерийной палочки. Для дифференциальной диагностики применяют набор из 9 коринефагов и ПЦР.

Экспресс-диагностика. Если прямой микроскопией мазков, окрашенных красителями, выявить коринебактерий дифтерии в исходном материале не удается, то их обрабатывают флюоресцирующими сыворотками и исследуют под люминесцентным микроскопом. Заслуживает внимания экспресс-метод Фольгера, который с целью ускоренной диагностики дифтерии предложил брать материал из носоглотки на тампоны со свернутой сывороткой, подращивать культуру на них в термостате 3–5 ч и после этого из микрокультур готовить мазки. При добавлении к сыворотке теллурита калия рост микроколоний определяют визуально по почернению тампона.

Специфическая профилактика и лечение. Для профилактики дифтерии используют адсорбированную коклюшно-дифтерийно-столбнячную вакцину (АКДС), содержащую в 1 мл 20 млрд м. т. палочек коклюша, 30 АЕ дифтерийного анатоксина, 10 АЕ столбнячного анатоксина. Вакцинацию начинают с 3-месячного возраста. Курс первичной иммунизации состоит из трех внутримышечных инъекций по 0,5 мл препарата с интервалом 30–40 дней. Ревакцинируют детей однократно в полтора года той же вакциной АКДС, в 6 лет – дифтерийно-столбнячным анатоксином (АДС), а в 11 – одним дифтерийным АДМ-анатоксином (т. е. минимальным), содержащим 5 АЕ. Начиная с 16 лет и через каждое десятилетие ревакцинация производится АДС-М- или АДМ-анатоксином.

Специфическое лечение проводится лошадиной антитоксической иммунной сывороткой, которая вводится дробно по методу Безредки в зависимости от тяжести заболевания в количестве от 20 000 до 100 000 АЕ. Параллельно назначают аминогликозиды и цефалоспорины, которые сокращают сроки бактериовыделения у реконвалесцентов и санируют организм здоровых бактерионосителей.


КОРИНЕБАКТЕРИИ ДИФТЕРИИ
Таксономия
Клиника и эпидемиология дифтерии
Биологические особенности микроорганизма
Иммунитет
Лабораторная диагностика (методы)
Экспресс-диагностика
Определение уровня иммунитета
Профилактика и лечение дифтерии
Морфология
Культивирование
Ферменты
Токсино-образование, агрессины
среды
биовары
микроскопический (окраска)
бактериологический
по Граму
по Нейссеру
метиленовым синим
Выделение культуры
Идентификация
РИФ
Способ Фольгера

Граф 79

Возбудитель листериоза

Таксономия. Возбудитель листериоза относится к роду *Listeria* сем. *Corynebacteriaceae*. Свое название *L. monocytogens* возбудитель получил в честь Дж. Листера и по характерному для листериоза ярко выраженному моноцитозу в периферической крови больных.

Клиника и эпидемиология. По типу течения различают острую, подострую и хроническую формы листериоза, а по характеру проявления – ангинозно-септическую с ярко выраженным мононуклеозом, окологландулярную, септико-тифозную, нервную и абортивную формы, листериоз беременных и новорожденных. Острый листериоз начинается с внезапного повышения температуры и озноба, головной боли, тошноты и рвоты. Вскоре присоединяется инъекция склер, гиперемия лица и полиморфная сыпь. При развитии менингита листериоз у взрослых, особенно у лиц с иммунодефицитами, в 30 % случаев заканчивается смертельным исходом. Столь же неблагоприятно протекает листериоз у плода и новорожденных. Обычно внутриутробное трансплацентарное поражение плода, сопровождающееся образованием в его тканях многочисленных абсцессов и гранулем, приводит к выкидышам и мертворождениям. У инфицированных листериозом новорожденных могут возникать менингиты в результате чего они погибают. Листериоз – зооантропонозная природноочаговая инфекция. Ее резервуарами в природе являются грызуны, дикие и домашние травоядные животные, птицы. Заболеваемость у людей носит преимущественно профессиональный характер. Возбудитель листериоза проникает в организм контактным путем через кожные покровы и слизистые оболочки ротовой полости, носоглотки, конъюнктивы и пищеварительного тракта; аэрозольным – при работе с зараженными кормами; алиментарным – при употреблении инфицированных пищевых продуктов и воды; возможна также передача трансмиссивным путем клещами.

Биологические особенности возбудителя. *Морфология.* Листерии – кокковидные палочки размерами 1–2 × 0,5 мкм, но в старых культурах могут иметь нитевидную форму длиной до 200 мкм. Спор и капсул не образуют. В условиях их выращивания при температуре 20–25 °С приобретают перитрихиальные жгутики. В мазках из свежевыде-

ленных культур и зараженных органов нередко располагаются под углом в виде римской цифры «V» и коротких цепочек. По Граму окрашиваются положительно.

Рис. 99. Колонии листерий и их морфология

Культуральные свойства. Листерии культивируются на обычных средах и при оптимальной для них температуре 30–37 °С, но хорошо расти могут также при 4–38 °С. На плотных питательных средах через 24–48 ч образуют два типа колоний: 1) мелкие (1–2 мм) выпуклые, резко очерченые, гладкие, серовато-молочного оттенка S-колонии с зонами гемолиза вокруг на кровяном агаре; 2) шероховатые, грубозернистые, уплощенные R-колонии диаметром 2–3 мм (рис. 99).

В жидких средах при оптимальной температуре выращивания листерии вызывают равномерное помутнение с осадком, а при температуре 21 °С – помутнение с образованием в нем «зонтика».

Биохимические свойства. Листерии ферментируют до кислоты левулезу, трегалозу и многие другие углеводы, но медленно и непостоянно. Прежде всего при идентификации листерий следует учитывать способность их гидролизовать гиппурат, ферментировать глюкозу и рамнозу, а также и то, что они не расщепляют маннит и крахмал.

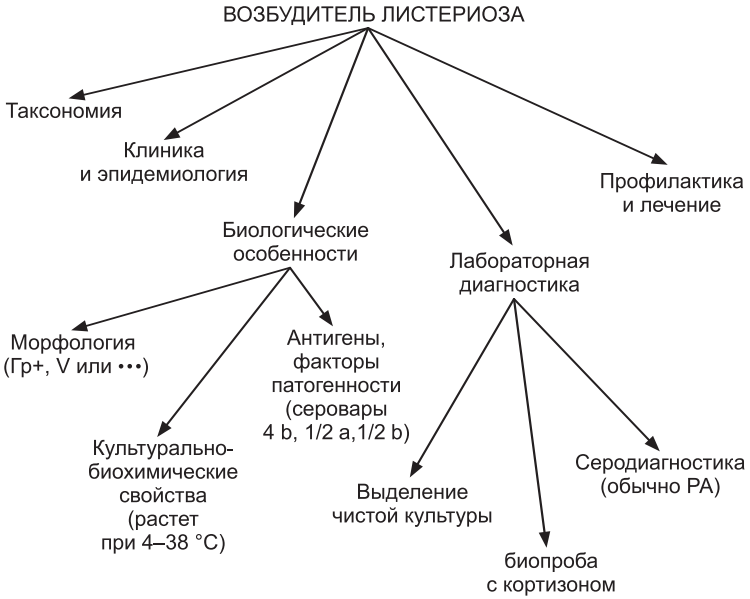
Антигены и факторы патогенности. Листерии содержат соматические и жгутиковые антигены, по структуре которых среди них выделено 16 сероваров. В 90 % случаев листериоз у людей вызывают серовары 4 b, 1/2 a и 1/2 b. Факторами патогенности у листерий являются эндотоксин, мембранный белок интерналин и фосфолипазы, участвующие в растворении клеточных мембран и их проникновении в клетки и листериолизин О, вызывающий гемолиз и повреждающий фаголизосомы.

Лабораторная диагностика. Материалами исследования служат кровь, ликвор, слизь из зева, пунктаты лимфатических узлов, органы и ткани умерших. Посевы необходимо осуществлять в первые дни заболевания предпочтительно на сахарные среды и глюкозо-кровяной агар, где по гемолитической активности отбирают S-колонии лис-

терий для дальнейшего исследования. Параллельно патологическими материалами заражают белых мышей, внутримышечно вводя им за 4 ч до инфицирования 4–5 мг кортизона. Спустя 2–6 сут погибших животных вскрывают, и пораженные листериями суспензии органов отсевают на те же среды.

К серодиагностике приступают к концу второй недели. Обычно ставят РА с листериозным диагностикумом, которая к этому сроку болезни становится положительной в титре 1 : 200. При невысоком титре антител спустя несколько дней реакцию повторяют, исследуя динамику его нарастания.

Профилактика и лечение. В профилактике листериоза у людей большое значение имеют уничтожение грызунов и членистоногих, хранение продуктов в герметичной таре, недоступной для грызунов, и ветеринарный надзор за заболеваемостью сельскохозяйственных животных. Лечение листериоза проводят цефалоспоринами и аминогликозидами.



Граф 80

Возбудители туберкулеза

Таксономия. Возбудителями туберкулеза (*tuberculosis* – бугорчатка) человека являются *Mycobacterium tuberculosis*, открытый в 1882 г. Р. Кохом, бычий вид *M. bovis* и африканский *M. africanum*. Они относятся к сем. *Mycobacteriaceae*. В это же семейство включены сходные с ними по многим признакам атипичные потенциально патогенные *фотохромогенные* виды микобактерий, формирующие на свету желтого цвета колонии (*M. kansasii*); *скотохромогенные*, продуцирующие в темноте желтый, а на свету оранжевый или красноватый пигменты (*M. scrofulaceum*); *нехромогенные* (*M. avium*) и *быстрорастущие* сапрофиты (*M. smegmatis*, *M. phlei* и др.).

Клиника и эпидемиология. Туберкулез – хроническая инфекция, при который поражаются легкие, кишечник, почки, твердая мозговая оболочка, кости, кожа, другие органы и системы. Чаще всего у людей наблюдается туберкулез легких. На месте внедрения возбудителя возникает специфическая воспалительная реакция, в результате которой образуется туберкулезная гранулема (бугорок), характеризующаяся наличием гигантских клеток Лангханса, окруженных валом эпителиоидных клеток и лимфоцитов. Впоследствии специфическая гранулема прорастает коллагеновыми волокнами и обызвествляется. При злокачественном течении туберкулеза в гранулеме происходит творожистый казеозный распад, и микобактерии из нее попадают в кровь и диссеминируют по организму.

Источниками инфекции при туберкулезе являются человек, животные, птицы, холоднокровные. Микобактерии туберкулеза передаются капельным, пылевым и алиментарным путями. Процесс заражения потенциально патогенными микобактериями имеет сложный характер: инфицированные объекты внешней среды → животные → → птицы → человек.

Биологические особенности патогенных микобактерий. *Морфология, химический состав, культивирование.* Микобактерии представляют собой прямые или слегка изогнутые структурно однородные или зернистые палочки размером 2–8 мкм в длину и 0,3 мкм в ширину. Жгутиков не имеют, спор и капсул не образуют. В мазках из мокроты больных располагаются поодиночке или скопления-

ми из 2–3 особей, а в препаратах из культуры склеиваются в жгуты-комки. Микобактерии туберкулеза и атипичные микобактерии содержат большое количество миколовой кислоты и липидов, вследствие чего отличаются кислото-, спирто-, щелочеустойчивостью и плохо воспринимают обычные анилиновые красители, в частности микобактерии туберкулеза по Граму окрашиваются в течение нескольких часов. Для обнаружения их в материале больных применяется метод Циля – Нельсена. Иногда кислотоустойчивые палочки туберкулеза становятся кислотоподатливыми (синими, а не красными при окраске по Цилю – Нельсену) или превращаются в кокки и L-микроструктуры, но сохраняют способность к реверсии.

Кроме типичных микобактерий туберкулеза изредка встречаются ветвистые формы, что, по мнению И.И. Мечникова, указывает на их филогенетическую связь с актиномицетами.

Микобактерии туберкулеза – очень требовательные гетеротрофы, нуждающиеся в глютаминовой и, особенно, аспарагиновой кислоте (источники белка), глицерине и глюкозе (источники углерода), биотине, рибофлавине, никотиновой кислоте и других факторах роста. Минеральный обмен обеспечивают калий, магний, фосфор, сера, железо. Стимулятором роста микобактерий туберкулеза является лецитин, содержащийся в больших количествах в яичном желтке. С учетом этого для выделения и выращивания микобактерий туберкулеза применяют яично-желточную среду Левенштейна – Йенсена с малахитовым зеленым, ломтики глицеринового картофеля, глицериновый бульон, жидкие солевые среды с аспарагином и глицерином. Микобактерии туберкулеза вырастают при 37–38 °С через 3–4 недели, нередко позже. На плотных средах образуются сухие чешуйчатые R-колонии, напоминающие бородавки или цветную капусту (рис. 100). На глицериновом бульоне и синтетических жидких средах через 10–14 сут формируется ломкая морщинистая желтоватая пленка.

Рис. 100. Колония микобактерий туберкулеза и их морфология

Атипичные потенциально патогенные и сапрофитические виды микобактерии культивируются на МПБ и питательном агаре или солевых средах с добавлением сахаров. Растут атипичные микобактерии в широком температурном диапазоне при 22–45 °С. В первых генерациях фото-, ското- и нехромогенные виды вырастают через 2–3 недели, а быстрорастущие микобактерии – на 2–14-е сут. В отличие от вирулентных микобактерий туберкулеза колонии атипичных микобактерий гладкие, круглые, уплощенные или остроконечные, вязкой консистенции, но также встречаются шероховатые формы.

Токсины. Вирулентные штаммы возбудителей туберкулеза содержат и в процессе роста выделяют многие токсические вещества. Так, фосфатиды, фтионовая кислота и воск D микобактерий туберкулеза при введении в организм морской свинки вызывают образование специфических гранулем и подавляют активность фагоцитов. Масляная, пальмитиновая, туберкулостеариновая, олеиновая жирные кислоты приводят к казеозному распаду клеточных элементов. Особый гликолипид, или так называемый корд-фактор, склеивает микобактерии туберкулеза в жгуты и нарушает метаболизм клеток. Высокой ядовитостью отличаются туберкулопротеины, составляющие основу альттуберкулина Коха, который получают путем стерилизации и выпаривания 5–6-недельной бульонной культуры микобактерий туберкулеза.

Биохимические свойства. Микобактерии туберкулеза продуцируют многие ферменты. При этом биохимическая активность микобактерий часто зависит от их чувствительности к туберкулостатическим препаратам и вирулентности. Так, чувствительные к изониазидам штаммы обладают выраженной каталазной и пероксидазной активностью, а изониазидоустойчивые – низкой (атипичные микобактерии имеют лишь каталазу). *M. tuberculosis* в большом количестве синтезируют никотиновую кислоту (ниацин), которая с раствором цианида калия и хлорамина Б дает ярко-желтое окрашивание. Ниациновая проба на культурах *M. bovis* и атипичных видов микобактерий отрицательна.

Иммунитет. Устойчивость к туберкулезу у людей высока и обусловлена многими факторами неспецифической резистентности, среди которых определяющее значение

могут иметь нормальные киллеры, естественные иммунологические барьеры и туберкулостатические вещества крови, органов и тканей. На однояйцевых близнецах доказана наследственная предрасположенность у людей к туберкулезу. Приобретенный противотуберкулезный иммунитет – нестерильный и в основном обеспечивается цитотоксическими лимфоцитами, что в экспериментах доказывается созданием невосприимчивости путем их переноса от инфицированного донора к здоровому реципиенту. При туберкулезе развивается гиперчувствительность замедленного типа, но ее значение в иммунитете не выяснено.

Лабораторная диагностика. Материалом исследования в зависимости от локализации патологического процесса может быть мокрота, промывные воды бронхов, гной, моча, испражнения, спинномозговая жидкость. Клинический диагноз туберкулеза подтверждается обнаружением в мазках характерных микобактерий. Культуру микобактерий от больных выделяют для определения ее вирулентности, но, главным образом, – лекарственной резистентности с целью разработки индивидуальной схемы этиотропного лечения.

Бактериоскопическое исследование. Обнаружение в мазках микобактерий в большой мере зависит от способа их приготовления. Так, при туберкулезе легких, мазки делают из гнойных комочков мокроты, растирая их между двумя предметными стеклами; при туберкулезном менингите – из пленки фибрина, образующейся при отстаивании спинномозговой жидкости; при туберкулезе почек – из осадков мочи, полученных после центрифугирования.

Если в мазках из мокроты не удается обнаружить микобактерии туберкулеза из-за незначительного их количества, то прибегают к методам обогащения и ускоренного получения микрокультур на предметных стеклах по Прайсу.

Метод обогащения основан на концентрировании микобактерий туберкулеза в небольшом объеме. При этом обычно собирается суточная порция мокроты больного, смешивается с равным объемом 1 %-ного раствора едкого натра и 10–15 мин встряхивается во флаконах со стеклянными бусами до полной гомогенизации. Утратившую вязкость однородную массу мокроты делят затем на две части. Одну из них центрифугируют при 3000 об/мин, а к

другой – добавляют ксилол, бензин, бензол или петролейный эфир и после 10-минутного встряхивания оставляют на 20–30 мин до образования сливкообразного слоя, в который всплывают (флотируют) микобактерии туберкулеза. Затем из осадка и верхнего слоя гомогенизированной мокроты делают два толстых мазка.

С целью получения туберкулезных микрокультур по Прайсу исследуемую мокроту наносят на несколько узких предметных стекол, подсушивают, обрабатывают 5 %-ной серной кислотой для уничтожения посторонней микрофлоры, отмывают в стерильном изотоническом растворе и помещают в цитратную кровь. Начиная с 3–4-го дня, стекла вынимают и окрашивают по Цилю – Нельсену. При наличии в них микроколоний микобактерий туберкулеза в иммерсионном микроскопе обнаруживаются ярко-красного цвета «плетеные косички», «жгуты», «змейки», «колоски» со склеенными в них бактериями, располагающимися параллельными рядами (рис. 101, *а*); атипичные микобактерии образуют аморфные микроколонии с бессистемно разбросанными скоплениями палочек (рис. 101, *б*).

Бактериологический метод. Для выделения чистой культуры микобактерий туберкулеза материал засевают на скошенную в пробирках среду Левенштейна – Йенсена, но при этом нужно иметь в виду, что получить ее из мокроты, фекалий, мочи, других экскретов без предварительной кислотно-щелочной обработки невозможно, так как этому препятствует быстро растущая банальная микрофлора. Для ее уничтожения к мокроте приливают двойной объем 6 %-ной серной кислоты, встряхивают 10 мин и центрифугируют, а к фекалиям на 3 ч добавляют 4 %-ный раствор гидроксида натрия и впоследствии тоже центрифугируют. Полученные осадки нейтрализу-

Рис. 101. Микроколонии микобактерий туберкулеза (*а*) и атипичных микобактерий (*б*)

ют несколькими каплями 3 %-ного натрия гидроксида (мокрота) и 8 %-ной серной кислоты (фекалии) и перед посевом тщательно отмывают изотоническим раствором натрия хлорида.

Чтобы не допустить высыхания засеянных сред Левенштейна – Йенсена, пробирки плотно закрывают пробками и парафинируют их. Посевы помещают в термостат и выращивают при температуре 37 °С в наклонном положении 2–3 недели, а иногда 2–3 мес.

При определении лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к среде Левенштейна – Йенсена добавляют различные концентрации туберкулостатических препаратов, засевая на нее материал, содержащий не менее 5 микобактерий в поле зрения микроскопа.

Биологический эксперимент. К заражению животных прибегают при отрицательных результатах микроскопии и невозможности выделения чистых культур микобактерии туберкулеза на средах. Обычно используют морских свинок. Экскреты перед инфицированием обрабатывают так же, как и для посева на среду Левенштейна – Йенсена. Чаще всего животных заражают подкожно в паховую область или внутрибрюшинно. Приблизительно через 2 недели на месте подкожного введения материала может возникнуть инфильтрат (иногда язвочка). В мазках из гноя и пунктатов паховых лимфатических узлов обнаруживаются микобактерии туберкулеза. Спустя 1,5 мес. от момента заражения свинок ставят реакцию Манту, вводя внутрикожно 0,1 мл альттуберкулина. При положительной аллергической пробе через 24–48 ч на месте введения аллергена появляется папула с гиперемией вокруг диаметром 10 мм и более. Если инфицированные морские свинки не погибают, то через 2–3 мес. их убивают. В печени, селезенке, реже – в легких зараженных животных находят огромное количество зерен-бугорков, а в мазках-отпечатках из них – скопления микобактерий туберкулеза среди клеточных элементов. Так как большинство изониазидустойчивых штаммов микобактерий туберкулеза утрачивают вирулентность по отношению к морским свинкам, то в настоящее время биологический эксперимент на них утратил былое значение. Для дифференциации *M. hominis* от *M. bovis* и *M. africanum* используется биологическая проба на кроликах – к первому виду они обладают геноти-

пической устойчивостью, два последних вида вызывают у животных локальный или генерализованный туберкулез.

Кожно-аллергические пробы у людей. В диагностике туберкулеза у взрослых реакция Манту имеет относительную ценность, так как большинство людей инфицировано микобактериями туберкулеза и реагирует положительной реакцией на туберкулин. В распознавании болезни она используется только у детей первых 2–3 лет жизни и воспроизводится путем внутрикожного введения им двух туберкулиновых единиц (ТЕ) очищенного туберкулина ПДД-Л в стандартном разведении. Учет производится через 72 ч. Положительной считается реакция при наличии папулы диаметром 5 мм и более, отрицательной – при полном отсутствии инфильтрата и гиперемии (не считая точечной).

Серодиагностика. В серодиагностике туберкулеза используется РНГА Миддлбрука – Дюбо. При этом сыворотка больного предварительно истощается взвесью интактных эритроцитов от групповых антител и разводится 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16. В качестве антигена применяют эритроциты барана или человека 0-группы, сенсибилизированных туберкулином. Диагностическим титром сыворотки считается 1 : 8, который регистрируется у 70–90 % больных.

Специфическая профилактика и лечение. Специфическая профилактика туберкулеза осуществляется ослабленной лиофилизированной вакциной БЦЖ (BCG – **б**ациллы **К**альметта – **Г**ерена). Первичная вакцинация проводится в родильном доме на 3–4-й день жизни ребенка. Вакцина вводится внутрикожно в дозе 0,05 мг/0,1 мл. Непривитые в роддоме дети вакцинируются щадящей БЦЖ-М-вакциной. Она вводится тоже внутрикожно, но в половинной дозе (0,025мг/кг). Дети ревакцинируются в возрасте 7 лет, но повторная вакцинация может проводиться и позже, вплоть до 14 лет. В каждом из этих случаев прививки делают лишь тем детям, которые реагируют на туберкулин отрицательной реакцией Манту. Для лечения туберкулеза применяются многие туберкулостатические вещества: изониазиды, стрептомицин, этамбутол, пиразинамид, рифампицин (препараты первого ряда); канамицин, циклосерин, тиоацетазон (тибон), этоксид, этионамид (препараты второго ряда).

ВОЗБУДИТЕЛИ ТУБЕРКУЛЕЗА
Таксономия микробактерий
патогенных
атипичных
Клиника и эпидемиология туберкулеза и микобактериозов
Биологические особенности микобактерий
Морфология и химический состав
Культивирование
Токсины
Ферменты
Иммунитет
Лабораторная диагностика (методы)
микроскопический (методы обогащения)
бактериологический
Подготовка материала
Среды
Характер роста
Определение лекарственной резистентности
биологический
Определение вирулентности
Экспресс-диагностика (получение микрокультур)
Кожно-аллергические пробы
Профилактика и лечение туберкулеза и микобактериозов

Граф 81

Возбудитель лепры

Таксономия. Лепру вызывает *Mycobacterium leprae*, которую в 1874 г. описал Г. Гансен.

Клиника и эпидемиология. Лепра – древнейшее заболевание человека *«zaroath»* (проказа), упоминаемое в Библии. В Европе, куда она была занесена в 5–3 вв. до н. э., ее называли *«elephantiasis»* (слоновость нижних конечностей), но некоторое время спустя толкователи Священнописаний оба синонима заменили греческим словом *«lepra»* (букв. шероховатость).

Лепра – хроническая генерализованная инфекция человека, проявляющаяся в виде сравнительно легкопротекающей *туберкулоидной* формы, при которой поражается кожа и периферические нервы, и очень тяжелой кожно-висцеральной *лепроматозной* формы.

При той и другой формах болезни в коже возникают специфические гранулемы, основными элементами которых при туберкулоидном типе лепры являются эпителиоидные клетки, окруженные валом лимфоидных клеток с наличием многоядерных клеток типа Лангханса, плазмоцитов, тучных клеток и фибробластов, не содержащих микобактерий, а при лепроматозной – лепрозные клетки с бледными ядрами и пенистой цитоплазмой с большим количеством микобактерий в ней, отдельные плазмоциты и лимфоидные клетки, многоядерные клетки и фибробласты.

Кожные поражения при *туберкулоидном* типе лепры в зависимости от стадии болезни имеют вид четко очерченных асимметричных одиночных розовых пятен, плоских папул, бляшек и узлов. Для развитой формы наиболее характерным кожным элементом на спине, груди и пояснице является эритематозная бляшка с уплощенным атрофическим центром и валикообразно приподнятым краем. Размеры ее варьируют от 10–15 мм до обширных очагов. На лице и конечностях бляшки и бугорки отличаются сравнительно небольшими размерами (от 2–3 мм до 2–3 см), красно-бурым цветом, четкими границами, гладкой поверхностью. Вследствие поражения периферической нервной системы во всех туберозных очагах уже в раннем периоде болезни снижается температурная, болевая и тактильная чувствительность, угнетается сало- и потоотделение. Позже могут развиваться парезы и параличи, у мно-

гих больных появляются язвы, изменяется структура ногтей, а у некоторых происходит некроз фаланг пальцев кистей и стоп с последующим их отторжением (мутиляция).

При *лепроматозном* типе болезни высыпания на коже представлены симметрично расположенными мелкими красно-бурыми, желтовато-медными (рыжими) пятнами, не имеющими четких границ, локализованными на лице, разгибательных поверхностях кистей, предплечий и голени, а также на ягодицах. Многие месяцы и годы они остаются без изменений, иногда могут исчезать, но чаще трансформируются в инфильтраты или узлы (лепромы). При инфильтрации пятна приобретают вид ограниченных бляшек бурого или сине-бурого цвета. Одновременно с этим расширяются выводные протоки потовых желез и усиливается функция сальных, что придает коже вид апельсиновой лоснящейся корки. При диффузной инфильтрации кожи лица, что наблюдается спустя несколько лет, происходит резкое углубление морщин и складок, утолщение надбровных дуг, щек, губ, подбородка, выпадение бровей и ресниц, волос из усов и бороды, что создает облик *facies leonina* («львиной морды»). В областях инфильтрации появляются безболезненные узлы красно-ржавого цвета размером 1–2 мм – 2–3 см, возвышающиеся в виде полушарий над уровнем кожи. Иногда они рассасываются, но чаще изъязвляются. Во всех случаях поражается слизистая оболочка носа, часто слизистая полости рта и гортани. Распад лепром на хряще перегородки носа приводит к его деформации. Увеличиваются почти все лимфатические узлы, поражаются стенки большинства кровеносных сосудов, печень, яички, в 80 % случаев – орган зрения. Позже всего поражается периферическая нервная система. Развитие полиневрита приводит к расстройству трофики и двигательных функций, в результате чего образуются язвы, возникают парезы жевательной и мимической мускулатуры.

Эндемичными регионами по лепре являются Азия (Индия, Индонезия, Мьянма, Таиланд), Африка (Конго, Габон, Верхняя Вольта, Мали, Гвинея), Южная Америка (Бразилия, Венесуэла, Колумбия), а в Европе – Испания, Португалия, Греция и Турция. Источником инфекции выступает больной человек. Передается лепра воздушно-капельным путем, но допускается возможность инфициро-

вания людей через поврежденную кожу и кровососущих насекомых.

Рис. 102. Морфология микобактерий лепры

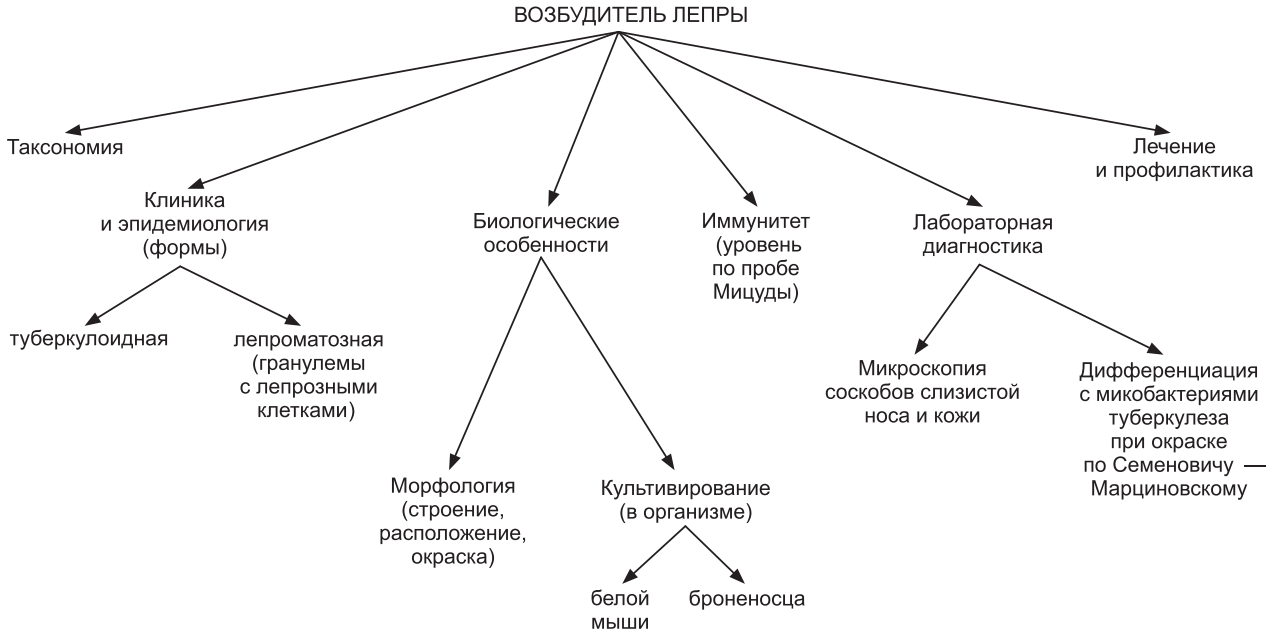
Морфология. Микобактерии лепры имеют вид прямых или слегка изогнутых палочек, длина которых варьирует от 1 до 7 мкм, а ширина – от 0,2 до 0,5 мкм, но встречаются также кокковидные, булавовидные, нитевидные и ветвистые формы. В клетках пораженных тканей микобактерии располагаются параллельно друг к другу, скапливаясь в цитоплазме в виде пачек сигарет (рис. 102). Спор, капсул, жгутиков не имеют. Грамположительны. По химическому составу близки к микобактериям туберкулеза, в частности содержат миколовую кислоту и большое количество липидов. Кислото- и спиртоустойчивы, вследствие чего окрашиваются по Цилю – Нельсену в красный цвет.

На питательных средах микобактерии лепры не растут, не вызывают болезни у лабораторных животных и обезьян. Локальное размножение микобактерий лепры удалось получить путем заражения белых мышей в подошвенную мякоть лапок. Чувствительными к возбудителю лепры оказались девятипоясные броненосцы. При внутривенном заражении этих животных большими дозами микобактерий (10^8) через 1,5–3 года у них развивается генерализованная инфекция, гистологически соответствующая лепроматозной форме человека с наличием громадного количества возбудителей во внутренних органах.

Иммунитет. Лепра – малоконтагиозная инфекция. Так, среди совместно проживающих с больным людей заболевают лепрой не более 10–12 %. Незаболевшие, а также лица, у которых процесс ограничивается субклинической стадией инфекции или самоизлечением на ранней стадии туберкулоидной лепры, рассматриваются как группа с наиболее выраженным иммунитетом. Механизм устойчивости к лепре нельзя связать с каким-либо одним звеном иммунитета. Клеточные реакции иммунитета у больных отрицательны или подавлены, в частности переваривающая способность макрофагов настолько снижена, что именно в них размножаются микобактерии лепры. Анти-

тела при туберкулоидном типе болезни не вырабатываются, а при лепроматозном – продуцируются в достаточно большом количестве, но ингибирующего действия на микобактерии не оказывают. Уровень антилепрозного иммунитета можно определять по аллергической пробе Мицуды. При этом в качестве аллергена чаще всего используется интегральный лепромин, представляющий собой автоклавированную гомогенную суспензию лепром, содержащую 160 млн микобактерий в 1 мл препарата. Ставят ее, как обычно, путем внутрикожного введения 0,1 мл препарата, а результаты учитывают дважды: 1) через 48 ч, когда в положительных случаях на месте введения аллергена возникает гиперемия и небольшая папула (ранняя реакция Фернандеса); 2) спустя 2–4 недели, когда образуется бугорок или узел, иногда с некрозом (поздняя реакия Мицуды). В эндемичных районах лепры установлено, что поздняя реакция Мицуды свидетельствует не об инфицировании организма, а о достаточно высокой напряженности иммунитета к возбудителю лепры. У 80–98 % здоровых лиц она положительна, а частота заболеваемости лепрой среди них намного ниже, чем среди тех, кто реагирует на лепромин отрицательной реакцией. Аналогичная взаимосвязь имеется между реакцией Мицуды и тяжестью проявления лепры. У больных с туберкулоидной формой она положительна, с лепроматозной – всегда отрицательна. При обострении туберкулоидной лепры реакция Мицуды временно угасает, а при ее трансформации в лепроматозную форму становится устойчиво отрицательной. В обратном направлении она изменяется после эффективного лечения и ремиссии болезни.

Лабораторная диагностика. Основана на микроскопическом исследовании: 1) мазков из соскобов слизистой оболочки носа и скарификатов кожи, надбровных дуг, мочек ушных раковин, подбородка и дистальных отделов конечностей, других пораженных участков тела; 2) гистологических срезов. Те и другие окрашивают по Цилю – Нельсену, обесцвечивая препараты не 5 %-ным раствором серной кислоты, а слабым 0,5 %-ным раствором, так как микобактерии лепры менее кислотоустойчивы, чем микобактерии туберкулеза. Решающего значения бактериоскопическое исследование не имеет, так как при туберкулоидной форме микобактерии в препаратах могут не


ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛЕПРЫ
Таксономия
Клиника и эпидемиология (формы)
туберкулоидная
лепроматозная (гранулемы с лепрозными клетками)
Биологические особенности
Морфология (строение, расположение, окраска)
Культивирование (в организме)
белой мыши
броненосца
Иммунитет (уровень по пробе Мицуды)
Лабораторная диагностика
Микроскопия соскобов слизистой носа и кожи
Дифференциация с микобактериями туберкулеза при окраске по Семеновичу — Марциновскому
Лечение и профилактика

Граф 82

выявляться. Для дифференциации микобактерий лепры и туберкулеза используют методику окраски мазков Семеновича – Марциновского (см. «Эубактерии»).

Какой-либо реакции для серотипажа микобактерий или серодиагностики лепры не существует.

Лепроминовая проба Мицуды диагностического значения не имеет. Ее используют только для дифференциации туберкулоидной и лепроматозной форм болезни.

Лечение и профилактика. Лечение лепры проводится препаратами сульфонового ряда (диафенилсульфон, солюсульфон, диацетил-диамино-дифенилсульфон) в комбинации с клофазимином, рифампицином, протионамидом, этионамидом, стимулирующими и общеукрепляющими средствами. Курс лечения больных продолжается многие годы (при туберкулоидной – 3–5 лет). Важнейшим в профилактике лепры является соблюдение индивидуальных и общественных (социальных) предохранительных мероприятий. Больные-бактериовыделители в СНГ изолируются в специальных медицинских учреждениях (лепрозории, диспансеры, санатории), а в западно-европейских странах – в специализированных отделениях или палатах в госпиталях тропической дерматологии или в инфекционных больницах. Детей, родившихся у больных лепрой, признано возможным оставлять с матерями в противолепрозных учреждениях на период до 2–3-летнего возраста, а далее их следует передавать в детские дома. Специфической вакцинации против лепры нет. Предполагается, что перенесшие первичный туберкулезный комплекс и привитые БЦЖ становятся менее восприимчивыми к лепрозной инфекции, но достаточно убедительных подтверждений этому не получено.

Возбудители актиномикоза

Таксономия. Возбудителем актиномикоза чаще всего является *Actinomyces israelii* (прежний вид Вольффа – Израэля), реже – *Actinomyces bovis* (вид Бострема). Относятся они к сем. *Actinomycetaceae*.

Клиника и эпидемиология актиномикоза. По локализации и клиническому проявлению различают актиномикоз кожи, костей, мочеполовой и центральной нервной систем, торакальный (легочный), абдоминальный (ки-

шечный) и генерализованный. Инфекционный процесс при актиномикозе развивается исподволь и сопровождается образованием гранулем (актиномиком), состоящих из лимфоидных, эпителиоидных, плазматических, гигантских и, что очень характерно, ксантомных клеток, гиалиновых шаров и фиброзно-волокнистых структур, отграничивающих очаг поражения. В центре гранулемы нередко обнаруживаются друзы (*druse* – бляшки) размером от 20 до 320 мкм, состоящие из сплетений тонких нитей (гиф) с колбовидными утолщениями по периферии бляшек. При распаде гранулем вокруг них развивается грануляционная ткань, которая затем замещается рубцовой, хрящеподобной консистенции. Из первичного очага патогенные актиномицеты распространяются в окружающие ткани и органы контактным путем по соединительно-тканным и межмышечным прослойкам, но их диссеминация возможна также по лимфатическим сосудам.

Актиномикоз кожи у людей чаще возникает в шейно-лицевой области и проявляется в виде плотного инфильтрата со свищами и выделяющимся из них гноем, в котором визуально обнаруживаются друзы; в легких формируются узлы грануляционной ткани, в кишечнике – гранулемы с последующим развитием грануляций в подслизистой основе, но нередко поражается слизистая, и на ней появляются сероватые бляшки актиномицетов, от которых, как от колоний, отходят отдельные нити; в костях образуются множественные полости, а в головном мозге – абсцессы. Актиномикозом поражаются люди любого возраста. Его возникновению способствуют простудные заболевания, грипп, туберкулез, резко снижающие иммунологическую сопротивляемость организма. В развитии актиномикоза определенную роль могут играть слюнные, желчные, каловые конкременты как травмирующие факторы и сопутствующая микрофлора.

Биологические особенности актиномицет. *Морфология.* По форме патогенные актиномицеты представляют собой дифтероидные бактерии со вздутыми концами, склонные к образованию V- и Т-образных микроструктур (*Act. israelii*), коротких ветвящихся нитей, подобных гифам грибов (*Act. bovis*), которые, фрагментируясь, распадаются на мелкие палочки и коккобактерии. Эндоспор и капсул не образуют, неподвижны, грамположительны.

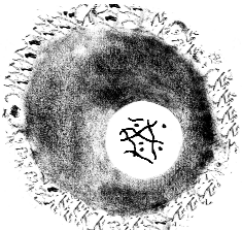


Рис. 103. Колония *Act. bovis* и его морфология

Рис. 104. Колония *Act. israelii* и его морфология

Культивирование. Act. bovis – аэробы, а *Act. israelii* – анаэробы. Выращиваются при температуре 35–37 °С на сахарном агаре, агаровой среде Сабуро с мальтозой, сусло-агаре, агаре с экстрактом мозга и сердца или кровяном агаре с экстрактом сердца. Патогенные актиномицеты растут медленно. Так, спустя 18–24 ч от момента засева на среды *Act. bovis* формирует мелкие волокнистые (рис. 103), а *Act. israelii* – гладкие или зернистые микроколонии, которые через 7–14 сут становятся серовато-белыми выпуклыми, но, чаще, плотными, шероховатыми, с волнистым краем (рис. 104). В отличие от почвенных сапрофитных видов патогенные актиномицеты не имеют воздушного мицелия и не содержат вегетативных экзоспор. В бульоне растут придонно или пристеночно в виде зерен.

Ферменты и токсинообразование. Патогенные актиномицеты – хемоорганотрофы. Сбраживают до оксикислот ряд углеводов, в частности глюкозу. Медленно разжижают желатин и свертывают молоко; каталазоотрицательны или каталазоположительны. Выделяют эндотоксин.

Патогенность для животных. Актиномицеты поражают крупный рогатый скот, свиней, лошадей и других животных. Многим исследователям удавалось инфицировать кролика и морскую свинку, правда, преимущественно *Act. israelii.*

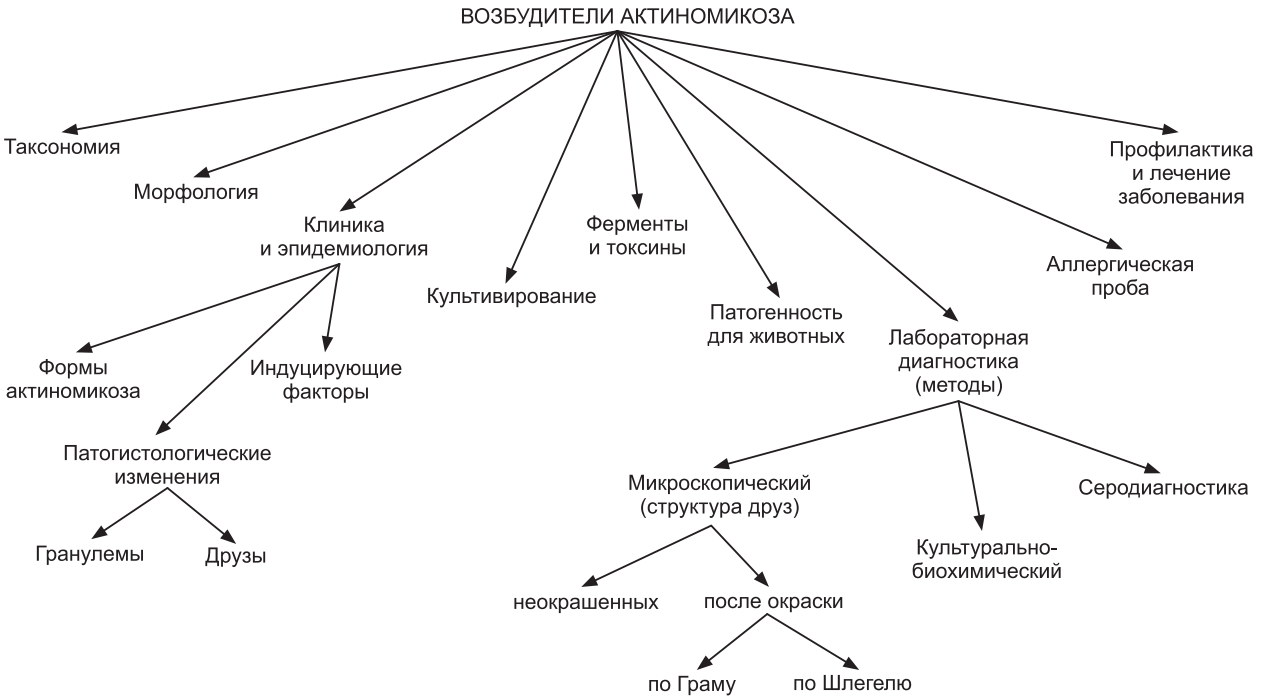
Лабораторная диагностика. При актиномикозе исследуют: 1) гной из свищей, пунктат из невскрытых очагов размягчения, соскобы грануляций, мокроту; 2) срезы пораженных актиномикозом тканей.

Бактериоскопическое исследование мазков. Мазки из материалов обычно окрашивают по Граму и при наличии

в них возбудителей актиномикоза обнаруживают грамположительные дифтероидные палочки со вздутыми концами (*Act. israelii*) и сплетения дихотомически ветвящихся нитей (*Act. bovis*). Иногда в гное и мокроте визуально выявляют друзы в виде мелких желтоватых или серовато-белых с зеленоватым оттенком зернышек-колоний актиномицетов, которые, захватив петлей, для дифференциации их строения на несколько минут помещают в 5–10 %-ный раствор едкой щелочи, после чего переносят на предметное стекло в каплю глицерина. В раздавленной капле под покровным стеклом при малом увеличении микроскопа друза представляет собой пылинку с бесструктурным центром и бахромчатым краем, а под иммерсионным объективом – клубок густо сплетенных ветвящихся гиф с колбовидными утолщениями на концах. Окрашивают ее по Граму, предварительно раздавив между двумя предметными стеклами; центр друзы грамположительный, венчик колб – грамотрицательный (см. рис. 12, *в*).

Гистологические срезы обрабатывают по Шлегелю: погружают в спиртовой раствор эозина на 4–5 ч и выдерживают в термостате; прополаскивают этиловым спиртом и окрашивают гематоксилином в течение 5 мин. Ткань и содержащиеся в ней нити актиномицетов окрашиваются в голубой цвет, а колбы, выявляющие ацидофильные свойства, – в ярко-красный. Следует иметь в виду, что друзы могут подвергаться кальцификации, превращаться в стекловидные аморфные массы, а при активации защитных сил организма – лизироваться или фагоцитироваться многоядерными гигантскими клетками.

Выделение культур актиномицетов. Так как при актиномикозе в гное и мокроте может находиться большое количество сопутствующей микрофлоры, то перед их засевом на питательную среду к материалам прибавляются растворы пенициллина и стрептомицина из расчета 100–200 ЕД на 1 мл материала. Смеси через 30–60 мин центрифугируют, и осадки засевают на две чашки среды с кровью и экстрактом сердца. Одну из них для выделения *Act. israelii* инкубируют в анаэростате в атмосфере азота и диоксида углерода (при отсутствии анаэростата засев производят в столбик среды), а другую – для выращивания *Act. bovis* – содержат в обычных условиях термостата, но предпочтительно в эксикаторе с 5 %-ным диоксидом углерода. Види-


ВОЗБУДИТЕЛИ АКТИНОМИКОЗА
Таксономия
Морфология
Клиника и эпидемиология
Формы актиномикоза
Индуцирующие факторы
Патогистологические изменения
Гранулемы
Друзы
Культивирование
Ферменты и токсины
Патогенность для животных
Лабораторная диагностика (методы)
Микроскопический (структура друз)
неокрашенных
после окраски
по Граму
по Шлегелю
Культурально-биохимический
Серодиагностика
Аллергическая проба
Профилактика и лечение заболевания

Граф 83

мый рост актиномицетов появляется через 2–5 сут. Чистую культуру актиномицетов идентифицируют по морфолого-культуральным и биохимическим свойствам.

Серодиагностика. К серодиагностике прибегают для подтверждения диагноза висцеральной (например, легочной) формы актиномикоза. При этом ставится реакция связывания комплемента. В качестве антигена применяют фильтрат бульонной культуры спонтанно лизирующихся аэробных актиномицетов. Реакция недостаточно специфична и может быть положительной при раке легкого и тяжелых нагноительных процессах во внутренних органах.

Аллергическая проба. Аллергическая реакция воспроизводится с помощью актинолизатов, однако ее диагностическое значение невелико, так как висцеральный актиномикоз протекает без значительной аллергизации организма.

Профилактика и лечение. Вакцинопрофилактика актиномикоза не разработана. Лечение заболевания комплексное. Основу его составляет иммунотерапия актинолизатом и актиномицетной поливалентной вакциной, изготовляемой из спороносных штаммов сапрофитных актиномицетов. В качестве этиотропных препаратов назначают пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины, левомицетин.

Возбудители газовой гангрены

Таксономия. Возбудителями газовой гангрены являются несколько видов веретенообразных анаэробных токсигенных бактерий, относящихся к роду *Clostridium* (*kloster* – веретено) сем. *Bacillaceae*. Основными из них являются четыре вида: *C. perfringens* (*perfringo* – проламывающий), *C. novyi* (Ф. Нови, 1894), *C. septicum* (*sepsis* – гниение) и *C. histolyticum* (*histos* – ткань, *lysis* – растворение). Реже газовую гангрену вызывают *C. sordelli*, *C. difficile*, *C. fallax* и др.

Клиника и эпидемиология. Газовая гангрена – полиэтиологическая раневая инфекция. Проявляется она массивным омертвением (*gangraing*) мышечных тканей, интенсивным отеком и газообразованием в них, выраженной токсемией и высокой температурой.

Чаще всего газовой гангреной осложняются рваноушибленные осколочные ранения нижних конечностей,

загрязненных почвой, содержащей споры токсигенных клостридий, которые попадают в нее с испражнениями животных и человека. Способствуют ее развитию быстрая некротизация мощных пластов мышечной ткани вследствие нарушения в ней кровотока и большой кровопотери, резко снижающих реактивность организма, на фоне которой активируются гноеродные аэробы, ускоряющие процесс некроза тканей и понижающие в них окислительно-восстановительный потенциал. При этом среди сопутствующих микробов-индукторов газовой гангрены в ране чаще всего обнаруживаются стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, вульгарный протей, *C. sporogenes*, *C. putriphicum*.

Биологические особенности токсигенных клостридий. *Морфология*. Токсигенные клостридии – крупные бескапсульные толстые палочки (5–10 × 1–2 мкм) с большим количеством перитрихиальных жгутиков и субтерминальной или центрально расположенной овальной спорой, превышающей поперечник бактерий. Исключение составляют мелкие по размерам *C. histolyticum* и *C. perfringens*, которые не имеют жгутиков и образуют в организме человека и животных капсулу. Молодые культуры клостридий грамположительны, старые, аутолизируясь, утрачивают типичную по Граму окраску.

Условия культивирования и характер роста на средах. Патогенные клостридии развиваются в отсутствие кислорода воздуха; культивируются в анаэростате, в глубине столбика сахарного агара, на регенерированных (длительно кипяченых) жидких средах под вазелиновым маслом. Обычно их выделяют на сахарном бульоне с кусочками печени животных (накопительная среда Китта – Тароцци) или на обезжиренном молоке, а также сахарном агаре Цейсслера с кроличьей кровью. Для дифференциации патогенных клостридий используют питательный агар с глюкозой, сульфитом натрия и хлорным железом (среда Вильсона – Блера), реже лактозный полужидкий агар с молочно-желточной суспензией и нейтральным красным (среда Уиллиса – Хоббса).

В толще столбика сахарного агара колонии *C. perfringens* напоминают чечевички, колонии остальных клостридий – пушинки, снежинки, комочки ваты, клубочки шерсти. В глубине среды Вильсона – Блера колонии ток-

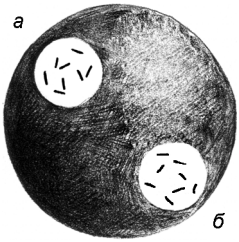


Рис. 105. Колонии *C. perfringens* (*а*) и *C. histolyticum* (*б*) и их морфология

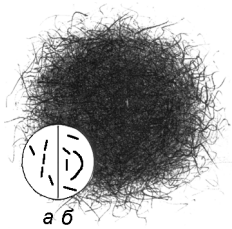


Рис. 106. Колонии *C. novji* (*а*) и *C. septicum* (*б*) и их морфология

сигенных клостридий вследствие восстановления сульфита натрия и последующего образования сернистого железа окрашиваются в черный или зеленовато-черный цвет. В зависимости от вида потемнение среды наступает в разное время от момента посева, в частности при росте *C. perfringens* – в ближайшие 2–3 ч, сопровождаясь разрывом агарового столбика; при развитии *C. septicum* – через 3–6 ч, а *C. novyi* – через 16–24 ч.

На агаре Цейсслера через 24–48 ч *C. perfringes* и *C. histolyticum* образуют дисковидные колонии (рис. 105). У других клостридий, обладающих активным движением и вследствие этого ползучим ростом, колонии неправильной формы с чуть приподнятым центром, неровными краями и отходящими от них побегами (рис. 106). Вокруг колоний всех видов токсигенных клостридий отмечается гемолиз.

На среде Китта – Тароцци токсигенные клостридии вызывают помутнение; вырастая на молоке, свертывают его, а *C. histolyticum* – пептонизирует.

Биохимические свойства. По спектру ферментов и их активности патогенные клостридии подразделяются на две группы: сахаролитическую, бурно сбраживающую углеводы с образованием большого количества газа, и протеолитическую, быстро растворяющую белки. В частности, *C. perfringens* расщепляет все углеводы короткого ряда Гисса (кроме маннита), *C. septicum* – глюкозу, мальтозу, лактозу, *C. novyi* – глюкозу и мальтозу. Протеолитическая активность у этих видов клостридий выражена слабо. Наоборот, *C. histolyticum* не образует гликозидаз, но очень

быстро лизирует кусочки печени, яичного белка, свернутую сыворотку, желатин, казеин молока, а в эксперименте, разрушая связки в суставах, может даже вызывать ампутацию конечности. Дифференциацию токсигенных видов клостридий по ферментативной активности в лабораторной диагностике газовой гангрены обычно проводят на среде Уиллиса – Хоббса: колонии *C. perfringens* и *C. septicum*, ферментирующие лактозу, – красного цвета, а колонии *C. novyi* и *C. histolyticum* – бесцветные с зонами просветления.

Антигены и токсинообразование. По структуре соматических антигенов и продуцируемых экзотоксинов клостридии подразделяются на ряд сероваров. Так, *C. perfringens* по антигенам главных токсинов (α-, β-, ε-, ι-) подразделяется на шесть сероваров (A, B, C, D, E, F), из которых A-серовар является основным возбудителем газовой гангрены, а D-серовар нередко вызывает пищевые токсикоинфекции. В составе *C. novyi* выделено 4 типа (A, B, C, D), отличающихся различным соотношением в них соматических O-антигенов. *C. septicum* и *C. histolyticum* до сих пор окончательно не типированы. Все эти и другие, более редкие виды клостридий газовой гангрены продуцируют не обычные экзотоксины, а токсины-ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление биологических мембран, в результате чего нарушается клеточная проницаемость с последующим отеком, аутолизом, гемолизом, разрушением коллагеновых волокон, некрозом мышечной ткани, что сопровождается глубокой интоксикацией и заканчивается летальностью. В общем, *C. perfringens* продуцирует 10 токсинов-ферментов, не считая μ (гиалуронидазы) и ν (ДНК-азы), токсичность которых не доказана, *C. novyi* – 8, *C. septicum* – 4, *C. histolyticum* – 5.

Лабораторная диагностика. Симптоматика газовой гангрены настолько специфична, что правильный диагноз ставится на основании клинической картины заболевания. В затруднительных случаях исследуют гной, а после туалета раны – сукровицу, отечную жидкость из пузырей, кусочки некротизированных мышц, прилегающих к здоровой ткани. Обнаружение в мазках грамположительных крупных палочек (изредка – нитей) с обрубленными или закругленными концами, расположенных попарно (под углом или в длину) и короткими цепочками, может свидетельствовать о наличии в ране токсигенных клостридий (табл. 21).

Таблица. 21. **Морфолого-культуральные и биохимические свойства возбудителей газовой гангрены**

Вид возбудителя	Морфология клостридий			Рост на средах				Ферменты	
	Форма	Подвижность	Наличие капсулы	жидких		плотных		Гликозидазы	Протеазы
				Китта – Тароцци	Молоко под маслом	Пластинчатый кровяной агар	Столбик МПА		
C. perfringens	Короткие толстые диплобактерии	–	+	Вспенившаяся муть	Бурное свертывание	Круглые с зоной гемолиза	Дисковидные	+	+
C. novyi	Короткие и длинные палочки, иногда цепочки	+	–	Слабая муть, газ	Свертывание	Шероховатые с зоной гемолиза	Хлопьевидные	+	+
C. septicum	Короткие и длинные палочки, нити	+	–	Выраженная муть, газ	Свертывание	Кружевное сплетение с гемолизом	Хлопьевидные	+	+
C. histolyticum	Мелкие палочки	+	–	Муть без газа	Пептонизация	Круглые гладкие с зоной гемолиза	Округлые	–	++++

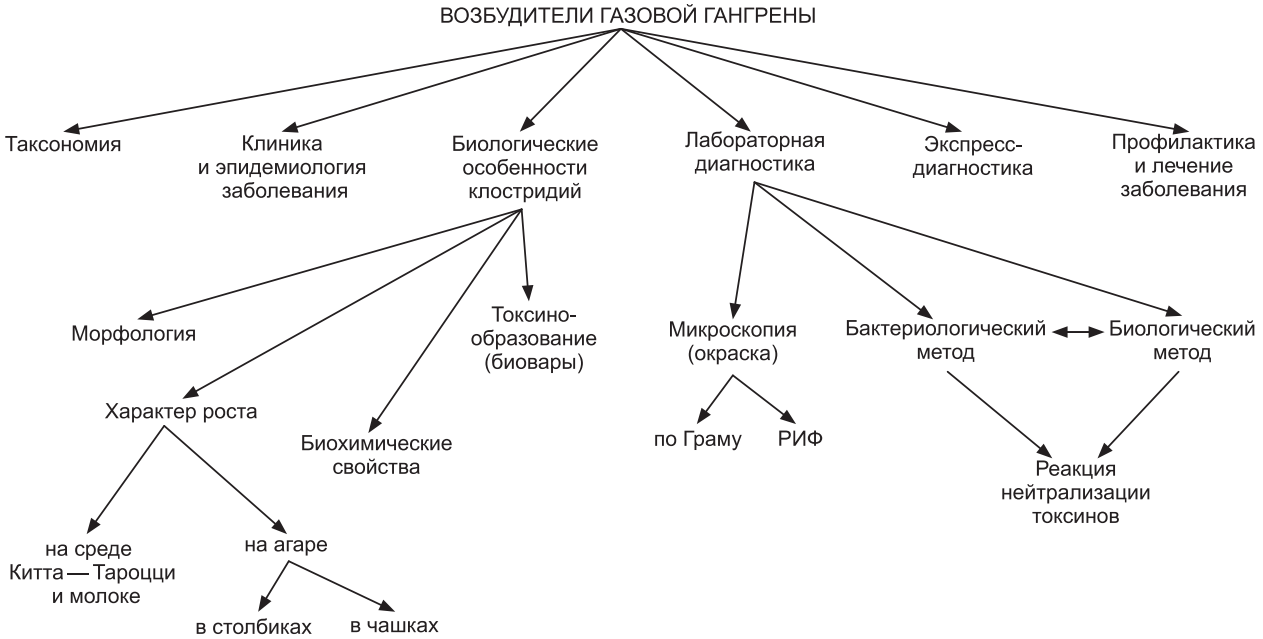
Бактериологическое исследование. Материалы засевают: 1) на пластинчатые агары Цейсслера, которые помещают в анаэростаты; 2) на среды Китта – Тароцци (часть из них для уничтожения неспороносных гноеродных бактерий прогревают 10–20 мин при 80 °С); 3) в столбики сахарного агара, залитого в узкие и тонкие пробирки или набранного в пастеровские пипетки, которые легко подпиливаются и надламываются в проекции выросших внутри их колоний.

На следующие сутки из выросших культур делают мазки и производят их пересевы, в частности из сред Китта – Тароцци шпателем на агары Цейсслера в чашках Петри *(метод Цейсслера)* или последовательно запаянным концом пастеровской пипетки в глубь трех-пяти расплавленных и охлажденных до 50 °С столбиков сахарного агара в пробирках *(метод Вейнберга)*, а из плотных сред, наоборот, – в среды Китта – Тароцци для накопления клостридий и выработки ими экзотоксина, который не продуцируется на агаризованных средах.

Чистую культуру клостридии идентифицируют по морфолого-культуральным и биохимическим свойствам (табл. 21). Бактериологическое исследование завершают реакцией нейтрализации экзотоксина, содержащегося в среде Китта – Тароцци, видовыми и типовыми антитоксическими сыворотками.

Реакция нейтрализации токсинов. Для определения типа токсина 0,9 мл центрифугата культуры смешивают с 0,6 мл моновалентных сывороток различных видов клостридий и после 40-минутного выдерживания при комнатной температуре вводят внутривенно по 0,5 мл белым мышам или внутрикожно по 0,2 мл морским свинкам. О типе токсина судят по нейтрализующему действию сыворотки, обеспечивающей выживание животных или предупреждающей развитие некроза кожи у них.

К заражению животных прибегают также в целях выделения культур и изучения вирулентности клостридий. В таких случаях морских свинок инфицируют подкожно суспензией материала. Погибших животных вскрывают, описывают патологические изменения (местный отек с газообразованием, расплавление подкожно-жировой клетчатки) и капельку крови из сердца засевают на агар Цейсслера. Далее проводят бактериологическое исследование.


ВОЗБУДИТЕЛИ ГАЗОВОЙ ГАНГРЕНЫ
Таксономия
Клиника и эпидемиология заболевания
Биологические особенности клостридий
Лабораторная диагностика
Экспресс-диагностика
Профилактика и лечение заболевания
Морфология
Характер роста
на среде Китта — Тароцци и молоке
на агаре
в столбиках
в чашках
Биохимические свойства
Токсино-образование (биовары)
Микроскопия (окраска)
по Граму
РИФ
Бактериологический метод
Биологический метод
Реакция нейтрализации токсинов

Граф 84

Экспресс-диагностика газовой гангрены. Ускоренная идентификация токсигенных клостридий основана: 1) на реакции нейтрализации экзотоксина в раневом содержимом; 2) бурном образовании газа и ноздреватых сгустков казеина в молоке под маслом после засева материала, содержащего *C. perfringens*; 3) гибели морских свинок на следующие сутки при заражении их 6-часовой суспензией инфицированного молока; 4) почернении колоний клостридий и разрыве столбика среды Вильсона – Блера в ближайшие часы после ее засева; 5) быстром почернении на воздухе колоний *C. novyi*, выросших в анаэростате на сахарно-кровяном агаре с бензидином («бензидиновый тест»).

Специфическая профилактика и лечение. Предупреждение газовой гангрены достигается своевременной и полноценной хирургической обработкой раны. Специфическая профилактика может осуществляться антитоксическими сыворотками, вводя раненым 30 000 МЕ противогангренозной сыворотки (по 10 000 МЕ антиперфрингенс, антинови и антисептикум). Лечение газовой гангрены проводится поливалентной сывороткой, лечебная доза которой составляет 150 000 МЕ (по 50 000 МЕ тех же антисывороток). Хороший лечебный эффект оказывают антибиотики.

Возбудитель столбняка

Таксономия. Возбудитель столбняка – *Clostridium tetani* (*tetanos* – судорога) относится к сем. *Bacillaceae*. Открыл клостридии столбняка А. Николайер (1884), а в чистой культуре получил Ш. Китазато (1889).

Клиника и эпидемиология. Столбняк – это раневая анаэробная инфекция, обычно сопутствующая войнам и изредка встречающаяся в мирное время (после тяжелых травм и криминальных абортов, у новорожденных). У человека наблюдается нисходящий столбняк. В патогенезе столбняка основную роль играет экзотоксин. Под его действием перевозбуждаются двигательные нейроны, вследствие чего возникают тонические судороги мимической и жевательной мускулатуры (сардоническая улыбка и тризм). Затем в патологический процесс вовлекаются мышцы тела, особенно разгибатели, и при классической форме заболевания больной принимает типичное положение, опираясь на пятки и затылок (опистотонус). Смерть

наступает от асфиксии в результате паралича дыхательной мускулатуры.

Постоянным резервуаром столбнячного микроба является почва, куда возбудитель попадает вместе с испражнениями животных и человека. Входными воротами служит рана, загрязненная землей, обрывками одежды, осколками снарядов и пр.

Биологические свойства возбудителя столбняка. *Морфология.* Клостридии столбняка представляют собой крупные, относительно тонкие бактерии (4–8 × 0,3–0,4 мкм) с круглой крупной спорой на конце, что придает им вид барабанных палочек (см. рис. 8). Капсул не образуют, очень подвижные перитрихи. Располагаются в мазке беспорядочно (изредка цепочками), грамположительны.

Культурально-биохимические свойства. Возбудитель столбняка – облигатный анаэроб, растет при температуре 37 °С. Вызывает слабое помутнение среды Китта – Тароцци. На сахарно-кровяном агаре Цейсслера клостридии столбняка вырастают в виде нежного ажурного налета из переплетающихся нитей, по ходу которых происходит гемолиз. Отдельные колонии на пластинчатых средах напоминают паучков с зонами гемолиза вокруг, а в столбике сахарного агара – чечевичные зерна или пушинки. Все штаммы ферментируют глюкозу, некоторые из них разлагают столбик желатина в виде правильной елочки.

Антигены и токсины. Клостридии столбняка содержат соматический О- и Н-антиген, по которому выделяют 10 сероваров, продуцирующих идентичный по антигенным свойствам тетаноспазмин (нейротоксин) и тетанолизин (тетаногемолизин). Вырабатываясь в организме, тетаноспазмин вначале фиксируется на поверхности отростков нервных клеток, а проникнув в них за счет лигандоопосредованного эндоцитоза, путем ретроградного аксонного транспорта достигает ЦНС, где в тормозных синапсах подавляет высвобождение нейромедиаторов. В результате повышается возбудимость двигательных центров спинного мозга и возникают характерные для столбняка тонические судорожные сокращения поперечно-полосатой мускулатуры. Тетанолизин лизирует эритроциты, проявляет кардиотоксическое и летальное действие.

Резистентность. Вегетативные формы клостридий столбняка малоустойчивы, а споры в окружающей среде

могут сохраняться годами (остаются жизнеспособными после длительного кипячения, устойчивы к дезинфицирующим веществам).

Патогенность. В естественных условиях столбняком болеют лошади, мелкий рогатый скот, реже – кошки, свиньи, собаки. Чувствительны к возбудителю столбняка и его токсину белые мыши и морские свинки.

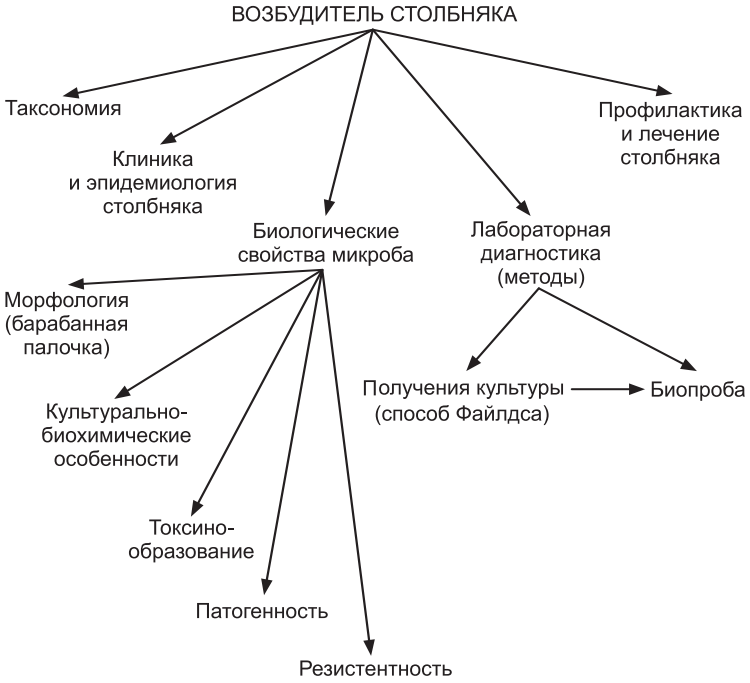
Лабораторная диагностика. Проявление столбняка у людей настолько типично, что диагноз заболевания ставится без особого труда на основании клинической симптоматики. К микробиологическому исследованию прибегают при стертых формах болезни, засевая отделяемое раны, эмульсию вырезанных из нее кусочков тканей на среды накопления Китта – Тароцци и Цейсслера. Выращивают клостридии столбняка в термостате 3–4 сут при температуре 37 °С, пересевая их из одной среды на другую вплоть до получения чистых культур, которые идентифицируются в реакции нейтрализации. Для этого культуру на среде Китта – Тароцци центрифугируют и надосадочную жидкость в количестве 0,3–0,4 мл вводят внутримышечно у корня хвоста двум контрольным белым мышам. Опытных мышей инфицируют таким же количеством исследуемой жидкости, выдержанной в течение 1 ч в антитоксической противостолбнячной сыворотке. У контрольных животных на 2–4-е сут развивается типичная картина восходящего столбняка: хвост мышей делается ригидным, задняя конечность вытягивается, туловище искривляется и животное погибает. Опытные мыши, получившие смесь культуры с антистолбнячной сывороткой, остаются здоровыми.

Нередко возбудитель столбняка изначально выделяют в биологическом эксперименте, заражая белых мышей исходным раневым материалом с целью вызвать у них сепсис, с последующим взятием капли крови и засевом ее на среды. Правда, для этого материал нужно вводить вместе с хлоридом кальция, инфузорной землей, пемзой и другими веществами, вызывающими некроз тканей.

Экспресс-метод выделения клостридий столбняка. Для ускоренного выделения палочек столбняка используется засев материала или смешанной культуры, выросшей на среде Китта – Тароцци, в конденсационную воду скошенной сыворотки (метод Файлдса). Вырастая в анаэростате, палочки-перитрихи столбняка, как и Н-формы протеев,

быстро перемещаются по поверхности косяка и, обгоняя банальную микрофлору, на следующие сутки выделяются из ассоциаций в чистой культуре на верхней его трети.

Специфическая профилактика и лечение. Активная профилактика столбняка начинается с 3-месячного возраста и проводится адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакциной, которая вводится трижды с интервалом в 1 мес. между прививками. Первая ревакцинация осуществляется однократным введением вакцины АКДС в полтора года. Повторно ревакцинируют детей в 6 лет адсорбированным дифтерийно-столбнячным анатоксином (АДС), а в 16 лет и каждое десятилетие в последующем – АДС-М (с уменьшенным количеством анатоксина) или столбнячным анатоксином (АС). Экстренная профилактика столбняка, которая проводится при травмах, обморожениях, ожогах, внебольничных абортах, укусах



Граф 85

животных осуществляется АС-анатоксином и противостолбнячным человеческим иммуноглобулином (ПСЧИ) или лошадиной противостолбнячной сывороткой (ПСС), вводя их, в зависимости от предшествующих прививок против столбняка, раздельно или комбинированно в количествах 0,5–1,0 мл АС, 250 МЕ ПСЧИ или 3000 МЕ ПСС. Для лечения столбняка применяют большие дозы лошадиной антитоксической сыворотки – от 100 000 до 200 000 МЕ. Вводится она внутривенно или в спинномозговой канал, нередко повторно, вплоть до исчезновения судорог.

Возбудитель ботулизма

Таксономия. Возбудитель ботулизма – *Clostridium botulinum* (*botulus* – колбаса) относится к сем. *Bacillaceae*. Открыл клостридии ботулизма Э. ван Эрменген (1896).

Клиника и эпидемиология. Ботулизм, или колбасное отравление, – тяжелый бактериальный токсикоз, возникающий через 12–24 ч (иногда позже) после употребления в пищу продуктов, чаще – плохо простерилизованных консервов домашнего приготовления, зараженных спорами клостридий и содержащих их экзотоксины. Подозрительными на заражение прежде всего являются вздутые банки консервов, издающие запах прогорклого масла. В результате поражения токсином ядер черепно-мозговых нервов и нарушения их функции у больных ботулизмом возникают парезы и параличи мышц глазного яблока, языка, глотки, расстройства глотания, зрения, речи, дыхания. Больной умирает от паралича сердца и дыхания. Летальность может достигать 60–80 %.

Возбудитель ботулизма, как и другие клостридии, обитает в кишечнике животных, птиц, человека и выделяется во внешнюю среду с испражнениями. Его можно обнаружить в почве (даже девственной), на овощах, фруктах, в воде, рыбе, ракообразных, моллюсках.

Биологические особенности возбудителя ботулизма. *Морфология.* Клостридии ботулизма – крупные палочки размером 4–8 × 0,6–0,8 мкм. Они имеют субтерминально расположенную овальную спору, превышающую поперечник палочки, что придает им вид теннисной ракетки (см. рис. 8). Капсул не образуют, обладают перитрихальными жгутиками, в мазке располагаются беспорядочно, грамположительны.

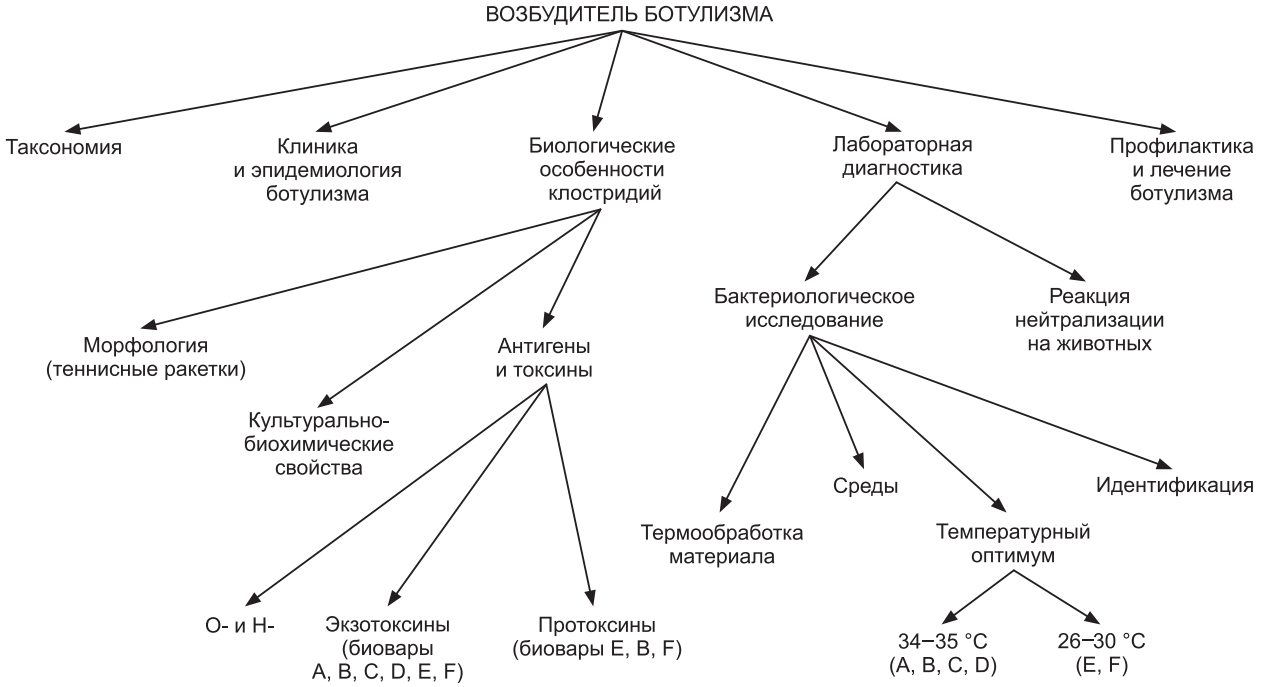
Культурально-биохимические свойства. Клостридии ботулизма выращивают в анаэробных условиях. Их культивируют на среде Китта – Тароцци под маслом, где через 24 ч они вызывают равномерное помутнение и газообразование. На сахарно-кровяном агаре Цейсслера клостридии формируют большие шероховатые блестящие, неправильной формы колонии, окруженные зоной гемолиза, а в столбике сахарного агара – колонии-снежинки, пушинки, комочки ваты. Клостридии ботулизма имеют ограниченный набор гликозидаз, но обладают выраженными протеолитическими свойствами.

Антигены и токсины. Возбудитель ботулизма вырабатывает экзотоксины, оказывающие нейротоксическое и гемолитическое действие. Они состоят из двух фрагментов – L- и H-цепи, которые различаются по молекулярной массе и антигенной структуре. Механизм патогенного действия различных типов ботулотоксинов практически одинаков. Все они, сорбируясь на слизистой оболочке кишечника, проникают в кровь и в периферические нервные окончания, где, поглощаясь, формируют в синаптических пузырьках поры, что блокирует их слияние с пресинаптической мембраной. Мишенью действия ботулотоксинов являются интегральные синаптические белки, которые они расщепляют. Избирательно поражаются α-моторные нейроны передних рогов спинного мозга, что приводит к парезам и параличам мышц. По антигенной структуре токсинов различают 8 сероваров клостридий ботулизма – A, B, C_α, C_β, D, E, F, G. Наиболее часто ботулизм у человека вызывается токсинами сероваров A, B и E. Следует подчеркнуть, что серовар E, некоторые штаммы биоваров B и F, кроме токсина, образуют протоксин, который активируется протеолитическими ферментами желудочно-кишечного тракта человека и животных. Ботулотоксины очень ядовиты, катализируют многие химические процессы, превращаются в анатоксины. Инактивируются кипячением в течение 20 мин.

Лабораторная диагностика. Материалами являются рвотные массы, промывные воды желудка, моча, испражнения, кровь больных, остатки пищевых продуктов, напитки, вода как факторы передачи ботулизма. Диагностика ботулизма основана на выявлении в них ботулотоксина с помощью реакции нейтрализации на животных, выделении чистой культуры клостридий ботулизма и ее идентификации.

Реакция нейтрализации токсина. При подозрении на ботулизм экскреты больного или экстракты продуктов смешивают с равными объемами антитоксических сывороток сероваров A, B, C, D, E. Смеси выдерживают в термостате при 30–35 °С в течение 30 мин, после чего каждую из них вводят по 1,5 мл внутрибрюшинно двум белым мышам или по 6 мл подкожно морским свинкам. Контрольных животных инфицируют нативными и прогретыми при 100 °С в течение 30 мин материалами, разведенными пополам изотоническим раствором натрия хлорида. Эксперимент длится 5 дней. Животные, получившие прогретый материал и его смесь, нейтрализованную антитоксинами, не заболевают. Токсикоз развивается у животных, зараженных нативным негретым материалом и его смесью с негомологичными сыворотками по отношению к содержащемуся в нем токсину. У мышей ботулизм проявляется общей слабостью, парезом конечностей, западением мышц живота, появлением «осиной талии». У морских свинок наблюдается резкое расслабление мускулатуры с «симптомом спины» – положенные на спину, они не могут перевернуться.

Бактериологическое исследование. Для выделения чистой культуры материал тщательно растирают и эмульгируют. Для уничтожения банальной микрофлоры одну часть перед посевом прогревают при 80 °С в течение 10–20 мин, другую – засевают в нативном виде. Чтобы обеспечить хороший рост и образование экзотоксина, обычно 3–5 мл подготовленного материала засевают во флаконы, содержащие 70–150 мл среды Китта – Тароцци (или казеиново-грибной), залитой толстым слоем вазелинового масла. Выращивают культуру при двух температурных режимах: 34–35 °С, оптимальных для биоваров A, B, C, D, и 26–30 °С, при которых лучше размножаются биовары E и F. Первое исследование характера роста и токсинообразования проводят через 48 ч, второе – на 4-е сут, последующие – на 6–10-е. При обнаружении в посевах типичных клостридий и ботулотоксина (в том числе протоксина, активируемого трипсином и панкреатином) дают заключение о зараженности материала возбудителем ботулизма. Видовая принадлежность выделенных культур устанавливается по комплексу культурально-биохимических свойств, агглютинабельности в специфических сыворотках и, главное, на основании результатов реакции нейтрализации токсина специфическими антиботулиническими сыворотками.


ВОЗБУДИТЕЛЬ БОТУЛИЗМА
Таксономия
Клиника и эпидемиология ботулизма
Биологические особенности клостридий
Лабораторная диагностика
Профилактика и лечение ботулизма
Морфология (теннисные ракетки)
Культурально-биохимические свойства
Антигены и токсины
О- и Н-
Экзотоксины (биовары A, B, C, D, E, F)
Протоксины (биовары E, B, F)
Бактериологическое исследование
Реакция нейтрализации на животных
Термообработка материала
Среды
Температурный оптимум
Идентификация
34–35 °C (A, B, C, D)
26–30 °C (E, F)

Граф 86

Профилактика и лечение. Общая профилактика ботулизма проводится путем строгого соблюдения правил консервирования продуктов. Лицам, употребившим заведомо зараженные продукты, внутримышечно вводят по 5000 МЕ антитоксической сыворотки против токсинов типов А, В, С и Е. Для лечения ботулизма применяют те же сыворотки. В частности, при тяжелой форме заболевания детям старше 13 лет и взрослым назначают 10 лечебных доз поливалентной сыворотки (одна лечебная доза содержит по 10 000 МЕ типа А, С и Е и 5000 МЕ типа В). В первые сутки вводят четыре дозы, на вторые, третьи и четвертые – по две. Установив тип токсина, используют моновалентную сыворотку. Серотерапия сочетается с активной трехкратной иммунизацией ботулиническим анатоксином с интервалами между инъекциями 5–7 дней. Учитывая возможность размножения возбудителя ботулизма в кишечнике больного человека, применяют левомицетин и антибиотики тетрациклинового ряда.

Возбудители пищевых токсикоинфекций

Токсикоинфекции – группа острых кишечных инфекций, возникающих в результате употребления в пищу продуктов, зараженных различными видами микроорганизмов и их токсинами. Обычно токсикоинфекции возникают у человека в том случае, когда в продуктах накапливается большое количество бактериальной массы (10^5–10^6 и более м.т. на 1 г), экзо- или эндотоксина и бактериальных метаболитов (тирамина, гистамина, кадаверина и других токсаминов). Чаще всего возбудителями пищевых токсикоинфекций являются протеи (*Proteus vulgaris* и *P. mirabilis*), стрептококки (*Streptococcus faecalis*), стафилококки (*Staphylococcus aureus*), споровые аэробы (*Bacillus cereus*) и анаэробы (*Clostridium perfringens*), гемофильные вибрионы (*Vibrio parahaemolyticus*), бактерии родов *Citrobacter, Campylobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* и др.

Возбудители пищевых токсикоинфекций могут размножаться в различных продуктах питания, но, как показывает практика, для отравлений, вызванных *C. perfringens* типа А, чаще всего характерна связь с мясными продуктами (особенно мяса животных вынужденного убоя), для *B. cereus* – с продуктами растительного или смешанно-

го происхождения (салаты, винегреты), для *P. vulgaris*, *E. coli*, *S. faecalis* – с мясными, рыбными и молочными продуктами, для *V. parahaemolitycus* – с рыбными и другими морепродуктами, для *S. aureus* – с молоком, кремами, тортами, пирожными, мороженым и другими продуктами, приготовленными на молоке.

Клиника и эпидемиология. Видовые свойства возбудителя мало отражаются на особенностях клинической картины токсикоинфекций. При попадании большого количества возбудителей и токсических продуктов в желудочно-кишечный тракт человека организм отвечает стереотипной реакцией. Заболевание начинается после короткого инкубационного периода (от 2–4 до 24–48 ч) со вздутия, урчания и интенсивных болей в животе колющего характера, головной боли, общей слабости, тошноты и многократной рвоты. В ближайшие часы появляется диарея. Вначале каловые массы жидкие, затем водянистые (стул до 10–15 раз в сутки), чаще без патологических примесей, реже – со слизью и кровью. Одновременно с этими признаками гастроэнтерита отмечается озноб, сопровождающийся повышением температуры. Тяжесть состояния больного обусловлена интоксикацией и степенью нарушения водно-солевого обмена (обезвоживания) организма.

Пищевые токсикоинфекции распространены повсеместно. Источником возбудителей пищевых токсикоинфекций являются больные люди и животные, а также бактерионосители, выделяющие их с испражнениями и, тем самым, инфицирующие почву, овощи и особенно корнеплоды, воду открытых водоемов, предметы окружающей среды. Чаще токсикоинфекции наблюдаются в теплое время года и обычно не оставляют после себя так называемого эпидемического хвоста, т. е. новых случаев заболеваний, свойственных другим инфекциям. Вспышки охватывают десятки и сотни людей, но чаще наблюдаются «семейные» или «пикниковые» вспышки.

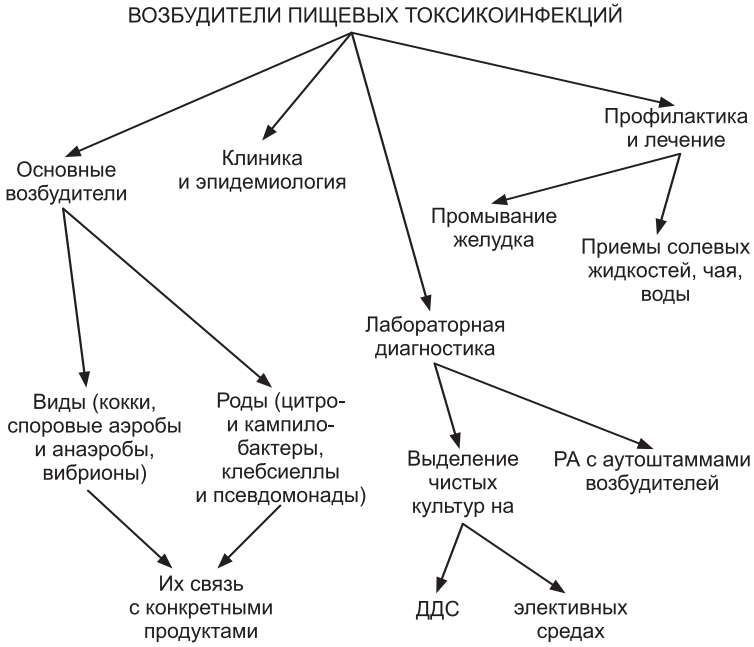
Прогноз заболеваний обычно благоприятный. Смертельные исходы наблюдаются редко, главным образом, при развитии инфекционно-токсического шока.

Лабораторная диагностика. Основным методом лабораторной диагностики пищевых токсикоинфекций является посев рвотных масс, фекалий, остатков пищи на плотные дифференциально-диагностические среды с последующей

идентификацией выделенных возбудителей, положительных результатов РА с аутоштаммами возбудителей и нарастанием титра антител к ним в динамике болезни.

Профилактика. Для предупреждения токсикоинфекций необходимо строго соблюдать требования, предъявляемые к заготовке, транспортировке, хранению и приготовлению пищевых продуктов, а также правила личной гигиены персоналом пищевых предприятий. В частности, единственно эффективным мероприятием по предупреждению стафилококковой пищевой интоксикации является категорическое недопущение к работе с пищевыми продуктами лиц, страдающих гнойничковыми заболеваниями кожи и ангинами стафилококковой этиологии.

Лечение. В первые часы заболевания наиболее эффективно промывание желудка. В дальнейшем больным назначаются пероральные приемы солевых жидкостей, изотонического раствора хлорида натрия, горячего чая, минеральной воды. Назначение этиотропной терапии при пищевых токсикоинфекциях нецелесообразно.



Граф 87

Бактероидозы

Таксономия бактероидов и общая характеристика бактероидозов. Род *Bacteroides*, выделенный в семейство *Bacteroidaceae*, включает две группы анаэробных грамотрицательных бактерий: группу *B. fragilis*, состоящую из 9 видов, и группу *B. ureolyticus*, включающую одноименный вид и *B. gracilis*. Все они – условнопатогенные микробы фоновой микрофлоры толстого кишечника человека; значительно реже встречаются в мочевыводящих путях, влагалище, шейке матки, ротовой полости, слизистых оболочках трахеи и бронхов. Чаще всего из патологических материалов выделяют *B. fragilis*. В ассоциациях с другими бактериями этот вид бактероидов вызывает нагноение ран, тазовые и внутрибрюшинные абсцессы, аппендицит, остеомиелиты, артриты, сепсис и другие бактероидозы. Бактерии группы *B. ureolyticus* поражают женские половые органы, дыхательные пути, мышечную ткань, опорно-двигательный аппарат. Бактероидозами болеют люди разных возрастных групп и профессий, но преимущественно ослабленные лица с низкой степенью иммунологической резистентности.

Биологические свойства. *Морфология*. Бактероиды – полиморфные капсульные бактерии. Чаще встречаются в виде мелких палочек (1–2 × 0,5–0,8 мкм) с закругленными концами, но бывают бациллярной (5 мкм) и нитевидной (50 мкм) формы. В мазках располагаются беспорядочно, попарно и короткими неправильными цепочками. Спор не образуют, большинство из них атрихи (в том числе *B. fragilis* и *B. ureolyticus*), но имеются также подвижные виды с перитрихиальными жгутиками. Окрашиваются неравномерно, иногда биполярно, грамотрицательны (рис. 107, *а*).

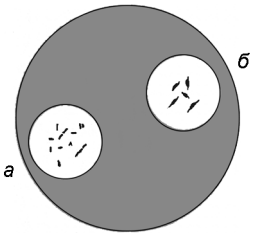


Рис. 107. Колонии бактероидов (*а*) и фузобактерий (*б*) и их морфология

Культивирование. Бактероиды – облигатные анаэробы и очень требовательные хемоорга-

нотрофы. Они выращиваются в анаэростатах на щелочных питательных средах с углеводами, кровью, яичным белком, дрожжевым гидролизатом, тканевыми экстрактами. Оптимальная температура роста для бактероидов 37 °С. На плотных агаризованных средах через 2–3–7 сут образуются мелкие (0,5–2 мм) серовато-белые колонии (с зеленоватым ободком на кровяном агаре у *B. ureolyticus*). На бульоне вызывают помутнение и дают небольшой осадок.

Ферменты и факторы патогенности. Бактероиды отличаются разнообразным составом гликозидаз. В частности, *B. fragilis* непостоянно ферментирует глюкозу, мальтозу, лактозу. Некоторые виды образуют индол и сероводород. Желатин не разжижают, каталазы, оксидазы и лецитиназы не продуцируют. Способность вызывать заболевания у бактероидов связана с токсичностью их липополисахаридов и мембранных белков. Вирулентность обусловлена продукцией фибринолизина, гиалуронидазы, нейраминидазы и капсульной субстанции.

Лабораторная диагностика. Диагностика бактероидозов представляет большие трудности из-за наличия в патологических материалах ассоциированной с ними патогенной и банальной микрофлоры. В зависимости от клинической формы болезни исследуют гной, мокроту, мочу, испражнения, плевральный пунктат, кровь больных. Материал микроскопируют и засевают на свежеприготовленный кровяной агар. Посевы выращивают в анаэростатах в атмосфере 10 %-ного диоксида углерода при температуре 37 °С. Чистую культуру бактероидов идентифицируют по морфолого-культуральным и биохимическим признакам, а в заключение исследуют два основных критерия, позволяющих установить групповую принадлежность выделенной культуры, – способность расти на средах с 20 %-ным содержанием желчных солей и резистентность к ванкомицину (5 мкг/мл среды). При этом к группе *B. fragilis* относят желче- и ванкомицинрезистентные культуры, а к группе *B. ureolyticus*, наоборот, – высокочувствительные. Окончательное решение вопроса причастности выделенных бактероидов к заболеванию решается в серодиагностике при исследовании титра нарастания антител в сыворотках больных с помощью РА, РНГА и РПГ.

Лечение. Бактероиды резистентны к пенициллину и цефалоспоринам. Для лечения бактероидозов чаще других препаратов применяют левомицетин, метронидазол, имипенем.

Фузобактериозы

Таксономия фузобактерий и общая характеристика фузобактериозов. Виды бактерий рода *Fusobacterium* (*fusus* – веретено) сем. *Bacteroidaceae* – условнопатогенные микробы, обитающие, как и бактероиды, в полости рта, кишечника и органах мочеполовой системы млекопитающих. У человека вызывают гингивиты, периодонтиты, абсцессы в мягких тканях головы, шеи, пневмонии и остеомиелиты. Возбудителями этих эндогенных инфекционных болезней являются в основном *F. nucleatum* и *F. necrophorum*.

Биологические особенности фузобактерий. *Морфология.* Фузобактерии – веретенообразные палочки с заостренными концами размером 2–3 × 0,5–1 мкм. Спор и капсул не имеют, неподвижны. Грамотрицательны (рис. 107, *б*).

Культурально-биохимические свойства. Растут на сложных средах. Обычно их культивируют в мясных и печеночных бульонах, произрастая в которых фузобактерии вызывают помутнение сред, газообразование, часто источая «сырный» запах. На кровяном агаре через 48 ч образуют выпуклые желтоватые колонии диаметром 1–2 мм, окруженные зоной гемолиза.

Подобно *B. ureolyticus*, патогенные виды фузобактерий не растут на средах с желчными солями (20 %) и при наличии в них ванкомицина (5 мкм/мл). Образуют большое количество индола, что придает их культуре гнилостный запах. *F. necrophorum* среди фузобактерий – единственный липазоположительный вид.

Факторы патогенности. Патогенез поражений, вызванных фузобактериями, обусловлен секрецией ими фосфолипазы А, облегчающей проникновение вглубь тканей, и лейкоцидина, вызывающего разрушение клеток.

Лечение. Фузобактерии, как и бактероиды, чувствительны к левомицетину, метронидазолу и имипенему.

БАКТЕРОИДОЗЫ И ФУЗОБАКТЕРИОЗЫ
Таксономия
Клинические проявления
Биологические особенности
Лабораторная диагностика
Лечение
Морфология
Культивирование
Ферменты (конечные продукты распада)
Факторы патогенности
Условия выращивания
Среды
Выделение чистых культур (ключевые критерии дифференциации)
Серодиагностика бактероидозов (РА, РНГА, РПГ)
Рост на средах с 20 %-ным содержанием желчных солей
Запах
Чувствительность к ванкомицину
гнилостный
«сырный»

Граф 88

Возбудители спирохетозов

Возбудитель сифилиса

Таксономия. Возбудитель сифилиса – *Treponema pallidum*, открытая в 1905 г. Ф. Шаудином и Э. Гофманом, принадлежит к сем. *Spirochaetaceae* пор. *Spirochaetales*. Родственные ей возбудители фрамбезии и беджеля *T. pertenue* и *T. endemicum*, как оказалось, являются ничем иным как «бледными» аналогами *T. pallidum*. Это открытие позволило в составе бледной спирохеты выделять три подвида – *pallidum*, *pertenue*, *endemicum* – и считать их возбудителями соответствующих инфекций.

Клиника, патогенез и эпидемиология сифилиса. Сифилис (вероятно, от *sys* – свинья и *philos* – друг) – венерическое, социально обусловленное заболевание, которое при отсутствии лечения протекает циклически.

Первичный период сифилиса, или первичный сифилис, возникает через 3–4 недели после заражения, но инкубационный период может длиться от 10 до 90 дней. При первичном сифилисе на месте внедрения трепонемы образуется блюдцеобразная безболезненная язва диаметром от 3 до 30 мм с уплотненным, как пергамент, основанием, что дало повод называть ее твердым шанкром. Поверхность твердого шанкра мясо-красного цвета, дно ровное; скудное серозное отделяемое язвы содержит огромное количество трепонем. Спустя 7–10 дней увеличиваются ближайшие к твердому шанкру лимфатические узлы. Они имеют овальную форму, четко разграничены, плотны на ощупь, подвижны, безболезненны, не затронуты воспалительным процессом, но являются местом вторичной локализации и развития возбудителя болезни. Твердый шанкр сравнительно быстро заживает, и с 4–5-й недели от момента его возникновения начинается серопозитивный период сифилиса, когда в крови появляются противосифилитические антитела.

Вторичный период сифилиса, или вторичный сифилис, наступает через 2–3 мес. и характеризуется периодическими высыпаниями на коже и слизистых оболочках розеол, папул, везикул и пустул, в которых, как и в твердом шанкре, тоже с большим постоянством, хотя и в меньшем количестве, обнаруживаются бледные трепонемы. Мас-

сивная диссеминация трепонем в организме сопровождается продукцией специфических IgG и IgM, а также нарушением белкового обмена, на что, в частности, указывает изменение степени дисперсности сыворотки больного.

Через 3–4 года развивается третий период сифилиса, или третичный сифилис, при котором в подкожной клетчатке, внутренних органах, аорте образуются узловатые плотные гранулемы или гуммы (*gummi* – камень), состоящие из лимфоцитов, плазматических клеток и моноцитов. Сифилитические гуммы асептичны и являются следствием выработки аллергических IgE. Инфекционная аллергия в третьем периоде сифилиса может быть легко выявлена при помощи внутрикожной инъекции экстракта убитой культуры трепонем, или люэтина (*lues* – зараза; синоним сифилиса), изготовленного из убитых бледных трепонем или специально обработанной сифилитической ткани. Однако люэтиновая реакция малоспецифична. Сохраняются гуммы годами, иногда изъязвляются и рубцуются, обезображивая органы и нарушая их функцию. Пролиферативно-деструктивным процессам сопутствует неуклонно нарастающее антителообразование.

У некоторых лиц трепонемы поражают центральную нервную систему, и болезнь заканчивается четвертичным сифилисом – развитием прогрессивного паралича и спинной сухотки. При нейросифилисе бледная трепонема накапливается в тканях головного и спинного мозга, но при жизни обнаружить ее в спинномозговой жидкости удается крайне редко. В ликворе при четвертичном сифилисе легко выявляется повышенный титр антител.

Единственный источник инфекции – больной человек. Сифилис передается путем прямого контакта при половом сношении, реже – через посуду и предметы общего пользования, зараженные выделениями больных. Во время беременности бледная спирохета оказывает на плод тератогенное действие, что приводит к аборту, но если дети рождаются, то с тяжелыми проявлениями врожденного сифилиса, которые выявляются сразу же или спустя определенное время.

Фрамбезия и беджель – хронические генерализованные спирохетозы, протекающие подобно сифилису, но с некоторыми клиническими особенностями. В частности, при фрамбезии в первичном периоде на месте внедрения

T. pertenue появляется быстро превращающаяся в язву папула, которая, как и твердый шанкр, вскоре заживает. Во вторичном периоде на коже туловища появляются сочные розовые папулы, напоминающие ягоды малины (фр. *framboise*). Через 15–25 лет возникает третичный период, характеризующийся глубокими поражениями кожи, подкожной клетчатки, костей и суставов. При беджеле (араб. *bejel*) первичного аффекта не обнаруживают, и заболевание начинается с высыпаний, сходных с теми, которые возникают во вторичном периоде сифилиса. Затем развиваются гуммозно-язвенные поражения кожи и слизистых оболочек, появляются участки облысения (алопеции) и депигментации кожи (витилиго). Заканчиваются фрамбезия и беджель выздоровлением, но их течение может затягиваться на многие годы. Основной путь передачи – контактный (через поврежденную кожу). Чаще болеют дети. Фрамбезия регистрируется в виде эндемичных очагов во всех тропических регионах, а беджель – на Балканском полуострове, в Азии, Африке, Австралии.

Биологические свойства. *Морфология*. Бледная трепонема имеет форму правильной пилочки или пружинки с 8–14 равномерными завитками (см. рис. 11, *а*). Длина ее составляет 6–12 мкм, в поперечнике – около 0,2 мкм. Спор и капсул не образует, жгутиков не имеет. Получены данные об L-трансформации бледных трепонем. Реверсируя в исходную спиралевидную форму, L-трансформанты проходят в организме через стадию цист. Трепонема грамотрицательна, по Романовскому – Гимзе окрашивается в слабо-розовый цвет. В висячей и придавленной каплях совершает четыре типа движения: поступательное, вращательное, маятнико- и волнообразное.

Культивирование. Бледная трепонема – облигатный анаэроб. Выращивается при температуре 37 °С на кроличьей сыворотке с кусочком мозговой ткани, залитой вазелиновым маслом; в столбике полусвернутой лошадиной сыворотки; в глубине асцитического агара со свежей тканью кролика. Апробированы плотные среды, содержащие экстракт куриного эмбриона на соевой пептонной основе. Выросшие на средах культуральные трепонемы утрачивают характерную форму, а главное, – иммуногенность и патогенность. Трепонемы с неизмененными биологическими свойствами, или тканевые трепонемы, поддер-

живают в пассажах на кроликах, первоначально заражая животных кашицей сифилитической ткани больных людей под кожу мошонки или в паренхиму яичка.

Иммунитет. При сифилисе формируется нестерильный иммунитет к суперинфекции, сопровождающийся прежде всего волнообразным изменением реактивности организма. В первой стадии заболевания реактивность резко снижена, во второй – отчетливо возрастает, а в третьей она проявляется в виде аллергической реакции замедленного типа с формированием гумм. Параллельно при сифилисе вырабатываются комплементсвязывающие иммуноглобулины G и M, которые к тому же вызывают иммобилизацию (обездвиживание) трепонем и изменяют их адгезивные свойства, что сопровождается прилипанием к ним тромбоцитов. После выздоровления инфекционная аллергия исчезает, рассасываются гуммы, полностью прекращается выработка противотрепонемных антител и все серологические реакции становятся отрицательными.

После перенесенной фрамбезии развивается стойкий иммунитет к повторному заболеванию.

Лабораторная диагностика. Основным материалом в первичном периоде сифилиса, когда имеется твердый шанкр, является тканевая жидкость язвы, а главным методом диагностики болезни служит бактериоскопия. Вскоре после заживления шанкра, когда начинается серопозитивный период сифилиса, берут кровь, и диагноз заболевания подтверждается постановкой трех серологических реакций – Вассермана, иммобилизации трепонем и иммунного прилипания.

Бактериоскопическое исследование тканевой жидкости шанкра. Тканевую жидкость получают, надавливая кончиком скальпеля на дно твердого шанкра, после тщательного его очищения стерильным влажным тампоном. Насасывают ее тонко вытянутым капилляром пастеровской пипетки и, сделав на предметном стекле раздавленную каплю, микроскопируют в темном поле. Трепонема сифилиса обладает медленным поступательным движением и имеет равномерные завитки. Ее легко дифференцируют от непатогенной *Borrelia refringens*, часто встречающейся на гениталиях, так как она имеет сравнительно грубое тело, крупные завитки и не совершает сгибательных движений. Если шанкр располагается на губах, блед-

ную трепонему практически невозможно отличить от находящейся в полости рта сапрофитической *Treponema microdentium*. В таких случаях исследуют пунктат региональных лимфатических узлов, в которые трепонемы-комменсалы никогда не проникают.

Параллельно изучают мазки. Их фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова. Окрашивают по Романовскому – Гимзе в течение 2–4 ч. Трепонема сифилиса приобретает бледно-розовый, а *B. refringens* и *Treponema microdentium* – красновато-фиолетовый цвет.

Во втором периоде сифилиса в раздавленных каплях и мазках таким же образом исследуют содержимое кожных высыпаний, но обнаружить в серозном или гнойном отделяемом везикул и пустул бледную трепонему удается крайне редко.

Серодиагностика. С 4–5-й недели от начала и на протяжении всей болезни в организме больного сифилисом вырабатываются антитела, которые можно обнаружить с помощью различных серологических реакций. Для их обнаружения чаще других применяют реакцию Вассермана (РВ), сходную по технике постановки с реакцией связывания комплемента, но более трудоемкую. Связывание комплемента в РВ, как и в РСК, определяется гемолитической системой, но в отличие от РСК, при которой в качестве антигена используется соответствующая взвесь живых микробов или диагностикум, РВ из-за отсутствия чистой культуры трепонемы ставится с тремя антигенами (табл. 22), из которых один – трепонемный (специфический), а два других – нетрепонемные (неспецифические). В качестве специфического антигена для РВ используются экстракты печени сифилитического плода или тканевые трепонемы яичка кролика с сифилитическим орхитом. Неспецифические антигены представляют собой липидные экстракты различных серий нормального бычьего сердца, смешанные с лецитином и холестерином (кардиолипиновые антигены). В течение первых трех стадий сифилиса для РВ берут инактивированную сыворотку, а при нервных формах – также ликвор. При постановке РВ со спинномозговой жидкостью ее не разводят и не инактивируют, так как она не содержит комплемента, и ввиду того, что ликвор не обладает антикомплементарными свойствами, производственный комплемент берут в реакцию в его титре без 25 %-ной надбавки.

Таблица 22. **Схема постановки РВ**

Ингредиенты, мл	Номер пробирки			
	1	2	3	Контроль
Сыворотка больного, инактивированная и разведенная 1 : 5	0,5	0,5	0,5	0,5
Антиген 1 (специфический)	0,5	–	–	–
Антиген 2 (неспецифический)	–	0,5	–	–
Антиген 3 (неспецифический)	–	–	0,5	–
Комплемент (рабочая доза)	0,5	0,5	0,5	0,5
Изотонический раствор натрия хлорида	–	–	–	0,5
В термостат при 37 °С на 45 мин				
Гемолитическая система	1,0	1,0	1,0	1,0
В термостат при 37 °С на 1 ч				

Примечание. В качестве дополнительных контролей в реакцию вводят сыворотки больного сифилисом и здорового человека. Положительную реакцию оценивают плюсами «++++», «+++», «++», «+» (см. Учет РСК).

Трепонемный антиген выявляет специфические антитела против поверхностных детерминант бледных трепонем, а кардиолипиновые – вассермановские, или аутоантитела, против митохондриальных мембран. В первый период заболевания РВ положительна у 40–50 % страдающих сифилисом, позже – у 70–100 % заболевших.

Более чувствительны реакция иммобилизации трепонем и реакция иммунного прилипания.

Реакция иммобилизации трепонем (РИТ) – это РСК, индикация связывания комплемента в которой проводится по феномену обездвиживания тестикулярных трепонем кролика. Ее ставят в двух пробирках. В каждую из них наливают по 0,5 мл исследуемой сыворотки, прогретой при температуре 56 °С 30 мин, 0,3 мл тканевой культуры хорошо подвижных бледных трепонем и 0,1 мл комплемента, но в опытную – нативного, а в контрольную – инактивированного (прогретого). Пробы встряхивают, помещают в анаэростат и выдерживают смеси при температуре 35 °С в течение 18–20 ч, после чего пастеровской пипеткой по капле наносят на предметные стекла, накладывают на них

покровные и исследуют раздавленные капли в темнопольном микроскопе, подсчитывая в каждой из них по 25–30 трепонем. Процент их иммобилизации вычисляют по формуле

$$\frac{A-B}{A}\cdot 100,$$

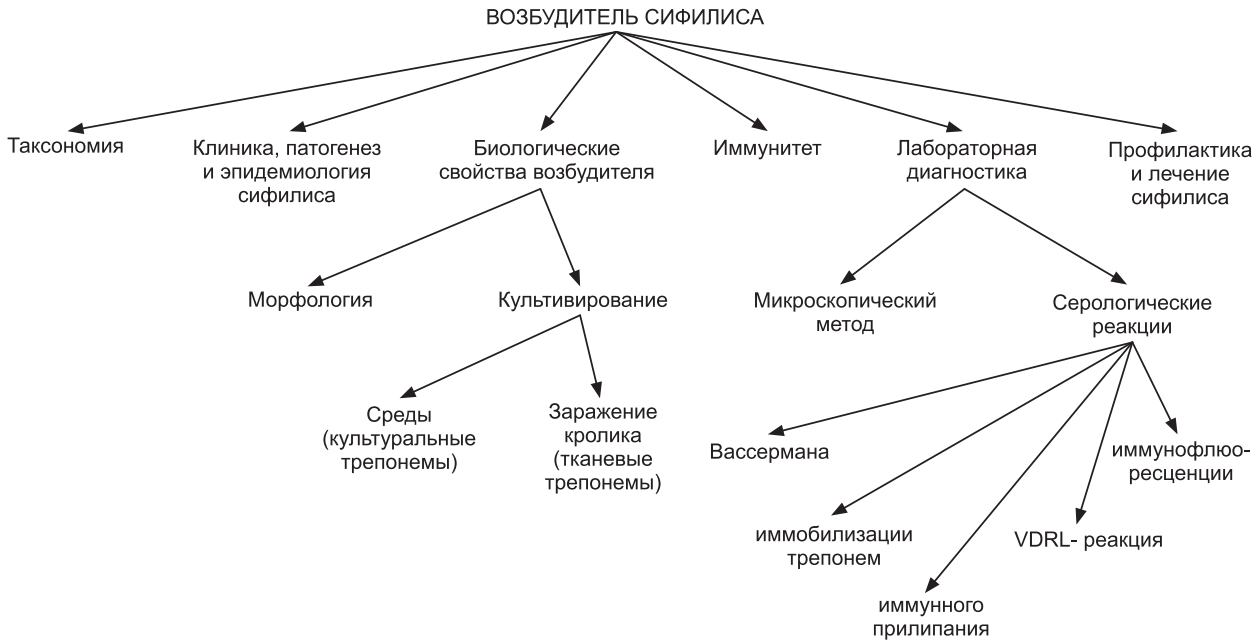
где A – количество подвижных трепонем в контрольной пробе; B – их количество в опытной пробе.

Реакция иммунного прилипания (РИП) – это модификация РСК, в которой о связывании комплемента судят по феномену нагрузки трепонем тромбоцитами. РИП ставится тоже в двух пробирках. В опытную вносят 0,5 мл взвеси живых или убитых трепонем, 0,1 мл сыворотки больного сифилисом, инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 мин, и 0,2 мл свежей плазмы морской свинки, являющейся источником комплемента и тромбоцитов; в контрольную – те же бледные трепонемы, плазму морской свинки, но вместо иммунной – инактивированную нормальную сыворотку человека. Смеси ставят в термостат при температуре 37 °С на 30–60 мин, затем делают раздавленные капли, которые исследуют в темном поле, определяя в них количество нагруженных (облепленных) тромбоцитами и свободных трепонем.

Особого упоминания заслуживает ИФА, позволяющая выявлять трепонемный антиген.

Большие надежды возлагаются на РИФ и VDRL-реакцию (*Venereal Disease Research Laboratory*) без использования трепонем.

Непрямая РИФ. На предметное стекло наносят пунктат яичка кролика, зараженного возбудителем сифилиса, в таком количестве, чтобы в поле зрения находилось 50–60 особей трепонем. Мазки высушивают на воздухе и фиксируют в ацетоне в течение 5 мин. Затем на них наносят сыворотку больного в разведении 1 : 200 и выдерживают во влажной камере при 35 °С в течение 30 мин (I фаза). Далее мазки промывают в течение 10 мин в забуференном изотоническом растворе натрия хлорида и высушивают на воздухе. После этого препарат обрабатывают флюоресцирующей сывороткой против глобулинов человека во влажной камере при комнатной температуре в течение 30 мин (II фаза). Мазки промывают в двух порциях забуференно-


ВОЗБУДИТЕЛЬ СИФИЛИСА
Таксономия
Клиника, патогенез и эпидемиология сифилиса
Биологические свойства возбудителя
Иммунитет
Лабораторная диагностика
Профилактика и лечение сифилиса
Морфология
Культивирование
Микроскопический метод
Серологические реакции
Среды (культуральные трепонемы)
Заражение кролика (тканевые трепонемы)
Вассермана
иммунофлюо-ресценции
иммобилизации трепонем
VDRL- реакция
иммунного прилипания

Граф 89

го изотонического раствора натрия хлорида, высушивают и микроскопируют в люминесцентном микроскопе. Реакцию оценивают по интенсивности желто-зеленого свечения трепонем.

VDRL-реакция – является реакцией флоккуляции на предметных стеклах с использованием вместо трепонем кардиолипин-лецитин-холестеринового антигена.

Такие же методы бактериоскопических и серологических исследований используются в идентификации подвидов *pertenue* и *endemicum*, но так как отдифференцировать их от подвида *pallidum* очень трудно, то при постановке диагноза *фрамбезия* и *беджель* необходимо учитывать ареал их распространения, клинические особенности проявления и анамнез заболевших лиц.

Профилактика и лечение. Специфическая профилактика сифилиса и подобных ему спирохетозов не разработана. В арсенал средств их лечения входят пенициллин и его дюрантные производные (бициллин-1, 3, 5), тетрациклин, олететрин, эритромицин, препараты висмута (бийохинол, бисмоверол, пентабисмол), производные йода (йодид калия, йодид натрия, кальцийодин). Лечение сифилиса обычно состоит из нескольких циклов, но используют также непрерывный (перманентный) метод терапии антибиотиками, особенно при выявлении свежих форм заболевания. При серорезистентном сифилисе назначают неспецифические средства стимуляции защитных сил организма, например, инъекции пирогенала, продигиозана, обезжиренного молока, 2 %-ного раствора очищенной серы в персиковом масле, подкожное введение кислорода, биогенных стимуляторов (алое, ФиБС, экстракт плаценты), внутрь – метилурацил, пентоксил, поливитамины; применяют также сегментарное УФ-облучение, аутогемотерапию.

Возбудители возвратных тифов

Таксономия. Возбудителями возвратных тифов являются около двух десятков патогенных для человека видов спирохет рода *Borrelia*, названных по нозологической форме заболевания, местности, где они циркулируют, или имени первооткрывателя. Одна из них – *B. recurrentis*, открытая в 1868 г. О. Обермейером, является возбудителем повсеместно распространенного эпидемического воз-

вратного тифа (рекурренса), остальные вызывают эндемичные возвратные тифы, в частности *B. persica*, *B. uzbekistanica*, *B. latyschewi* (Латишева) – в Средней Азии; *B. caucasica* – на Северном Кавказе; *B. duttoni* (Даттона) – в Кении, Уганде и других странах Африки; *B. aegyptica* – в Египте; *B. berbera* – в Марокко; *B. normandi*, *B. hispanica* – во Франции и Испании; *B. venezuelensis, B. brasiliensis* – в Южной Америке. Все они отнесены к сем. *Spirochaetaceae*, пор. *Spirochaetales*.

Клиника и эпидемиология. Возвратные тифы – острые, кровяные, трансмиссивные инфекции, характеризующиеся последовательной сменой двух-пяти (а при эндемических рекурренсах и более) приступов лихорадки, за которыми следуют безлихорадочные периоды апирексии. Подъемы температуры сопровождаются ознобами, сильными головными и мышечными болями, помрачением сознания, носовыми кровотечениями, постепенно развивающейся желтухой, а снижение лихорадки – обильным потоотделением.

Эпидемический возвратный тиф – антропонозная инфекция; ее источником является больной человек, а переносчиками – платяная и головная вши. *B. recurrentis* размножается в гемолимфе вшей, поэтому заражение человека возможно лишь после раздавливания насекомых и последующего втирания боррелий в расчесы кожи. Это объясняет, почему инфицирование человека эпидемическим возвратным тифом наблюдается реже, чем сыпным, который тоже передается вшами, но, в отличие от боррелий, риккетсии выделяются ими спонтанно при дефекации. Вшиный возвратный тиф имеет социальную обусловленность и осенне-зимнюю сезонность.

Эндемические возвратные тифы – природно-очаговые зоонозные заболевания. Резервуаром эндемических рекурренсов являются мышевидные грызуны, а переносчиками – клещи-орнитодорины, выделяющие боррелии с секретом слюнных желез. Клещевыми возвратными тифами люди заболевают спорадически, главным образом в весенне-летний период, когда отмечается наибольшая активность переносчика.

Биологические свойства боррелий. *Морфология.* Боррелии имеют форму неправильной спирали с 3–8 неравномерными по глубине и амплитуде завитками длиной 5–50 мкм

и толщиной 0,3–0,5 мкм (см. рис. 11, *б*). Концы их тела истончены. В раздавленной и висячей каплях боррелии обладают змеевидным движением. Грамотрицательны, хорошо воспринимают водный фуксин, метиленовый синий, по Романовскому – Гимзе окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, легко выявляются в мазках, приготовленных по методам Бурри и Морозова.

Культивирование. Боррелии растут медленно в анаэробных условиях при температуре 28–30 °С на кроличьей или лошадиной сыворотке с кусочками паренхиматозных тканей на дне пробирок, залитых сверху толстым слоем вазелинового масла. Первые генерации боррелий появляются на 4, 7, 12-й день выращивания, что обнаруживается при микроскопии мазков, раздавленных и висячих капель. Культивирование боррелий возможно в курином эмбрионе.

Патогенность. В эксперименте возбудителем эпидемического возвратного тифа удается заразить только обезьян. Боррелии эндемических возвратных тифов патогенны для белых мышей и морских свинок, у которых они вызывают септицемию.

Иммунитет. Естественного иммунитета к эпидемическому возвратному тифу у человека нет. В процессе лихорадочных приступов в организме больных интенсивно продуцируются спирохетолизины, полнота действия которых на боррелии определяет чередование и число рецидивов. Постинфекционный иммунитет у переболевших непродолжительный и малонапряженный. Восприимчивость к эндемическому возвратному тифу у людей неодинакова. В природных очагах клещевого рекурренса болеют главным образом приезжие. Предполагается, что резистентность к нему у местного населения обусловлена высоким уровнем антител к боррелиям, что объясняется непрерывным проэпидемичиванием аборигенов с самого раннего детства.

Лабораторная диагностика. Основным методом, который позволяет подтвердить диагноз возвратного тифа, является бактериоскопия мазка крови и толстой капли из нее. При этом вероятность обнаружения боррелий в крови больных зависит от нозологической формы и стадии возвратных тифов. В лихорадочном периоде, когда отмечается спирохетемия, они сравнительно легко выявляются в мазках из крови, а в безлихорадочных – исключительно в толстой капле. Особенно большое предпочтение перед маз-

ком толстая капля имеет в диагностике эндемических рекурренсов, при которых степень спирохетемии может оказаться крайне низкой даже на высоте лихорадочных приступов болезни.

Толстую каплю получают нанесением на предметное стекло 1–2 капель крови с последующим высушиванием их без фиксации и окраской по Романовскому–Гимзе, что приводит через несколько минут к полному лизису эритроцитов в препарате. Заменив краситель новой порцией, толстую каплю окрашивают в течение 30–40 мин, осторожно промывают, высушивают и под иммерсионным микроскопом обнаруживают в ней скопления боррелий в виде войлочных сеточек или паутинок сине-фиолетового цвета среди лейкоцитов.

В безлихорадочных фазах возвратных тифов, когда в крови больных остается очень мало спирохет, полезным может оказаться метод обогащения Бернгофа. В таких случаях из вены больных берут 8–10 мл крови. Отделив сыворотку, ее центрифугируют в течение 45–60 мин при 3000 об/мин. Затем, опрокинув пробирку, быстро выливают жидкость, а из осадка готовят препараты раздавленной капли и мазки. Первые исследуют в темнопольном, а вторые – в иммерсионном микроскопе.

Мазки из крови больных после высушивания фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова и окрашивают по Романовскому – Гимзе или фуксином Пфейффера. Боррелии находят в них среди большой массы эритроцитов, окрашенных в слабо-розовый цвет.

Серодиагностика. При возвратных тифах серологические реакции становятся положительными уже в период первой апирексии, которая сама по себе является следствием выработки большого количества спирохетолизинов. После второго-третьего лихорадочного приступа титр лизинов еще больше возрастает, и, главное, резко расширяется спектр их специфичности по отношению к разным сероварам боррелий, которые могли возникать в тканях организма больных во время светлых промежутков болезни. Наиболее легко выполнимыми в серодиагностике возвратных тифов являются реакции иммобилизации боррелий (РИБ) и РИП. РИБ ставят на предметном стекле, смешивая каплю сыворотки человека, перенесшего недавно возвратный тиф (или лихорадочный приступ), с каплей

боррелий, а при их отсутствии – с каплей крови исследуемого больного. Реакция считается положительной при полном обездвиживании боррелий под влиянием антител сыворотки выздоравливающих в течение 30–60 мин инкубирования смеси в термостате. Со 2–3-й недели заболевания можно ставить РИП или реакцию нагрузки боррелий тромбоцитами плазмы морской свинки под воздействием антител (тромбоцитобаринов) сыворотки больного (см. «Серодиагностику сифилиса»).

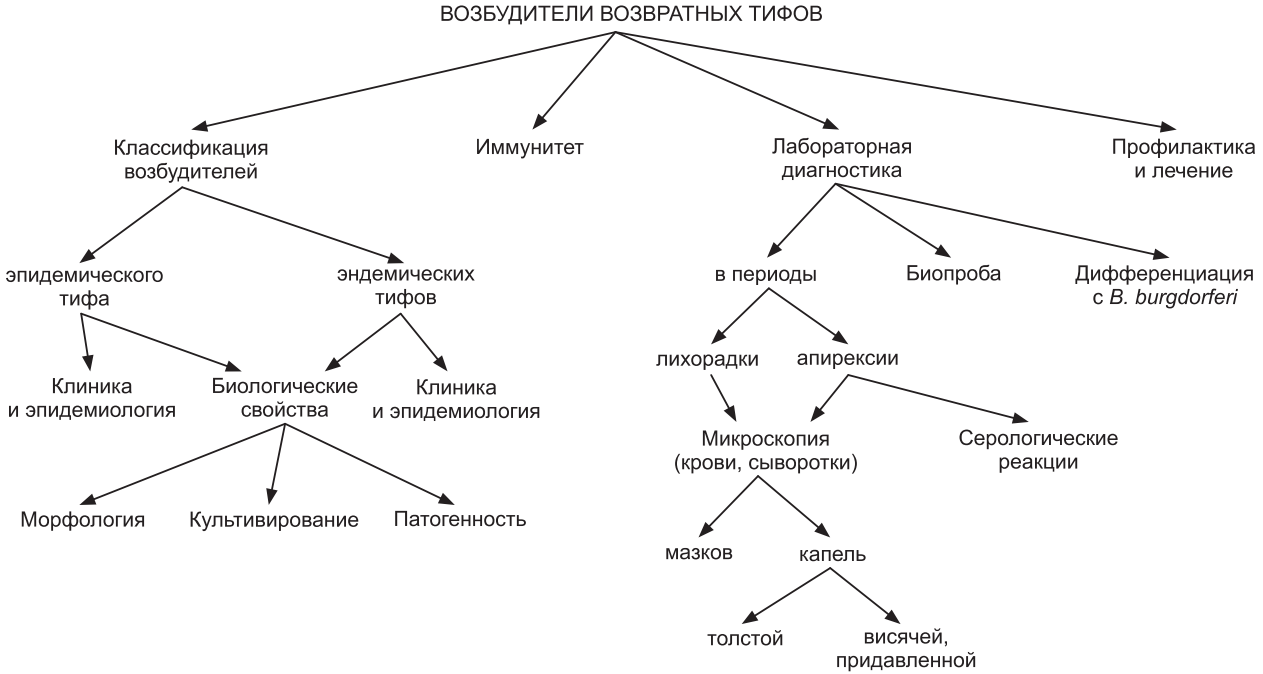
Биопроба. К биологическому эксперименту прибегают после отрицательных результатов микроскопического исследования крови и для дифференциации возвратных тифов. В опыт берут морских свинок и белых мышей, которых подкожно или внутрибрюшинно инфицируют 3–5 мл цитратной крови больных. При наличии в крови боррелий эндемического возвратного тифа через 5–7 дней у животных возникает септицемия. Возбудитель эпидемического возвратного тифа для морских свинок не патогенный.

Профилактика и лечение. Специфическая профилактика не разработана. В борьбе с эпидемическим возвратным тифом первостепенное значение имеет ликвидация завшивленности. Снижение заболеваемости эндемическими возвратными тифами достигается уничтожением грызунов и клещей, защитой людей от их укусов. Для лечения применяются пенициллин и его полусинтетические аналоги, тетрациклины, цефалоспорины.

Возбудители лаймборрелиоза

Таксономия. Возбудителями лаймборрелиоза на американском континенте являются *Borrelia burgdorferi*, выделенная в 1981 г. У. Бургдорфером от детей во время эпидемической вспышки в г. Лайм штата Коннектикут, а в странах Европы – *B. garinii* и *B. afzelii*. Как и боррелии возвратных тифов, все они отнесены к сем. *Spirochaetaceae* пор. *Spirochaetales*.

Клинико-эпидемиологические особенности лаймборрелиоза. Различают локальную и диссеминированную формы лаймборрелиоза. Первая проявляется синдромом блуждающей эритемы в виде округлой папулы с ободком гиперемии.


ВОЗБУДИТЕЛИ ВОЗВРАТНЫХ ТИФОВ
Классификация возбудителей
Иммунитет
Лабораторная диагностика
Профилактика и лечение
эпидемического тифа
эндемических тифов
в периоды
Биопроба
Дифференциация с B. burgdorferi
Клиника и эпидемиология
Биологические свойства
Клиника и эпидемиология
лихорадки
апирексии
Микроскопия (крови, сыворотки)
Серологические реакции
Морфология
Культивирование
Патогенность
мазков
капель
толстой
висячей, придавленной

Граф 90

При диссеминированном лаймборрелиозе, возникающем вслед за попаданием боррелий в кровоток, органы и ткани, поражается опорно-двигательный аппарат, нервная и сердечно-сосудистая системы, а также кожа, на которой появляются вторичные эритемы. У некоторых больных развивается менингит или менингоэнцефалит как следствие проникновения боррелий через гематоэнцефалический барьер. Характерным синдромом у большинства заболевших детей является ювенильный артрит, который через несколько месяцев или лет приобретает хронический характер. Основной резервуар инфекции в природе – мелкие грызуны, лоси и олени. Переносятся боррелии пастбищными клещами *Ixodes ricinus* и *I. persulcatus*. Они же могут быть и резервуаром, так как передают возбудителей лаймборрелиоза потомству трансовариально.

Биологические свойства боррелий и лабораторная диагностика лаймборрелиоза. По морфологическим признакам возбудители лаймборрелиоза не отличаются от боррелий возвратных тифов. Как правило, они имеют большие размеры (в среднем 20–30 × 0,2–0,3 мкм). Их обнаруживают в крови и спинномозговой жидкости. Клинически поставленный диагноз подтверждается путем выявления в сыворотке крови больных антител к специфическим антигенам в непрямой РИФ.

Профилактика и лечение. Так же, как и при эндемических возвратных тифах, профилактика лаймборрелиоза основана на защите людей от укусов клещей. Для лечения используют тетрациклины, пенициллины, цефтриаксон и другие цефалоспорины.

Возбудитель лептоспироза

Таксономия. Возбудитель лептоспироза – *Leptospira interrogans* относится к сем. *Leptospiraceae* пор. *Spirochaetales*. Открыта в 1907 г. А. Стимсоном.

Клиника и эпидемиология. Лептоспироз – острая инфекционная болезнь из группы зоонозов. В большинстве случаев заболевание начинается внезапно с быстрого повышения температуры и озноба. По мере развития лептоспиремии и сопутствующей ей интоксикации появляются резкая слабость, тошнота и рвота, головные и мышечные

боли, розеолезно-папулезная или мелкоточечная сыпь. С 3–4-го дня у некоторых больных возникает желтуха, увеличивается печень. В процессе развития болезни поражаются центральная нервная система и почки, в частности снижается диурез, в моче появляются белок, эритроциты, цилиндры и лептоспиры. Высокая температура держится 5–8 сут, но возможны два-три рецидива лихорадочных приступов.

Различают природный и антропургический (связанный с деятельностью человека) очаги лептоспироза.

Источником инфекции в природе являются млекопитающие, земноводные, пресмыкающиеся и птицы. Наибольшее эпидемиологическое значение имеют грызуны. Лептоспирозная инфекция у них протекает в хронической форме с длительной лептоспироурией.

Заражение людей в природных очагах происходит через воду на сенокосах, при уборке овощей и купании. Сельские антропургические очаги связаны в основном с лептоспирозом крупного рогатого скота и свиней, городские – с заболеванием крыс и собак. Главным фактором передачи лептоспироза в антропургических очагах является вода, меньшее – молоко и предметы, зараженные животными-лептоспировыделителями. Возможно инфицирование людей при уходе за больными животными и разделке туш во время их убоя.

Биологические свойства патогенных лептоспир. *Морфология*. Лептоспиры представляют собой С- или S-образные нити длиной 6–20 мкм и толщиной 0,06–0,25 мкм, с плотно прилегающими многочисленными мелкими завитками (см. рис. 11, *в*). Концы лептоспир крючкообразно загнуты, но встречаются бескрючковые формы. Они совершают змеевидные, винтообразно-поступательные и сгибательные движения. Грамотрицательны, по Романовскому – Гимзе окрашиваются в розовый цвет. Для обнаружения лептоспир применяют методы Бурри и серебрения по Морозову.

Культивирование. Лептоспиры – гидробионты, по типу дыхания – облигатные аэробы. Выращиваются на стерильной водопроводной воде с добавлением 10 %-ной кроличьей сыворотки (среда Уленгута), к которой нередко добавляют пептон, поваренную соль и фосфатную буферную

смесь (среда Ферворта – Вольффа); на фосфатно-сывороточной среде Терских, представляющей собой смесь 10 мл фосфатного буфера с 90 мл дистиллированной воды и 10 мл инактивированной сыворотки кролика; в полужидкой агаровой среде с гемолизированной кроличьей кровью. В жизнедеятельности лептоспир большую роль играют липиды, поэтому они хорошо растут также на бессывороточных средах, содержащих яичный желток и молоко. Развиваются лептоспиры медленно (5–7–30 сут) при температуре 28–30 °С. Среда при этом не меняет цвета, и о росте лептоспир судят по увеличению их численности в мазках и раздавленных каплях.

Антигены. Патогенные лептоспиры отличаются сложной антигенной структурой. В состав *Leptospira interrogans* входит 38 серогрупп и более 200 сероваров, которые дифференцируются с помощью агглютинирующих сывороток.

Лабораторная диагностика. Основным методом, подтверждающим диагноз лептоспироза, является бактериоскопия раздавленных капель из осадков: 1) плазмы крови, в которой лептоспиры обнаруживаются с первых дней заболевания и циркулируют в ней до появления желчных кислот и антител (обычно 5–7 дней болезни), 2) мочи, где лептоспиры появляются к концу второй недели болезни; 3) спинномозговой жидкости, куда лептоспиры проникают в случае развития менингита. При этом для приготовления осадков из плазмы 2–3 мл крови смешивают с таким же объемом 2 %-ного цитрата натрия и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. Осадки мочи и спинномозговой жидкости получают, центрифугируя их в течение 2 ч при 4000 об/мин.

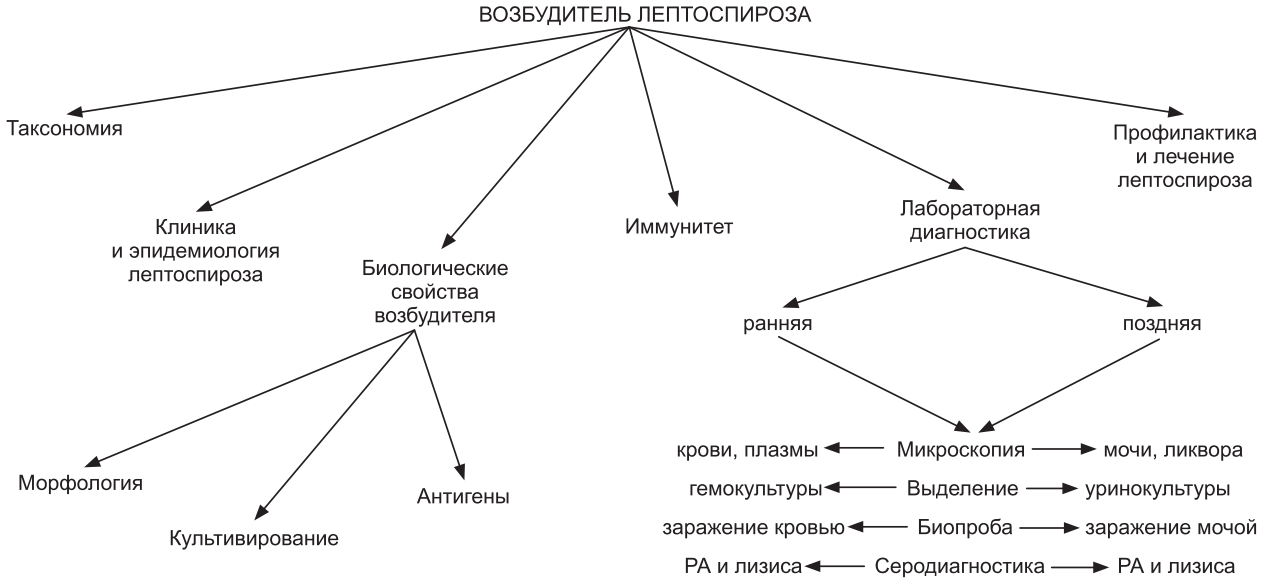
Выделяя гемо-, ликворо- и уринокультуры, 2–3 мл крови, спинномозговой жидкости и стерильно взятой мочи (профильтрованной через мембранные фильтры № 1) засевают на 10 %-ную сывороточно-водную среду Уленгута или на фосфатно-сывороточную среду Терских. Посевы помещают в термостат при температуре 28 °С, еженедельно микроскопируя раздавленные капли культуры для обнаружения роста лептоспир. Чистые культуры лептоспир идентифицируют в реакции агглютинации с типовыми сыворотками.

Сравнительно просто можно выделить культуру лептоспир, заразив внутрибрюшинно или внутрикожно молодых морских свинок цитратной кровью или осадком мочи. При этом лептоспиры обнаруживаются в экссудате брюшной полости животных на 2–3-й день. Свинки погибают на 8–12-е сут. Во внутренних органах наблюдаются множественные геморрагии и некротические очаги. В окрашенных по Романовскому – Гимзе мазках-отпечатках из печени и почек среди клеточных элементов обнаруживаются клубки розовых лептоспир.

На второй неделе заболевания в крови больных лептоспирозом резко нарастает титр антител. Для их выявления предложена реакция микроагглютинации и лизиса лептоспир. Ее ставят в нескольких рядах пробирок, в каждую из которых вносят по 0,2 мл разведенной от 1 : 50 до 1 : 800 сыворотки больного и равный объем живой культуры различных сероваров лептоспир. После выдерживания в термостате при 37 °С в течение 1 ч из каждой пробирки готовят раздавленную каплю и микроскопируют в темном поле. При наличии в сыворотке антител к определенному серовару лептоспир констатируют образование аггломератов-паучков, их набухание и распад. Диагностическое значение имеет положительная реакция в разведении сыворотки 1 : 100 и выше.

Серодиагностику лептоспироза можно также осуществить с помощью РСК. В качестве антигена используют культуры лептоспир, концентрированные на ультрацентрифугах, или аутолизаты старых культур лептоспир. Сыворотки больных разводятся 1 : 10, 1 : 100 и более. Положительной считают реакцию в разведении сыворотки 1 : 10 и выше при интенсивности «++++» и «+++».

Специфическая профилактика и лечение. Профилактика лептоспироза проводится по эпидемическим показаниям корпускулярной убитой поливалентной вакциной, состоящей из наиболее распространенных сероваров лептоспир. Вводят ее двукратно подкожно по 2 и 2,5 мл с интервалом 7–10 дней. Ревакцинируют привитых через 1 год однократной инъекцией (2 мл). Для лечения лептоспироза применяются пенициллин и полусинтетические пенициллины, тетрациклины, поливалентный специфический иммуноглобулин.


ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛЕПТОСПИРОЗА
Таксономия
Клиника и эпидемиология лептоспироза
Биологические свойства возбудителя
Иммунитет
Лабораторная диагностика
Профилактика и лечение лептоспироза
Морфология
Культивирование
Антигены
ранняя
поздняя
крови, плазмы
Микроскопия
мочи, ликвора
гемокультуры
Выделение
уринокультуры
заражение кровью
Биопроба
заражение мочой
РА и лизиса
Серодиагностика
РА и лизиса

Граф 91

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОГЕННЫХ РИККЕТСИЙ И РИККЕТСИОЗОВ

Таксономия. Патогенные для человека риккетсии относятся к родам *Rickettsia*, *Rochalimaea* и *Coxiella* сем. *Rickettsiaceae* пор. *Rickettsiales*.

Род Rickettsia подразделяется на три группы: 1. Группа вшиво-блошиных сыпных тифов, включающих возбудителей эпидемического (*R. prowazekii*) и эндемического, или крысиного, сыпного тифа (*R. typhi*); 2. Группа клещевых пятнистых лихорадок, в состав которой входят возбудитель пятнистой лихорадки Скалистых гор и бразильского сыпного тифа (*R. rickettsii*), марсельской, или средиземноморской, лихорадки (*R. conorii*), североавстралийского (*R. australis*), сибирского, или североазиатского, (*R. sibirica*), осповидного, или везикулезного (*R. akari*), риккетсиозов; 3. Группа японской речной лихорадки, включающая возбудителя лихорадки цуцугамуши, или краснотелково-клещевой лихорадки (*R. orientalis*).

К роду *Rochalimaea* отнесена *R. quintana*, вызывающая траншейную, или окопную пятидневную волынскую лихорадку, а к роду *Coxiella* – *C. burnetii* (Бернета), которая вызывает Ку-лихорадку.

Клиника и эпидемиология. Риккетсиозы – кровяные, преимущественно трансмиссивные инфекции. Они проявляются в виде лихорадочных заболеваний с розеолезными, петехиальными, макуло-папулезными высыпаниями, при которых поражаются мелкие сосуды (васкулиты, тромбоваскулиты) и нервная система.

Источники риккетсиозных инфекций различны: при сыпном тифе и волынской лихорадке – человек (антропонозы), при других риккетсиозах – дикие и домашние животные (зоонозы). В организме больного человека риккетсии циркулируют в крови. Животные выделяют их в окружающую среду с калом и мочой; риккетсии проникают также в молоко.

Антропонозные риккетсиозы передаются платяными и головными вшами, зоонозные – клещами, блохами и вшами (эндемический сыпной тиф), а также алиментарным, пылевым и контактным путями, поражая людей спорадически. Пятнистые риккетсиозы и лихорадка цуцугамуши – эндемики, остальные риккетсиозы распространены повсеместно и часто вызывают эпидемии.

Из всех риккетсиозов человека особое эпидемиологическое значение для СНГ имеют сыпной тиф, североазиатский риккетсиоз и Ку-лихорадка.

Биологические свойства патогенных риккетсий. *Морфология*. Риккетсии – полиморфные микроорганизмы, характеризующиеся метахромазией. В вегетативной стадии они представлены палочковидными клетками. В патологическом материале чаще обнаруживаются кокки или мелкие палочки с зернистостью размерами 0,8–2 × × 0,3–0,6 мкм, реже встречаются бациллярные и нитевидные формы, длина которых может достигать 3–40 мкм (см. рис. 13). Спор, капсул и жгутиков не образуют. Грамотрицательны, по Романовскому – Гимзе окрашиваются в сиреневый цвет, по Здродовскому – в рубиново-красный.

Культивирование. Риккетсии – облигатные паразиты, размножающиеся внутриклеточно. Исключение составляет *R. quintana*, которую можно выращивать на специальных средах. Неспособность патогенных риккетсий к репродукции в бесклеточных субстратах связана, вероятно, со структурными особенностями клеточных стенок и утратой ими ферментов гликолитического цикла (вместо глюкозы они утилизируют глютаминовую кислоту). Обычно их культивируют при температуре 35–36 °С в переживающих клетках куриного эмбриона, клещей-переносчиков, почек обезьян и других млекопитающих, в желточном мешке 5–7-дневных куриных эмбрионов, в организме животных (морские свинки, белые мыши) и членистоногих – например, риккетсии Провацека размножаются в кишечнике вшей.

Резистентность. Патогенные риккетсии, как и многие другие возбудители кровяных инфекций, быстро погибают в окружающей среде. Длительно переживают в ней коксиеллы Бернета и риккетсии Провацека. Чувствительность к антибиотикам у риккетсий такая же, как и у большинства бактерий.

Токсины и антигены. Антигены риккетсий представлены группоспецифическими липополисахаридами клеточной стенки, проявляющими токсические и гемолитические свойства. К ним, в частности, вырабатываются агглютинины, которые, как установили в начале XX в. Э. Вейль и А. Феликс, способны перекрестно агглютинировать OX_{19}-, OX_2-, $OX_к$-штаммы *Proteus vulgaris*, которые широко использовались ранее в серодиагностике эпи-

демического сыпного тифа, лихорадки цуцугамуши и других риккетсиозов.

Лабораторная диагностика. В диагностике риккетсиозов основную роль играет определение титра специфических антител в сыворотке больного человека. Используют РА, РНГА, РСК, РИФ, нейтрализации риккетсий сывороткой больного с последующим инфицированием морских свинок.

Биопроба. Для биологического эксперимента отбирают морских свинок-самцов и заражают их интрацеребрально и внутрибрюшинно. Риккетсии Провацека размножаются в прекапиллярах сосудов мозга, где образуются своеобразные периваскулярные узелки. Риккетсии группы клещевых пятнистых лихорадок заселяют мезотелий влагалищных оболочек яичек и вызывают орхит (феномен Штрауса). При этом *R. rickettsii* размножаются в цитоплазме и ядрах зараженных клеток, риккетсии группы клещевых пятнистых лихорадок – только в ядрах; *R. prowazekii*, *R. typhi* и *R. orientalis* – лишь в цитоплазме; *R. quintana* – в вакуолях, а *C. burnettii* – в вакуолях и фаголизосомах, что можно выявить при микроскопическом исследовании мазков и срезов тканей.

Профилактика. Борьба с риккетсиозами включает целый комплекс санитарно-противоэпидемических и санитарно-ветеринарных мероприятий, среди которых основное значение имеет повышение санитарной культуры населения, благоустройство жилищ, индивидуальная защита человека от укусов клещей, дезинсекционные и дератизационные мероприятия, направленные на уничтожение переносчиков и источников инфекции в природе. Хороший профилактический эффект оказывают вакцины против эпидемического сыпного тифа, лихорадки цуцугамуши, Ку-лихорадки.

Возбудитель сыпного тифа

Возбудителя сыпного тифа – *R. prowazekii* – в лейкоцитах крови больных людей и кишечнике инфицированных им вшей обнаружил в 1913 г. чешский ученый С. Провацек, погибший спустя два года от сыпнотифозной инфекции в Сербии в результате внутрилабораторного заражения.

Клиника и эпидемиология. Сыпной тиф (эпидемический, европейский, вшивый) – лихорадочное заболевание из группы кровяных инфекций, склонное к эпидемическому распространению в условиях завшивленности населения. Заболевание начинается остро с резкого озноба и быстрого подъема температуры до 39–40 °С. Лихорадочное состояние сопровождается риккетсиемией и токсинемией, что вызывает головные боли, помрачение сознания, бред, невралгии, расстройство глотания и дыхания. Размножение риккетсий в эндотелии мелких сосудов приводит к возникновению розеолезно-петехиальной сыпи и нарушениям сердечно-сосудистой деятельности. При сыпном тифе отмечается высокая летальность. В развитых странах сыпной тиф ликвидирован, но спорадически встречается болезнь Брилла, или рецидивный сыпной тиф, возникающий у людей, давно перенесших инфекцию. Экспериментально доказано, что сыпнотифозная инфекция отличается нестерильным иммунитетом, и риккетсии Провацека могут сохраняться в лимфатических узлах и селезенке переболевших многие годы или всю жизнь. Неизвестными остаются лишь причины их реактивации.

Сыпной тиф – антропонозная, трансмиссивная инфекция. Ее источником является больной человек, кровь которого заразна в течение 20–25 дней начиная с конца инкубации. Переносчиками сыпного тифа являются платяная и головная вши. Инфицирование здорового человека происходит в результате втирания в расчесы фекалий зараженных вшей, в которых находится огромное количество риккетсий. Сыпной тиф, как и эпидемический рекурренс, – социально обусловленное заболевание с осенне-зимней сезонностью.

Биологические свойства. *Морфология. R. prowazekii* – очень полиморфные микроорганизмы. Они имеют форму мелких овальных кокков (0,5 мкм), коротких и длинных палочек (1–3 мкм), а иногда – нитей. Многообразие форм обусловлено неодинаковой скоростью деления риккетсий в разные фазы их развития. Защитных приспособлений и жгутиков у риккетсий нет. Они грамотрицательны, по Здродовскому окрашиваются в красный цвет.

Антигены и токсины. Риккетсии Провацека имеют корпускулярный и растворимый антигены, специфические и групповые с риккетсиями эндемического сыпного

тифа и протеем OX_{19}. Токсин риккетсий нестоек, связан с телом клетки, имеет белковую природу и вызывает образование антитоксина.

Культивирование. Риккетсии Провацека хорошо размножаются в оболочках желточного мешка куриных эмбрионов, в организме вшей, морских свинок и белых мышей. Для изучения процессов внутриклеточного паразитизма используют переживающие культуры клеток.

Лабораторная диагностика. Диагноз сыпного тифа подтверждается обнаружением в крови больных специфических антител с помощью РА, РНГА и РСК. Используя серологические реакции, нужно иметь в виду то, что РА и РНГА позволяют диагностировать первичноактивную форму сыпного тифа, а РСК – не только недавно возникшую, но также давно перенесенную.

Реакция агглютинации с риккетсиями Провацека. Кровь берут из локтевой вены или из пальца на 4–7-е сут от начала заболевания, отделяют сыворотку, разводят ее в объемах 0,2 мл изотоническим раствором натрия хлорида от 1 : 20 до 1 : 1280 и добавляют по 0,2 мл риккетсиозного диагностикума. Контролями служат: 1) сыворотка больного (1 : 20) в объеме 0,2 мл с равным количеством изотонического раствора натрия хлорида; 2) 0,2 мл диагностикума с 0,2 мл изотонического раствора натрия хлорида. Наличие агглютината учитывают в агглютиноскопе после 18–20 ч пребывания штатива в термостате и 2 ч – при комнатной температуре. РА считается положительной при наличии агглютинатов в разведениях сыворотки 1 : 40, 1 : 80.

Следует подчеркнуть, что в сыворотке заболевших первичноактивной формой сыпного тифа обнаруживаются IgM, а у реконвалесцентов и при болезни Брилла – IgG. С учетом этого для дифференциации первичного сыпного тифа от повторного используют 2-меркаптоэтанол, предварительная обработка которым сыворотки больного приводит к разрушению дисульфидных связей lgM и потере их активности, не изменяя в то же время структуры и иммунологической специфичности действия lgG.

Для дифференциации с эндемическим сыпным тифом параллельно ставят РА с *R. typhi*. В случае эндемического сыпного тифа диагностический титр с *R. typhi* в 3–4 раза превосходит титр к риккетсиям Провацека. Диагноз эндемического сыпного тифа подтверждается заражением

морских свинок-самцов внутрибрюшинно кровью больных с последующим нахождением риккетсий в соскобах влагалищных оболочек пораженных яичек.

Реакция непрямой гемагглютинации. Кровь у больных берут на 4–5-е сут болезни. Антиген для этой реакции готовят из риккетсий, полученных в желточном мешке куриного эмбриона и высушенных в вакууме. В день постановки реакции антиген адсорбируют на эритроцитах барана. Сыворотку больного после адсорбции гетерогенных гемагглютининов разводят от 1 : 250 до 1 : 16 000 и более. Реакция считается положительной при наличии гемагглютинации в разведении сыворотки 1 : 250.

Реакция связывания комплемента. Кровь берут на 5–7-е сут болезни. Сыворотку разводят от 1 : 50 до 1 : 1500. В качестве антигенов используют очищенную и высушенную в вакууме взвесь корпускулярных или частично растворенных риккетсий. Связывание комплемента (I фаза) проводится на холоде, при температуре 4 °С в течение 18–20 ч или при 37 °С в течение 1 ч. РСК считают положительной при задержке гемолиза в разведении сыворотки больных 1 : 160. У переболевших сыпным тифом она регистрируется в титре 1 : 10.

Биологический эксперимент. К риккетсиям Провацека восприимчивы морские свинки и белые мыши. Внутрибрюшинное заражение свинок кровью больных приводит к поражению мельчайших прекапиллярных разветвлений артериол. Размножаясь в эндотелии и адвентиции, риккетсии вызывают пролиферативный тромбоз и образование вокруг сосудов узелковых гранулем. Особенно много их выявляется в срезах мозговой ткани, однако животные выживают. Мышей заражают интраназально под легким эфирным наркозом. Сыпнотифозная инфекция у них летальна: проявляется развитием пневмонии с бурным размножением риккетсий в легочной ткани.

Профилактика и лечение. Общая профилактика основана на госпитализации больных и борьбе с бытовой вшивостью населения. Специфическая профилактика проводится по эпидемическим показаниям. Используется – **ж**ивая **к**омбинированная **с**ухая **в**акцина Е – ЖКСВ-Е. Она состоит из живых риккетсий штамма Е, полученного в Испании пассажами на куриных эмбрионах вирулентного штамма Мадрид-1, и растворимого антигена из высокови-

рулентного штамма Брейнль. Добавление второго компонента увеличивает эффективность вакцины и предупреждает поствакцинальные осложнения, которые могут быть связаны с размножением штамма Е в организме привитых. Сыпнотифозную комбинированную вакцину вводят с помощью туберкулинового шприца подкожно в количестве 0,25 мл в область нижнего угла лопатки. Ревакцинацию осуществляют не ранее чем через два года. Для лечения эпидемического сыпного тифа применяют антибиотики тетрациклинового ряда и макролиды.

Возбудитель Ку-лихорадки

Возбудителя Ку-лихорадки *Coxiella burnetii* выделил из крови и мочи больных в 1939 г. Ф. Бернет.

Клиника и эпидемиология. Ку-лихорадка (пневмориккетсиоз, лихорадка квинслендская, австралийский риккетсиоз) – инфекционное заболевание с самой разнообразной клинической симптоматикой. Различают острую, подострую, хроническую и стертую формы. Чаще болезнь начинается остро с резкого повышения температуры и выраженного токсикоза, связанных с размножением коксиелл Бернета в крови и лимфо-макрофагальной системе организма. С первых дней отмечаются головные боли, слабость, потливость, кашель, миалгии, бессонница, гиперемия лица и зева, изредка – аллергическая кожная сыпь. Рано увеличиваются печень и селезенка. У 10–15 % больных встречается бронхопневмония. Длится острая форма Ку-лихорадки 2–3 недели, подострая – около 1 мес., хроническая – несколько месяцев. Течение болезни среднетяжелое.

Ку-лихорадка – зоонозная, трансмиссивная, повсеместно распространенная инфекция. Риккетсии Бернета паразитируют в организме многих видов млекопитающих, птиц и членистоногих. Основным источником инфекции в природе являются грызуны, а в сельскохозяйственных антропургических очагах – крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, грызуны и домашняя птица. Животные выделяют возбудитель с испражнениями, молоком, носоглоточной слизью, а при отеле – вместе с околоплодной жидкостью и плацентой. Ку-лихорадка передается клещами, но заражение людей легко происходит воздушно-пыле-

вым, алиментарным и контактно-бытовым путями. У переболевших возникает прочный и длительный иммунитет.

Биологические свойства коксиелл. Возбудитель Ку-лихорадки – мелкие риккетсии в виде кокков или биполярных коккобактерий размером 0,25–1,5 мкм. Они быстро превращаются в L-формы. Выращиваются в культуре клеток и в желточном мешке куриного эмбриона, где подвергаются диссоциации, утрачивая способность синтезировать полисахаридный антиген I фазы, переходят во II фазу, которая содержит только глубинный антиген. *C. burnetii* – очень устойчивый вид риккетсий, длительно переживающий в окружающей среде. В испражнениях животных данный вид сохраняет жизнеспособность до полугода, в молочных продуктах – 30–125 дней. Находясь в молоке, выдерживает 10-минутное кипячение. Под воздействием 3 %-ного раствора хлорамина и 3–5 %-ного раствора фенола погибает в течение 1–5 мин.

Лабораторная диагностика. Клинически поставленный диагноз Ку-лихорадки подтверждают, исследуя динамику нарастания специфических антител в сыворотке больных в РА, РНГА, РСК. В диагностическом титре 1 : 4 – 1 : 16 эти серологические реакции проявляются с 8–10-го дня болезни. Спустя 3–4 недели титры антител к коксиеллам возрастают в 2–4 раза; в более поздние сроки снижаются, но остаются положительными многие месяцы и годы после выздоровления. В связи с этим указанные реакции необходимо ставить повторно, что дает возможность отдифференцировать свежие случаи Ку-лихорадки от ранее перенесенных. Ввиду низких титров антител сыворотку крови больных Ку-лихорадкой для серологических реакций разводят от 1 : 4 до 1 : 64. В качестве антигена используют убитые коксиеллы. Техника, условия постановки РА, РНГА и РСК и их учет такие же, как при сыпном тифе.

Риккетсиологический метод. Чистую культуру *C. burnetii* можно получить, заражая внутрибрюшинно морских свинок-самцов 3–5 мл крови больных Ку-лихорадкой, а затем экстрактами органов – куриные эмбрионы. Повторно пассируя на них коксиеллы, можно добиться реверсии фильтрующихся коксиелл в исходную форму.

Биологический эксперимент. Данный эксперимент производится на морских свинках-самцах, которых заражают в паренхиму яичка, вводя 0,3–0,5 мл крови боль-

ных. При возникновении у животных орхита, коксиеллы обнаруживают в мезотелии, окрашивая мазки-препараты из пунктатов по Романовскому – Гимзе и Здродовскому.

Кожно-аллергическая проба. Для ее выполнения выпускается специальный корпускулярный аллерген из автоклавированных риккетсий Бернета. Вводят его внутрикожно в объеме 0,1 мл в область предплечья – в положительных случаях через 30–36 ч возникает гиперемия с инфильтратом, диаметром 25 × 20 мм.

Специфическая профилактика и лечение. Для специфической профилактики применяют живую ослабленную вакцину из штамма Грита (вариант М-44), который выращивают в желточных мешках 6–7-дневных куриных эмбрионов. В первую очередь вакцинируют лиц, подвергающихся опасности заражения по профессиональной деятельности и прибывающих для работы в неблагополучные по Ку-лихорадке районы. Прививка одноразовая, накожная. Ревакцинацию проводят через два года. Наилучший этиотропный эффект при лечении Ку-лихорадки оказывают тетрациклины и левомицетин.

Возбудитель североазиатского риккетсиоза

Возбудитель североазиатского риккетсиоза *R. sibirica* идентифицирован как отдельный вид риккетсий группой русских ученых под руководством П.Ф. Здродовского в 1938 г. при изучении эндемических очагов риккетсиозов в Сибири, Забайкалье, на Дальнем Востоке, в Средней Азии и Монголии.

Клиника и эпидемиология. Патологический процесс обусловлен паразитированием *R. sibirica* в эндотелии мелких сосудов, что приводит к расстройству кровообращения и значительным нарушениям со стороны центральной нервной системы. Североазиатский риккетсиоз, как и другие клещевые риккетсиозы, характеризуется острым циклическим течением с интоксикацией, наличием на месте укуса клеща первичного аффекта («черного пятна»), регионального лимфаденита, пятнисто-папулезной сыпи, возникающей вначале на конечностях и затем распространяющейся на туловище, ладони, подошвы, лицо. Течение болезни доброкачественное. Источником инфекции являются полевые мыши, некоторые виды полевок,

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОГЕННЫХ РИККЕТСИЙ
Таксономия (роды, группы, виды возбудителей)
Клиника и эпидемиология риккетсиозов
Биологические свойства
Лабораторная диагностика
Профилактика риккетсиозов
Морфология (полиморфизм, метахромазия)
Токсины и антигены
Резистентность
Культивирования
в клетках
в эмбрионе
в организме
Серологические реакции
РА
РСК
РИФ
РНГА
Биопроба (органная и клеточная локализация риккетсий)

Граф 92

суслики, бурундуки, хомяки, крысы и другие грызуны, а переносчиками – иксодовые клещи. Заболевания возникают в теплое время года.

Биологические особенности возбудителя. Риккетсии полиморфны, но чаще имеют вид палочек размером 1–1,75 × 0,3–0,4 мкм с жгутикоподобными образованиями толщиной 10–12 нм. Выращиваются в куриных эмбрионах, культурах клеток, патогенны для всех лабораторных животных.

Лабораторная диагностика. Диагноз подтверждается постановкой РСК и РНГА с сыворотками больных и антигеном из *R. sibirica*. Положительными серологические реакции становятся к концу второй недели. В первые дни кровью больных внутрибрюшинно заражают морских свинок-самцов. У животных появляется лихорадка и развивается скротальный феномен.

Специфическая профилактика и лечение. Специфическая профилактика не разработана, а общая – основана на соблюдении индивидуальных мер защиты от нападения клещей. Для лечения применяют тетрациклины и макролиды.

ПАТОГЕННЫЕ ХЛАМИДИИ

Зрелые формы хламидий представлены элементарными тельцами. В отличие от близких им риккетсий, хламидии размножаются только в цитоплазме, где, проходя цикл развития, на стадии незрелых ретикулярных телец формируют микроколонии-включения. Зрелые тельца хламидий обладают инфекционными свойствами, имеют поверхностный родоспецифический липополисахаридный антиген, видо- и типоспецифический белок-антиген наружной мембраны. Факторами патогенности хламидий являются компоненты клеточной стенки, экзо- и эндотоксины, блокирующие слияние фагосом с лизосомами фагоцитов. Вызванное ими воспаление приводит к некрозу и кровоизлияниям. Являясь энергетическими паразитами, выращиваются в желточном мешке куриных эмбрионов и культурах клеток при температуре 35–36 °С. Чувствительны к антибиотикам и антисептикам. Слабопатогенны для экспериментальных животных. В природе циркули-

руют среди птиц и многих млекопитающих. Выделяются от членистоногих, рыб, моллюсков.

У человека вызывают несколько нозологических форм заболеваний: орнитоз, трахому, венерическую лимфогранулему, урогенитальный хламидиоз и хламидийную бронхопневмонию.

Возбудитель орнитоза

Возбудитель орнитоза – *Chlamidia psittaci* – был открыт в 1933 г. К. Майером.

Клиника и эпидемиология. Орнитоз – острое зооантропонозное инфекционное заболевание, чаще всего проявляющееся симптоматикой обычной пневмонии. Болезнь начинается с повышения температуры тела до 38–39 °С, озноба, головной и мышечных болей, к которым затем присоединяется конъюнктивит и тонзиллит с болью в горле и сухим кашлем. Пневмония появляется с 5–7-го дня и сопровождается усилением кашля и выделением мокроты с прожилками крови. Почти у всех больных поражается центральная нервная система, иногда наблюдается менингит. При затяжных формах орнитоза возникает пневмосклероз.

Источником инфекции являются птицы (*ornithos*), в частности попугаи (*psittacum*), от которых в 1930 г. С. Бэдсон выделил возбудитель (отсюда название болезни и ее возбудителя). Орнитозом болеют около 150 видов диких и домашних птиц. В естественных условиях люди заражаются в основном от голубей; на птицеводческих фермах – от уток и индеек; в быту – от попугаев и канареек. Птицы распространяют возбудитель орнитоза с фекалиями и отделяемым слизистой оболочки носа. Человек инфицируется воздушно-капельным и пылевым путями. Орнитоз у людей – тупиковая инфекция, т. е. от человека к человеку она не передается, так как, в отличие от птиц, хламидии выделяются от больных в ничтожно малых количествах, и, по-видимому, в организме заболевших возбудитель орнитоза утрачивает вирулентность.

Морфология и цикл развития. Основной формой возбудителя орнитоза является мелкая элементарная частица диаметром 250–350 нм. Она имеет плотную трехслойную оболочку, ДНК-содержащий спиральный нуклеоид,

ДНК-зависимую РНК-полимеразу и ряд других видовых белков. По Романовскому – Гимзе окрашивается в голубой и фиолетовый цвета. Образуются элементарные частицы внутриклеточно в течение 48 ч на основе крупных (50–1000 нм) тонкооболочечных ретикулярных телец, образующих внутриклеточные включения.

Резистентность. Возбудитель орнитоза отличается сравнительно высокой степенью устойчивости. При 4–6 °С сохраняется на объектах внешней среды в течение недели, а при низких температурах может перезимовывать на них. В патологических материалах погибает при кипячении их на протяжении 5 мин. Очень резистентен к дезинфицирующим веществам. В частности, 5 %-ный раствор хлорамина, 3 %-ный раствор лизола, 2 %-ные растворы дихлоргидонтоина и щелочи, марганцевокислый калий (1 : 500), вызывают гибель возбудителя только после 3-часового воздействия.

Лабораторная диагностика. Диагностика орнитоза осуществляется с помощью РСК и внутрикожной аллергической пробы.

Ставят *РСК* по обычной методике с парными сыворотками больных. Одну сыворотку берут спустя 10–15 дней, а другую – через 30–45 сут от начала болезни, используя орнитозный антиген. Диагностическое значение имеет не менее чем двукратное нарастание титра антител во второй сыворотке.

Аллергическую пробу воспроизводят на 4–5-е сут болезни. В качестве аллергена используют инактивированную культуральную жидкость инфицированных куриных фибробластов. Через 18–24 ч на месте ее внутрикожного введения у больных орнитозом возникает покраснение и инфильтрат. Реакция, однако, малоспецифична и может быть положительной при трахоме и других хламидиозах.

Выделение и идентификация. В первые две недели болезни хламидии орнитоза содержатся в крови и мокроте, в более поздние сроки (вплоть до 25 дня) – только в мокроте. С целью их выделения из материалов используется интрацеребральное заражение мышей и инфицирование куриных эмбрионов в желточный мешок с последующим помещением в термостат на 3–4-е сут при температуре 35–36 °С. Если животные не погибают, производят 2–3 слепых пассажа мозговой эмульсии следующей группе животных.

Вызвавшие заболевание у животных хламидии приобретают способность расти на первичной культуре кожно-мышечной ткани эмбриона человека и на перевиваемых культурах клеток. Исследование завершают микроскопическим исследованием мазков-отпечатков из мозга павших животных и желточных мешков эмбрионов. При этом препараты окрашиваются акридиновым оранжевым и по Романовскому – Гимзе. В положительных случаях при люминесцентной микроскопии обнаруживают ярко-зеленые, желто-зеленые и ярко-красные, а в иммерсионном микроскопе – фиолетово-красные и сине-фиолетовые цитоплазматические тельца-включения. Окончательная их природа определяется прямой и непрямой РИФ.

Лечение и профилактика. Наиболее эффективны в лечении орнитоза тетрациклины, в частности доксициклин. В борьбе с орнитозом самое важное значение имеет раннее выявление заболеваемости у птиц, ветеринарный надзор за их импортом и перевозкой. Больных птиц забивают, пух и перо сжигают, мясо уничтожают или подвергают термической обработке в промышленных условиях. В неблагополучных по орнитозу птицеводческих хозяйствах проводится дезинфекция, организуются мероприятия по защите людей, в частности выдается спецодежда и обувь. Вакцинопрофилактика не разработана.

Возбудитель трахомы, венерической лимфогранулемы и урогенитального хламидоза

Таксономия. Возбудитель трахомы – *C. trachomatis*, открытый С. Провацеком и Л. Гальберштедтером (1907), как оказалось спустя много лет, вызывает не одну, а еще две нозологические формы заболевания – венерическую гранулему и урогенитальный хламидиоз. Углубленное изучение его антигенной структуры *C. trachomatis* выявило, что трахому вызывают четыре его серовара (A, B, B_a, C), венерическую гранулему – три (L_1, L_2, L_3), а урогенитальный хламидиоз и пневмонию новорожденных – семь (D, F, G, H, I, J, K).

Клиника и эпидемиология. *Трахома* (*trachis* – шероховатый, *oma* – опухоль) – хроническое заболевание глаз, характеризующееся диффузной инфильтрацией конъ-

юнктивы лимфоидной тканью и образованием на ней трахоматозных зерен, имеющих вид лягушачьей икры, с последующим их распадом и рубцеванием. Последствия трахомы – сращения между конъюнктивой века и глазного яблока; изменения в хрящах верхних век, приводящие к их завороту и росту ресниц в направлении глаз; поражения слезных желез, что приводит к высыханию конъюнктивы; помутнение роговицы вследствие перехода на нее воспалительного процесса и врастания кровеносных сосудов. Наиболее тяжелым осложнением трахомы является трахоматозная язва роговицы, приводящая к слепоте. Трахома встречается повсеместно, но эндемичными районами являются страны Азии и Африки, где ею ежегодно болеют 400–500 млн человек. Основным источником инфекции являются больные активными формами трахомы. Заражение происходит при непосредственном контакте с ними, через одежду, полотенца и другие предметы общего пользования.

Венерическая лимфогранулема – длительно протекающее (месяцы и годы) заболевание, характеризующееся появлением на I стадии в паховой области небольшого пузырька, папулы или эрозии, а на II и III – тяжелым поражением паховых, тазовых и бедренных лимфоузлов. Спаиваясь друг с другом и окружающей тканью, они формируют узлы-бубоны. При их вскрытии в области наружных половых органов и анального отверстия образуются долго не заживающие язвы, а впоследствии – рубцы и папилломатозные разрастания, что может приводить к непроходимости прямой кишки и развитию слоновости.

Урогенитальный хламидиоз по клиническим проявлениям не отличается от поражений мочеполового тракта другой этиологии. Его особенностью является разве только то, что у 50 % больных после начального уретрита последовательно развивается конъюнктивит и артрит. У новорожденных, заразившихся от больных матерей-рожениц, развивается так называемая «бленнорея с включениями».

Морфология. Возбудитель трахомы имеет такую же кокковидную форму, как хламидии орнитоза, и так же, как они, по Романовскому – Гимзе окрашивается.

Патогенность. Чувствительность животных к различным штаммам хламидий трахомы неодинакова, вследствие чего только некоторые из них могут размножаться

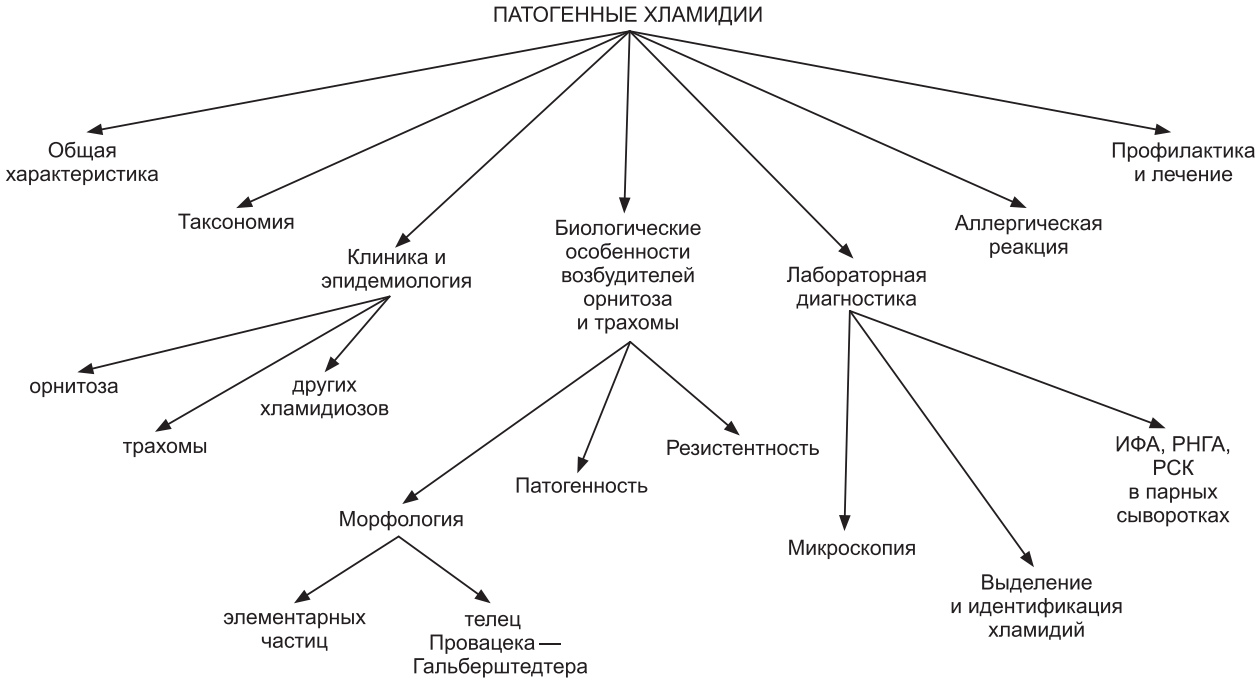
в организме мышей и морских свинок, в частности в легких или мозговой ткани при интраназальном или интрацеребральном инфицировании. Возбудитель выращивается в желточном мешке куриных эмбрионов и культурах клеток.

Лабораторная диагностика. Основана на микроскопическом исследовании соскобов эпителия конъюнктивы глаза и стенок мочеиспускательного канала, отделяемого шеечного канала, содержимого бубонов. Сделанные мазки окрашивают по Романовскому – Гимзе в течение 3–4 ч. В положительных случаях на фоне сине-голубой цитоплазмы пораженного эпителия обнаруживают фиолетовые тельца Провацека – Гальберштедтера в виде округлых или вытянутых образований диаметром около 10 мкм, часто примыкающих к ядру клеток. С целью выявления специфических антигенов мазки обрабатывают антителами, меченными флюорохромами, используя непрямую РИФ. Хламидии трахомы выделяют путем инфицирования куриных эмбрионов и культур клеток человека патологическими материалами, предварительно обработанными в течение нескольких часов антибиотиками. В последующем из них готовят мазки и после окраски микроскопируют на предмет обнаружения в пораженных клетках включений. Для выявления специфических антител в сыворотках больных используют РСК, РНГА и ИФА.

Лечение и профилактика. Лечение трахомы, венерической лимфогранулемы и урогенитального хламидиоза производится тетрациклинами и сульфаниламидными препаратами. Наиболее существенными в системе профилактических мероприятий, исключающих распространение трахомы, являются изоляция больных и их санация, соблюдение правил личной и общественной гигиены.

Возбудитель хламидийной бронхопневмонии

C. pneumoniae отличается от *C. psittaci* и *C. trachomatis* грушевидной формой телец-включений в инфицированном эпителии, а главное, тем, что патогенен только для человека и передается контактным путем. Хламидийная пневмония не имеет характерной для нее симптоматики. Реагенты для ее серологической диагностики отсутствуют. С целью лечения применяется доксициклин.


ПАТОГЕННЫЕ ХЛАМИДИИ
Общая характеристика
Таксономия
Клиника и эпидемиология
орнитоза
трахомы
других хламидиозов
Биологические особенности возбудителей орнитоза и трахомы
Морфология
элементарных частиц
телец Провацека — Гальберштедтера
Патогенность
Резистентность
Лабораторная диагностика
Микроскопия
Выделение и идентификация хламидий
ИФА, РНГА, РСК в парных сыворотках
Аллергическая реакция
Профилактика и лечение

Граф 93

L-ТРАНСФОРМАНТЫ И МИКОПЛАЗМЫ

L-формы бактерий

История открытия. L-формы бактерий открыты в 1935 г. и названы так в честь Института им. Листера. Они представляют собой дефектные по клеточной оболочке и измененные по некоторым биологическим признакам бактерии. Способны к размножению и реверсии в исходные виды микроорганизмов.

Условия образования. L-формы бактерий образуются спонтанно под действием продуктов собственного метаболизма и индуцирующих факторов, блокирующих синтез основных компонентов клеточной стенки (пептидогликана).

Факторы трансформации. Факторами L-трансформации могут быть многие вещества, однако универсальными L-трансформирующими агентами являются бензилпенициллин, его полусинтетические аналоги (мети-, окса-, ампи-, карбенициллин) и цефалоспорины. L-трансформацию вызывают также D-циклосерин, бацитрацин, ванкомицин, ристомицин, избирательно – стрептомицин, тетрациклины, некоторые аминокислоты (фенилаланин, глицин, аргинин), лизоцим. Образование L-форм бактерий возможно под влиянием рентгеновских и ультрафиолетовых лучей, магнитных и электромагнитных полей.

L-трансформация описана почти у всех патогенных видов бактерий. Она встречается также у дрожжей и дрожжеподобных организмов. Чаще наблюдается у грамотрицательных видов (с наибольшей частотой у сальмонелл), реже – у грамположительных. Способность к L-трансформации определяется штаммовыми и даже популяционными различиями. Под воздействием индукторов максимальное количество L-форм бактерий образуется в конце логарифмической фазы развития культуры. Более высокая степень L-трансформации отмечается у бактерий, выделенных от больных. По мере пассирования на искусственных питательных средах она снижается.

Среды (питательные вещества, соли). L-варианты бактерий растут на богатых питательными веществами средах, основу которых составляют триптический перевар мяса сердечной мышцы быка, экстракты мозга и сердца. В качестве дополнительных факторов роста используют

дрожжевой гидролизат и печеночные экстракты. В состав питательных сред включают нормальную лошадиную и кроличью сыворотки. Для предохранения L-форм бактерий от осмотического лизиса к средам прибавляют соответствующие концентрации хлорида натрия, ионов магния или сахарозу. Обычно L-трансформация происходит в условиях полутвердых (1,3 % агара) и полужидких сред (0,3 % агара).

Характеристика микроструктурных элементов и химический состав. Различают несколько L-форм бактерий: 1) крупные сферические тела (1–50 мкм); 2) элементарные тельца, или гранулы (0,6–0,7 мкм), располагающиеся внутри и вне сферических тел; 3) бесструктурные массы, меняющие конфигурацию и размеры; 4) извитые и нитевидные структуры, варьирующие в размерах (от едва видимых до 150 мкм); 5) фильтрующиеся элементы. Микроструктурные элементы размножаются бинарно, у L-форм бактерий утрачиваются мезосомы и, по сравнению с родительскими видами, снижается количество НК и увеличивается содержание липидов.

Колонии. L-формы бактерий образуют два вида колоний. Одни из них мелкие, диаметром 50–100 мкм, нежные, белесые с перламутровым оттенком (тип А), другие – крупные, 0,5–2 мм в диаметре, с нежным кружевным краем и врастающим центром, при длительном хранении приобретают желто-коричневую окраску (тип В).

Микроструктурные элементы колоний типа А полностью лишены клеточной оболочки и поэтому не агглютинируются специфической сывороткой и не лизируются фагом. Вследствие того что они очень редко реверсируют в исходную бактериальную форму, их называют стабильными L-вариантами.

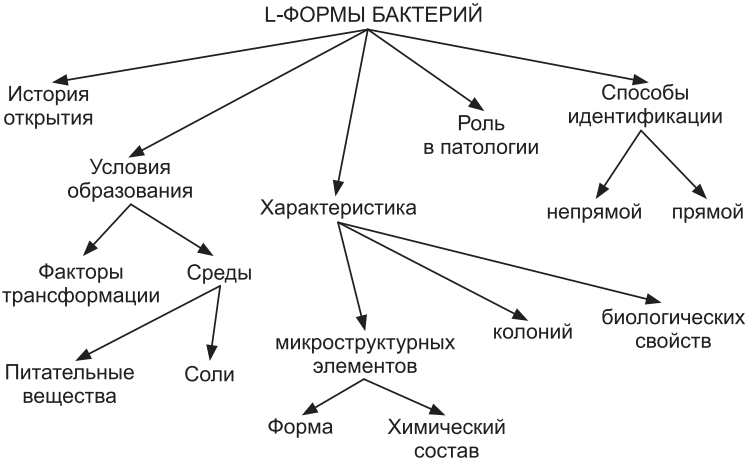
Элементы колоний типа В, сохраняя некоторые компоненты клеточной стенки, агглютинируются антисыворотками, лизируются фагом, отличаются нестабильностью, легко реверсируют в бактериальные формы.

Биологические свойства L-трансформантов. В зависимости от степени утраты клеточной стенки L-формы бактерий подразделяются на солезависимые и соленезависимые. В большинстве случаев при L-трансформации сохраняется видовая специфичность, но резко изменяются биохимические свойства, физиологическая активность и снижается вирулентность. Вместе с тем авирулентные L-формы бактерий

потенциально опасны, так как, длительно сохраняясь в организме, способны реверсировать в вирулентные бактерии исходного вида. Многие L-варианты продуцируют эндо- и экзотоксины и даже приобретают ряд признаков патогенности, которых не было у родительских клеток.

Роль L-трансформантов в патологии. L-формы бактерий выделяются из организма больных при различных патологических процессах. В частности, они обнаруживаются при ревматизме, подостром септическом эндокардите, менингите, гонорее, туберкулезе, дифтерии, поражении мочеполового тракта и многих других инфекциях.

Способы идентификации. Известны два способа определения видовой принадлежности L-трансформантов: 1) прямой, основанный на идентификации вида L-форм путем определения специфических антигенов в серологических реакциях, дифференциации белков электрофорезом в агаровом геле и установлении гомологии ДНК у L-вариантов и их бактериальных форм; 2) непрямой, основанный на реверсии родительских признаков после многократных пересевов L-форм бактерий на оптимальных для них питательных средах при исключении из среды фактора L-трансформации, а в некоторых случаях – при одновременном воздействии на них УФ-лучей, гидроксиламина, акридина оранжевого и других мутагенов.



Граф 94

Возбудители микоплазмозов

Таксономия. Патогенными для человека являются пять видов микоплазм, относящихся к родам *Mycoplasma* и *Ureaplasma* стеринзависимого сем. *Mycoplasmataceae*: *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. genitalium* и *Ureaplasma urealyticum*.

Клинико-эпидемиологические особенности. Патогенные микоплазмы вызывают различные микоплазмозы. Из них наиболее изучена *Mycoplasma pneumoniae*-инфекция, проявляющаяся в виде первичных атипичных пневмоний и острых респираторных заболеваний (риниты, бронхиты, бронхиолиты). *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. genitalium* и *U. urealyticum* поражают мочеполовую систему человека, вызывая уретриты, вагиниты, простатиты, цервициты, сальпингиты, пиелонефриты. Микоплазмы часто находят в синовиальных оболочках при артритах. Наиболее вероятно, что их вызывают «артритогенные» штаммы *M. pneumoniae* и *M. hominis*. Микоплазменные инфекции – остро протекающие болезни, но многие из них склонны к латенции. Обычно они активируются разнообразными стресс-факторами и вирусной инфекцией. Обусловленные микоплазмами инфекционные процессы носят дегенеративно-воспалительный или пролиферативный характер. Эпидемически важно, что микоплазмы отличаются аффинитетом к тканям разных хозяев (би-, полипатогенностью), поэтому может существовать много источников инфекции, механизмов и путей передачи микоплазмозов. Для *Mycoplasma pneumoniae*-инфекции характерны локальные вспышки среди молодых лиц в весенний и осенне-зимний периоды.

Биологические особенности микоплазм. *Морфология.* Патогенные виды микоплазм сходны со стабильными L-вариантами бактерий. Ввиду отсутствия клеточной оболочки и сложного цикла размножения они имеют разнообразную форму и размеры (см. рис. 14). В культурах большинства штаммов преобладают кокковидные и коккобациллярные микроструктуры, но встречаются нитевидные, ветвистые и другие формы. Величина мельчайших зерен (элементарных телец), из которых начинается рост микоплазм, составляет

100–150 нм, у крупных сферических образований – достигает 700–800 нм, а у нитевидных микроструктур – еще больших размеров.

Рис. 108. Колония микоплазм и морфология их микроструктур

Культуральные свойства. Для выращивания микоплазм используются синтетические и полусинтетические питательные среды, по составу сходные с теми, на которых растут L-формы бактерий: триптический перевар сердца и мозга, триптикозосоевый бульон с дрожжевым гидролизатом, аминокислотами, азотистыми основаниями, витаминами и лошадиной сывороткой как источником стеринов.

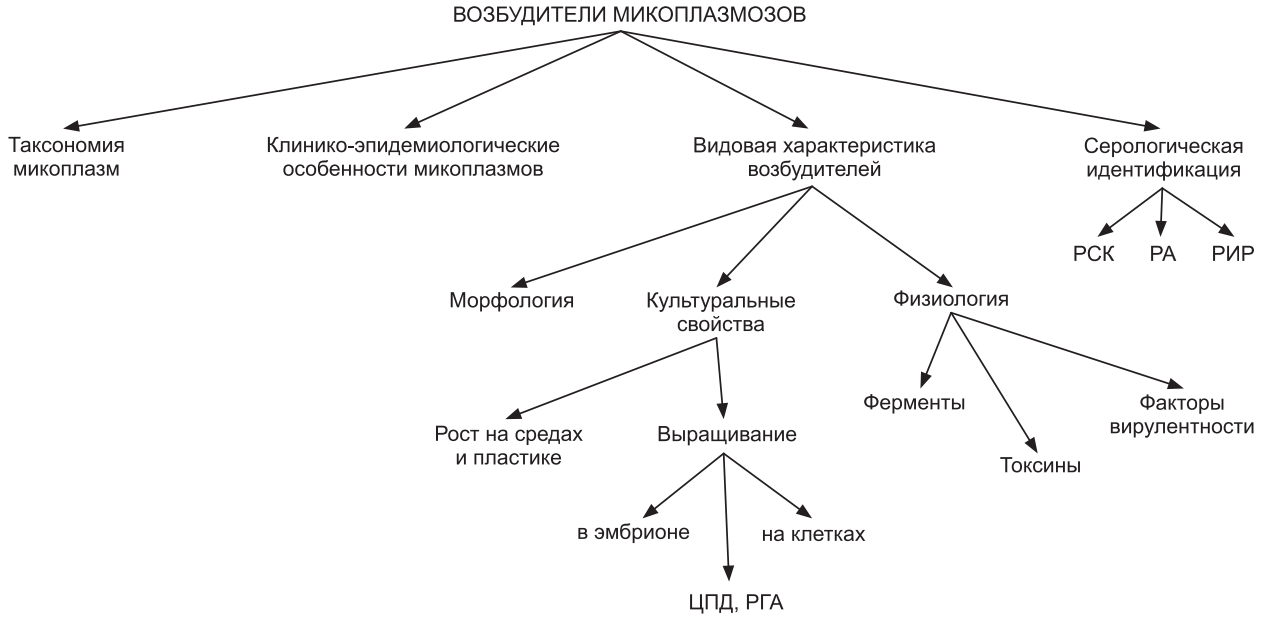
На плотных средах патогенные виды микоплазм формируют точечные или микроскопической величины колонии, по форме и цвету напоминающие яичницу-глазунью (рис. 108). На стекле и пластике, покрытых слоем питательного бульона, образуются неправильной формы колонии с отходящими от них нитями и побегами. Растут они медленно в течение нескольких дней на средах с нейтральным или слабощелочным значением pH, преимущественно в аэробных условиях. Уреаплазмы культивируются при pH 6,5 и в жидких средах вырастают через 6–8 ч. При этом в жидких и полужидких (1–1,3 % агара) питательных средах микоплазмы вызывают нежное диффузное помутнение. Нередко микоплазмы выращивают на куриных эмбрионах и в культурах клеток. Развиваясь внутриклеточно, они оказывают цитопатическое действие и обладают способностью вызывать реакции гемадсорбции и гемагглютинации.

Ферменты. Патогенные микоплазмы обладают различной биохимической активностью. *M. pneumoniae* и *M. fermentans* расщепляют с образованием кислоты глюкозу, фруктозу, маннозу, мальтозу, крахмал и гликоген, остальные виды микоплазм углеводы не разлагают. *M. hominis* вызывает гидролиз аргинина, а *U. urealyticum* расщепляет мочевину.

Факторы патогенности. Возбудителей микоплазменных инфекций подразделяют на патогенные (*M. pneumoniae*), вызывающие экспериментальную инфекцию у морских свинок, хлопковых крыс и хомяков, и условно-патогенные (*M. hominis*, *M. fermentans* и *U. urealyticum*). Вирулентность микоплазм обусловлена наличием у них экзо- и эндотоксинов, адгезинов, гемолизинов, уреазы, аргининдезаминазы, лактатдегидрогеназы и нейраминидазы, обусловливающих адсорбционную способность микоплазм с последующей инвазией мембранных компонентов микоплазм внутрь клеток хозяина, что приводит к их деструкции, развитию иммунопатологических процессов и даже хромосомным аберрациям. Микрокапсулы и поверхностные антигены микоплазм, имеющие групповые антигены с тканевыми, позволяют им длительное время персистировать в организме.

Серологическая идентификация микоплазмозов. В диагностике микоплазменных инфекций широко применяют РСК, реже – РА и РНГА. Разработана высокочувствительная реакция нейтрализации, или ингибирования роста (РИР), основанная на способности антисывороток подавлять рост гомологичных штаммов микоплазм. Результаты РИР учитывают по разнице числа колониеобразующих единиц, выросших на плотных питательных средах, содержащих иммунную и нормальную сыворотки (на жидких – по снижению показателя мутности в пробирке с антимикоплазменной сывороткой). Для ранней диагностики микоплазмозов используют меченные флюорохромами иммунные сыворотки, которыми обрабатывают мазки из носоглоточных и бронхиальных смывов, отделяемого мочеиспускательного канала, влагалища, канала шейки матки.

Этиотропное лечение. Как и безоболочечные L-формы бактерий, утратившие пептидогликан, так и микоплазмы, не имеющие его, устойчивы к пенициллину и цефалоспоринам. Для лечения микоплазмозов применяют антибиотики тетрациклинового ряда, макролиды, нистатин и амфотерицин В, трихомицин и другие полиены, отличающиеся биологическим сродством к мембранным стеринам микоплазм.


ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОПЛАЗМОЗОВ
Таксономия микоплазм
Клинико-эпидемиологические особенности микоплазмов
Видовая характеристика возбудителей
Серологическая идентификация
РСК
РА
РИР
Морфология
Культуральные свойства
Физиология
Рост на средах и пластике
Выращивание
Ферменты
Токсины
Факторы вирулентности
в эмбрионе
на клетках
ЦПД, РГА

Граф 95

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Лабораторная диагностика вирусных инфекций человека и животных основана: 1) *на прямых микроскопических методах* обнаружения вирионов в патологических материалах; 2) *серотипаже* (идентификации) чистых культур вирусов, выделенных из них; 3) *серодиагностике*, т. е. косвенном способе определения вирусспецифических антител в сыворотке крови. При этом: материалы исследуются в иммерсионном, люминесцентном и электронном микроскопах; культуры вирусов получают, инфицируя материалами чувствительные к ним линии клеток, куриные эмбрионы и животных; идентификацию вирусов и определение вирусспецифических антител осуществляют в серологических реакциях.

Патологические материалы и их обработка. Материалами, в которых содержатся вирусы, могут являться: кал, моча, мокрота, носоглоточные смывы, содержимое высыпаний на коже и слизистых оболочках и прочие экскреты; кровь, спинномозговая жидкость, пунктаты плевральной и брюшной полости, суставов, увеличенных лимфатических узлов и другие секреты. От умерших людей и погибших животных берут пораженные вирусами органы и ткани. Здесь нужно отметить, что взятые для исследования материалы при необходимости подвергаются специальной обработке для приготовления мазков и гистологических препаратов, а при инфицировании культур клеток, эмбрионов и животных – измельчаются, отстаиваются, фильтруются, осветляются, концентрируются и обрабатываются антибиотиками, которые уничтожают постороннюю (банальную) микрофлору, в большом количестве находящуюся в экскретах.

Микроскопические способы обнаружения вирусов

Используются два микроскопических способа выявления вирусов в материалах – вирусоскопия в иммерсионном и люминесцентном микроскопах и электронная микроскопия.

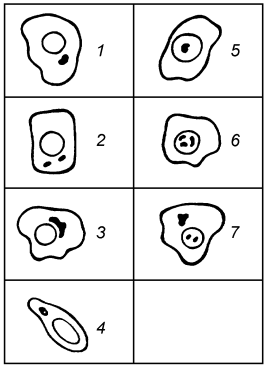


Рис. 109. Схематическое изображение вирусных включений:
1 – тельца Гуарниери в клетке, зараженной вирусом оспы; *2* – включения в цилиндрическом эпителии, зараженном вирусом гриппа; *3* – включения в эпителии, зараженном реовирусом; *4* – тельца Бабеша – Негри в нейроцитах; *5*, *6* – внутриядерные включения в эпителии, зараженном герпес- и аденовирусом; *7* – внутриядерные и цитоплазматические включения в эпителии, зараженном вирусом кори

Вирусоскопия. В иммерсионном световом микроскопе обнаруживаются самые крупные элементарные тельца. Так, при натуральной оспе в жидкости кожных пузырьков находят внеклеточные вирионы Пашена, а в таких же везикулах при ветряной оспе – вирионы Арагао.

Легче при вирусных инфекциях обнаружить внутриклеточные включения. В большинстве своем они представлены скоплениями вирусов вперемежку с реактивными клеточными продуктами и в зависимости от места репликации вирионов находятся в цитоплазме или ядре клеток-хозяев. В частности, цитоплазматическими включениями являются тельца Гуарниери в эпителиальных клетках, скопления реовирусов и вирусов гриппа в них, тельца Бабеша – Негри – в нейроцитах, а ядерными включениями – адено-, папова- и герпесвирусные, правда, состоящие из клеточного материала. Изредка в одной и той же клетке вирусы, например коревой, формируют цитоплазматические и ядерные включения (рис. 109).

По форме, размерам, структуре, отношению к красителям все эти и другие вирусные включения строго специфичны. Например, тельца Гуарниери имеют округлую, серповидную или амебоидную форму с диаметром 1 – 10 мкм, тельца Бабеша – Негри – овальные или эллипсоидные, достигающие 20 мкм, включения реовирусов – серповидные, наполовину охватывающие клеточное ядро, коревые включения – в виде почкующихся мелких дрожжей.

При этом для обнаружения телец Пашена и Арагао мазки подвергают «серебрению» по методу Морозова или обрабатывают вируснейтрализующими антителами, меченными флюорохромами.

Проводя «серебрение», заранее готовят три раствора: № 1 – уксусно-формалиновый фиксатор (100 мл дистиллированной воды + 1 мл ледяной уксусной кислоты + 2 мл 40 %-ного формалина); № 2 – танин-феноловая протрава (10 мл той же воды + 5 г танина + 1 мл жидкого фенола); № 3 – адсорбент (свежеприготовленный 5 %-ный раствор нитрата серебра с добавлением нескольких капель аммиака, вызывающего легкую опалесценцию). «Серебрение» мазков выполняется в три этапа с промыванием после каждого из них водопроводной водой: мазки фиксируются раствором № 1 в течение 1 мин; протравливаются раствором № 2 с подогревом до отхождения паров; «серебрятся» раствором № 3 с подогревом до появления темно-коричневого цвета.

В высушенных мазках под иммерсионным микроскопом обнаруживают грозди кокковидных вирионов коричнево-черного цвета.

В препаратах, обработанных мечеными антителами (см. «Реакцию иммунофлюоресценции»), при люминесцентной микроскопии обнаруживают вне- и внутриклеточно расположенные вирионы в виде светящихся точек и конгломератов.

Внутриклеточные вирусные включения окрашивают по Туревичу, Муромцеву и Романовскому – Гимзе.

Способ окраски телец Бабеша – Негри и Гуарниери по Туревичу. Препараты из срезов гиппокампа при бешенстве или роговицы зараженного кролика при оспе в течение 2 мин окрашивают вначале железным гематоксилином, вслед за чем промывают водой. Докрашивают 1 %-ным водным раствором кислого фуксина 1 мин и снова промывают водой. На последнем этапе препараты обрабатывают смесью из равных частей насыщенного водного раствора пикриновой кислоты и 95 %-ного спирта, быстро промывают, высушивают и на несколько секунд погружают в абсолютный спирт, вновь высушивают и микроскопируют.

Способ окраски телец Бабеша – Негри по Муромцеву. Из растертых в ступке кусочков гиппокампа делают обычные мазки. Фиксируют их метиловым спиртом или ацетоном в течение 1–2 ч, промывают водой; затем 5 – 10 мин окрашивают разведенным 1 : 50 красителем Мансона (2 г метиленового синего, 5 г буры и 100 мл дистиллированной воды), после чего переносят в 10 %-ный раствор танина до получения бледно-голубой окраски, промывают водой, высушивают; несколько секунд обрабатывают абсолютным спиртом, высушивают и микроскопируют.

Окраска мазков по Романовскому – Гимзе осуществляется смесью азур-эозин-метиленового синего после их фиксации в метиловом (5 мин), этиловом (10–15 мин) спиртах или в смеси Никифорова (10–15 мин). Окрашивание длится от 20–30 мин до 1 ч.

Тельца Бабеша – Негри по Туревичу окрашиваются в вишнево-красный цвет с черными зернами внутри, а цитоплазма нервных клеток, в которых они находятся – в светло-желтый; по Муромцеву – в бледно-фиолетовый, а цитоплазма клеток – в синий. Тельца Гуарниери, окрашенные по Туревичу, приобретают темно-синий цвет и тоже хорошо контрастируют в более светлой цитоплазме эпителия.

По Романовскому – Гимзе ядра клеток окрашиваются в пурпурно-красный цвет, цитоплазма – в синий, а вирусные включения – в разные цвета и оттенки: тельца Бабеша – Негри, в частности, – в красный, включения вируса гриппа – в сине-фиолетовый, тельца Гуарниери – в пурпурно-красный, а реовирусов – в фиолетовый.

Электронная микроскопия. В электронном микроскопе вирусы идентифицируют по тонким деталям их ультраструктуры. С этой целью получают микрофотографии. Для этого материал, содержащий вирусы, наносят на электронно-микроскопические сеточки, покрытые перлодиевой пленкой, и вирионы контрастируют 1 %-ным уранилацетатом или фосфорно-вольфрамовым натрием. Покрывая вирусы, эти вещества создают вокруг них темный фон, а проникая вглубь между компонентами вирионов, способствуют выявлению деталей их структуры. Наконец, конфигурация вирионов отчетливо отпечатывается на матрицах-репликах высохших пленок пластмассы, раствором которых они заливаются. Симметрию и распределение белковых субъединиц в блоке-ансамбле вирусных кристаллов изучают с помощью рентгеноструктурного анализа.

Выделение вирусов из биологических материалов

Чаще всего вирусы выделяют из патологических материалов в культурах клеток и куриных эмбрионах, реже их культивируют в организме экспериментальных животных.

Выделение вирусов в культурах клеток. В большинстве случаев вирусы человека и животных выделяют на

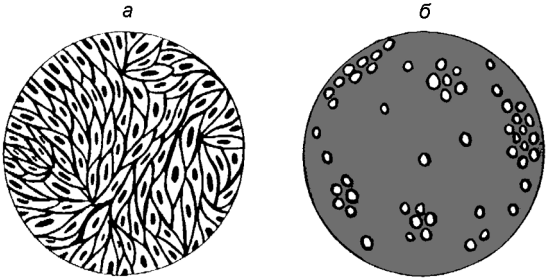


Рис. 110. Культура клеток:
а – нормальный рост; *б* – ЦПД вируса

первичных культурах почек эмбрионов человека и обезьян или же на перевиваемых культурах клеток HeLa, Hep-2, KB, Vero, FL. При этом исследуемым материалом заражают лишь те из них, в которых под малым увеличением микроскопа наблюдается хороший рост клеток. Отсосав питательную среду, в каждую пробирку или флакон вносят по 0,1–0,2 мл материала, предварительно обработанного антибиотиками. После 30–60-минутного контакта материала с клетками его удаляют, покрывают свежей питательной средой и помещают в ультратермостат.

О размножении вирусов в монослое судят по цитопатическому действию (рис. 110), выражающемуся в округлении и сморщивании клеток (пикорнавирусы), нарастающей деструкции пласта (герпесвирусы), нередко с первоначальной пролиферацией клеток (поксвирусы). Пикорнавирусы, герпесвирусы, многие тогавирусы, буньявирусы, разрушая монослой, образуют под агаровым покрытием бляшки («стерильные пятна»), каждая из которых представляет собой обособленную колонию вируса. При размножении некоторых вирусов образуются многоядерные клетки (парамиксовирусы, герпесвирусы). Целый ряд вирусов в цитоплазме и ядре формируют внутриклеточные включения округлой формы. Онкогенные вирусы вызывают трансформацию нормальных клеток в злокачественные, чему нередко предшествуют хромосомные изменения в ядрах монослоя. Пораженные инфекционными вирусами клетки обычно содержат огромное количество незрелых вирионов и их антигенов, которые выявляют с помощью флюоресцирующих антител. Если вирусы име-

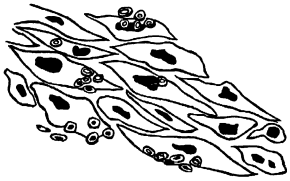


Рис. 111. Реакция гемадсорбции

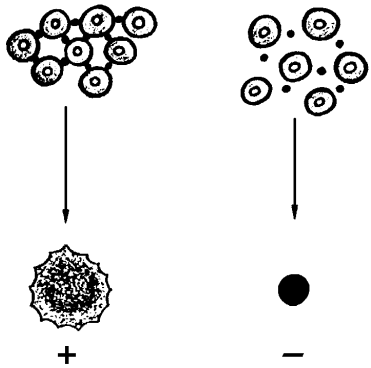


Рис. 112. Реакция гемагглютинации:
«+» – положительная; «–» – отрицательная

ют большие размеры и, размножившись, отпочковываются от клеток, то в содержимом клеточного пласта под иммерсионным микроскопом, как уже отмечалось, удается обнаружить зрелые вирусные частицы.

Размножение вирусов, не обладающих цитопатическим действием (ЦПД), можно установить с помощью реакции гемадсорбции, проявляющейся скучиванием добавленных эритроцитов на инфицированных клетках (рис. 111) вследствие наличия у многих вирусов гемагглютининов (миксовирусы, тогавирусы). Гемагглютинацию можно увидеть и невооруженным глазом на предметном стекле, прибавив к капле культуральной жидкости соответствующие эритроциты (рис. 112). Например, миксовирусы гемагглютинируют эритроциты 0 группы человека, а 60 % тогавирусов – эритроциты гусей. Ряд вирусов можно выявить по феномену интерференции, т. е. способности подавлять ЦПД другого вируса (вирусы лейкоза птиц интерферируют с вирусом саркомы Рауса). При этом, правда, надо исключить явление аутоинтерференции.

Выделение вирусов в курином эмбрионе. Для выделения вирусов из материалов используются, главным образом, 7–11-дневные эмбрионы белых кур. Заражение производят на хорионаллантоисную оболочку (ХАО), в аллантоисную и амниотическую полости, желточный мешок и тело

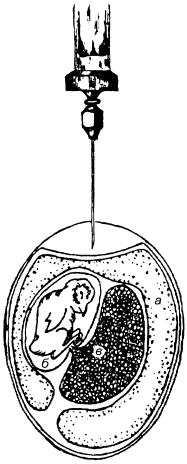


Рис. 113. Способы заражения куриного эмбриона: *а* – аллантоисная полость; *б* – амнион; *в* – желточный мешок

зародыша (рис. 113). При этом выбор пути инфицирования определяется специфическими свойствами вирусов.

Перед заражением яйцо помещают в овоскоп и, установив жизнеспособность эмбриона и границы воздушного мешка, спиртом и йодом обрабатывают над ним скорлупу. Наиболее распространен путь введения материала на ХАО. Для этого сбоку от воздушного мешка ножницами снимают скорлупу и слегка надрывают скорлупную оболочку. Вследствие давления воздуха ХАО западает, и на нее шприцем наносят 0,1–0,2 мл исследуемого материала. Прокалывая ХАО и погружая иглу на 1–2 мм, тем же количеством материала заражают *аллантоисную полость*. Для введения материала в *амниотическую полость* сложенными браншами пинцета осторожно прокалывают хорионаллантоис, захватывают амниотическую оболочку, приподнимают и после введения в ее полость 0,05–0,10 мл материала, опускают. Отверстие в скорлупе закрывают стерильным покровным стеклом или стеклянным колпачком и заливают парафином.

С меньшей долей вероятности в амниотическую полость удается ввести вирусный материал через прокол в центре тупого конца яйца, ориентируясь на местоположение эмбриона по его тени на скорлупе. Таким путем относительно легко удается заразить эмбрион в *желточный мешок*, поместив яйцо на подставку тупым конусом вправо и погружая иглу шприца на 3–4 см вглубь. Попав в желточный мешок, в него вводят 0,2–1,0 мл материала. Отверстие в скорлупе заливают каплей парафина.

Зараженные эмбрионы помещают в термостат, в котором поддерживается определенная влажность. Время инкубации эмбрионов и температурный режим зависят от свойств исследуемого вируса. Так, ортомиксовирусы необ-

ходимо культивировать при температуре 33 °С, возбудитель натуральной оспы – не выше 38,5 °С и, как исключение, вирус вакцины – при 40 °С. Размножаясь в курином эмбрионе, вирусы на ХАО вызывают появление белесоватых куполообразных бляшек (поксвирусы), задержку развития и его гибель (тогавирусы), накопление в эмбриональных жидкостях гемагглютининов и других антигенов (орто- и некоторые парамиксовирусы).

При *вскрытии эмбрионов* материал забирают в следующем порядке: 1) отсасывают аллантоисную, затем амниотическую жидкость; 2) разрезают ХАО и содержимое всего яйца выливают в чашку Петри; 3) отделяют амниотическую оболочку, эмбрион и желточный мешок, захватив его за пупочный канатик; 4) последней извлекают ХАО. При этом пытаются обнаружить макроскопические изменения на хорионаллантоисной и амниотической оболочках.

Выделение вирусов в организме животных. В организме животных культивируют те вирусы, которые плохо или совсем не размножаются в культурах клеток и курином эмбрионе. При этом, выделяя коксаки-, тога- и аренавирусы, материалом предпочтительнее заражать мышей-сосунков, а в случаях, требующих выделения онкогенных вирусов, – сосунков белых крыс и сирийских хомяков.

Количественный выход (титр накопления) вирусов в организме животных во многом зависит от их тропизма и, следовательно, от путей инфицирования, определяющих возникновение и развитие вирусной инфекции. Поэтому, выделяя нейротропные вирусы (рабдо-, тога-, буньявирусы), патологический материал надо вводить под твердую мозговую оболочку или в вещество головного и спинного мозга. Респираторные вирусы выделяют путем интраназального заражения наркотизированных белых мышей (ортомиксовирусы), инокуляцией содержимого носоглотки в слизистую оболочку защечных мешков сирийских хомяков (аденовирусы), введением содержимого везикул в скарифицированную кожу и конъюнктиву глаза кроликов и морских свинок (покс- и герпесвирусы).

Отдельные вирусы вызывают у животных развитие характерных параличей (лисса- и тогавирусы); специфические патогистологические изменения в тканях, например в межлопаточном буром жире (пикорна- и тогавирусы); образование папул и везикул на коже и коньюнктиве глаза (поксвирусы) и другие проявления.

Изучив патогенные эффекты вирусов в клеточном монослое, курином эмбрионе и организме животного, выделенный вирус на заключительном этапе вирусологического исследования идентифицируют в серологических реакциях.

Серотипаж вирусов

В серотипаже вирусов используют многие серологические реакции: РИФ, ИФА, РИА, иммуноферритиновую, РСК, РПГ, РНГП, но чаще всего реакцию нейтрализации (РН) вирусов, реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) и реакцию торможения гемадсорбции (РТГадс), являющихся модификациями РН.

РН и ее модификации. РН вирусов воспроизводится в трех вариантах: на культурах клеток; куриных эмбрионах; животных (рис. 114). В любом из них при ее постановке взвеси инфицированных вирусом клеток, жидкостей различных полостей куриного эмбриона или суспензий пораженных тканей животных смешивают с различными разведениями диагностической противовирусной сыворотки или, наоборот, разные разведения вируса добавляют к цельной неразведенной иммунной сыворотке. Смеси инкубируют в термостате в течение 1–2 ч при температуре 37 °С или помещают в холодильник на 18 ч при

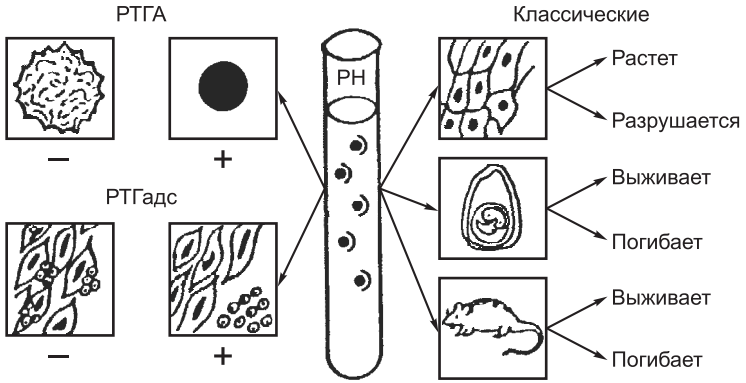


Рис. 114. Реакция нейтрализации для идентификации вирусов и противовирусных антител:
«+» – положительная; «–» – отрицательная

температуре 4 °С, и вслед за этим заражают монослой клеток, куриные эмбрионы и животных. О нейтрализующей силе противовирусных антител на клеточном пласте судят по его нормальному развитию в течение 10–15 сут, а на куриных эмбрионах и животных – по выживанию и отсутствию изменений на ХАО (2–3 сут) и в тканях животных (5–7 сут).

В тех случаях, когда идентифицируются вирусы, вызывающие обширную деструкцию клеточного пласта, РН ставят под агаровым покрытием. Для этого из флакона с монослойной культурой клеток удаляют питательную среду и заражают ее взвесью вируса. Через 30–60 мин после адсорбции вируса на клетках монослой покрывают 3 %-ным расплавленным агаром, содержащим лошадиную сыворотку, солевые добавки и как индикатор – нейтральный красный. Зараженную вирусом культуру клеток помещают в термостат. В контрольных флаконах при нормальном росте клеток в результате выделения ими метаболитов происходит подкисление среды и монослой равномерно окрашивается индикатором в розовый цвет. В опытных флаконах монослой пестрит – розовые участки клеток, не пораженные вирусами, перемежаются с мелкими беловатыми островками-бляшками различной конфигурации, специфичными для того или иного вируса.

Идентификация вирусов по их цитопатическому и патогенному действию в РН требует длительного времени, немалых усилий и умения. Гораздо легче видовую принадлежность вирусов установить в РТГА или РТГадс, представляющих собой РН антисыворотками вирусных гемагглютининов.

РТГА. Большинство вирусов обладают способностью агглютинировать определенные эритроциты. 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 связи с этим для их обнаружения в материале больных или культурах клеток, эмбрионов и животных ставят реакцию гемагглютинации (РГА). Для этого в лунках плексигласовых планшет готовят двукратно возрастающие разведения вируссодержащих жидкостей в объеме 0,5 мл, добав-

ляя к ним по 0,25 мл 2 %-ной взвеси эритроцитов, трижды отмытых изотоническим раствором натрия хлорида. Для контроля спонтанной агглютинации 0,5 мл эритроцитов смешивают с равным объемом изотонического раствора натрия хлорида. Смеси инкубируют в термостате при температуре 37 °С или в холодильнике при 4 °С, но можно оставить при комнатной температуре. Результаты РГА учитывают по характеру агглютинации эритроцитов через 30–60 мин, когда они полностью осаждаются в центре контрольной лунки, образуя плотный осадок в виде «пуговицы». Положительная реакция обозначается плюсами: «++++» – звездчатой формы осадок с фестончатыми краями в виде «зонтика», покрывающего всю лунку; «+++» – осадок с просветами; «++» – осадок с большими просветами; «+» – хлопьевидный осадок, окруженный зоной скомкованных эритроцитов; «–» – такой же резко очерченный осадок эритроцитов, как и в контроле. При помощи РГА определяют также титр вируса или наибольшее его разведение, при котором еще наблюдается агглютинация эритроцитов, что соответствует одной гемагглютинирующей единице.

Являясь группоспецифической, РГА не дает возможности определить видовую принадлежность вирусов. Их идентифицируют с помощью РТГА. Для ее постановки используют диагностические противовирусные сыворотки, которые в двукратно снижающихся концентрациях разводят в изотоническом растворе натрия хлорида и разливают по 0,25 мл. К каждому их разведению добавляют равное количество вируссодержащей жидкости, при типировании вируса гриппа, например, в четырехкратном титре (т. е. 4 гемагглютинирующие единицы). Контролем является взвесь вируса в изотоническом растворе натрия хлорида. Планшеты со смесью сывороток и вируса выдерживают в термостате 30 мин или при комнатной температуре 2 ч, затем в каждую из них добавляют по 0,5 мл 1 %-ной взвеси эритроцитов. Спустя 30–45 мин определяют титр вируснейтрализующей сыворотки, т. е. максимальное ее разведение, вызвавшее задержку агглютинации эритроцитов.

РТГадс. По своей сути РТГадс является аналогом РТГА. Производится она на двух зараженных вирусами монослойных культурах клеток, одна из которых предварительно обрабатывается диагностической сывороткой, нейтрализующей вирусные гемагглютинины. В тот и дру-

гой монослой при ее постановке вводят 0,2 мл 0,4 %-ной взвеси отмытых изотоническим раствором натрия хлорида стерильных эритроцитов, чувствительных к гемагглютинирующему действию предполагаемого вируса. Пробирки ставят в наклонном положении на 30 мин в термостат при температуре 37 °С (или оставляют при комнатной температуре), затем помещают во вращающийся барабан для удаления неадсорбированных эритроцитов. Учитывают РТГадс, используя малое увеличение микроскопа. Ее считают положительной, если в опытном монослое, обработанном антисывороткой, отсутствует реакция гемадсорбции, а на интактном – отмечается диффузная или локальная реакция адсорбции эритроцитов в виде небольших скоплений, гроздей и розеток.

Серодиагностика вирусных инфекций

Прибегая к ней, учитывают, что антитела по отношению к вирусам вырабатываются медленно. В связи с этим исследуется динамика нарастания титра антител, для чего серологические реакции ставят с сыворотками, одна из которых берется от больного в разгаре вирусной инфекции, скажем, спустя 5–7 сут от начала, а другая (другие) – через 2–3–4 недели, когда титр антител у детей закономерно удваивается, а у взрослых – достигает четырехкратного увеличения. Основанная на этой методологии серодиагностика по точности не уступает серотипажу, более проста по технике выполнения, но природа вирусной инфекции с ее помощью устанавливается чаще всего уже после перенесенного заболевания. И тем не менее ретроспективный, или запоздалый, диагноз имеет большую ценность для практического врача в тех случаях, когда вслед за перенесенной вирусной инфекцией возникают осложнения, а для эпидемиолога – при разработке противоэпидемических мер, исключающих рассеивание инфекции. Серодиагностика осуществляется с помощью тех же реакций, которые применяются для серотипажа вирусов; в качестве антигена используются производственные вирусные диагностикумы, взвеси вирусных культур и даже сыворотки выздоравливающих больных, содержащие вирусные антигены.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ
Материалы и их обработка
Микроскопические способы
Выделение вирусов
Серотипаж в реакциях
Серодиагностика
Вирусоскопия
Электронная микроскопия
в культурах клеток *in vitro*
в организмах
элементарных телец («серебрение» по Морозову)
вирусных включений (окраски по Туревичу, Муромцеву, Гимзе)
на курином эмбрионе
животных
нейтрализации
с мечеными Ат
классических
а) на культурах клеток;
б) курином эмбрионе;
в) в организме животных
РТГА
РТГадс
РИФ
ИЭМ
ИФА
РИА
РСК
РПГ
РНГА

Граф 96

ВОЗБУДИТЕЛИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ. АНТРОПОНОЗЫ

Вирус иммунодефицита человека

Таксономия. Вирус иммунодефицита человека выделили в 1983 г. от больных лимфоаденопатией Л. Монтанье и Ф. Барре-Синусси, назвав его в соответствии с этим LAV (*lymphoadenopathy associated virus*), т. е. вирусом, ассоциированным с лимфоаденопатией. Год спустя независимо от него Р. Галло выделил этот же вирус от больных с синдромом клеточного лейкоза, обозначив его HTLV-III (*human t-lymphotropic virus*), т. е. вирусом человека третьего типа с тропизмом к Т-лимфоцитам. После установления их идентичности вирус стали называть HIV (*human immunodeficiency virus*) или ВИЧ и отнесли его в подсемейство *Lentivirinae* сем. *Retroviridae*. Основными антигенами ВИЧ являются группо- и видоспецифические сердцевинные белки p24 и типоспецифические оболочечные гликопротеиды gp41 и gp120, по структуре которых различают два типа вируса: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, циркулирующего преимущественно в Западной Африке и отличающегося сравнительно низкой вирулентностью.

Клинико-эпидемиологические особенности ВИЧ-инфекции. В основе ВИЧ-инфекции (вирусиммунодефицитной инфекции человека) лежит дефицит Т-клеточного иммунитета и связанное с ним развитие синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа), вызываемого редко встречаемой условно-патогенной и сапрофитной (оппортунистической) микрофлорой, или возникновение злокачественных опухолей. Подозрительными на СПИД проявлениями являются пневмония (65 %), хроническая диарея (15–20 %) и длительная ремиттирующая лихорадка, не поддающиеся лечению химиотерапевтическими препаратами; прогрессирующая потеря массы тела (на 10–15 % за 1–2 мес.), лимфопения, саркома Капоши у лиц моложе 60 лет (30 %); лимфома головного мозга (30 %) и ангиобластическая лимфоаденопатия. При этом верхние дыхательные пути и легкие чаще всего поражаются *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus fumigatus*, *Nocardia asteroides*, *Legionella pneumophilla*, атипичными микобактериями (чаще *Mycobacterium avium intracellulare*), бактериями

рода *Acinetobacter*, цитомегаловирусом, вирусом герпеса типа 4 (Эпстайна – Барр), паповавирусами, токсоплазмами и некоторыми другими видами микробов, а кишечник – дрожжеподобными грибками рода *Candida*, гистоплазмами, аспергиллами, паразитическими нематодами *Strongyloides stercoralis*.

Касаясь эпидемиологии ВИЧ-инфекции, необходимо прежде всего отметить, что первые случаи пневмоцистной пневмонии у взрослых были диагностированы в 1978 г. среди португальских таксистов, длительное время работавших в Анголе, а затем в 1979 г. – в Америке у 5 иммигрантов-гомосексуалистов из Гаити, о чем в июне 1981 г. сообщил Центр по контролю заболеваний США. Всего лишь за 25 лет СПИД приобрел невиданный по охвату эпидемическим процессом характер. По неполным данным, вирусом иммунодефицита человека сейчас заражено более 47 млн людей, из них около 1,5 млн – дети. Умерло от ВИЧ-инфекции приблизительно 5 млн человек. Широкому распространению ВИЧ-инфекции способствуют ослабление этических запретов и норм поведения, уравнение в правах гетеро- и гомосексуальных контактов, превращение эротики в сферу коммерческих услуг. ВИЧ передается здоровым людям от носителей и больных половым путем; больным и обследуемым – через иглы, шприцы, медицинский инструментарий и аппаратуру многоразового пользования; новорожденным – вертикальным путем – от ВИЧ-инфицированной матери. Основными группами риска являются проститутки, наркоманы, пользующиеся наркотиками для парентерального употребления, дантисты, медицинские сестры, выполняющие инъекции и берущие кровь для анализа, хирурги и патологоанатомы, близкий им по профессии персонал больниц и поликлиник. Инкубационный период ВИЧ-инфекции варьирует от нескольких месяцев до 5–10 лет. Заболевание развивается исподволь и у нелеченных больных с синдромом иммунодефицита заканчивается смертельным исходом в течение 1–2 лет.

Ультраструктура ВИЧ и его клетки-мишени. Зрелый вирион имеет округлую форму и диаметр 120–130 нм (рис. 115). В его сердцевине, которую формируют белки p18 и p24, находится сдавленный с боков латеральными тельцами вытянутый нуклеоид с наличием в нем связан-

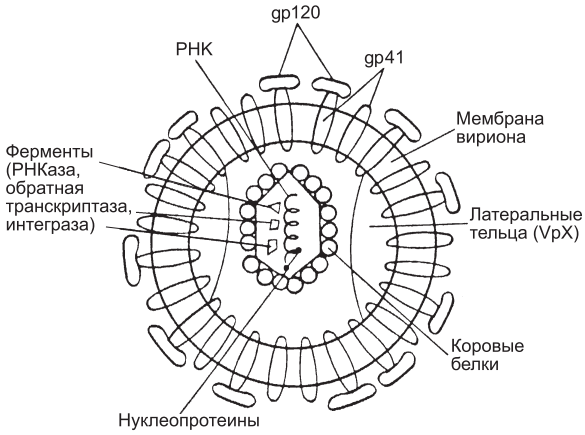


Рис. 115. Ультраструктура ВИЧ

ных внутренними белками (p7, p9) двух молекул вирусной +РНК, обратной транскриптазы, интегразы и РНКазы, упакованных в оболочку из протеина p24. Суперкапсид вируса отделен от капсида матричным p17. Он представлен липопротеиновым слоем, в котором содержатся грибовидные выросты. Внутренняя их часть, прилежащая к мембране, и трансмембранная – образованы белком gp41, обеспечивающим слияние вируса с клеточной мембраной, а выступающая над оболочкой – белком gp120 с локализованными в нем сайтами распознавания клеточных мембранных молекул CD4, являющихся основным проводником ВИЧ внутрь клетки.

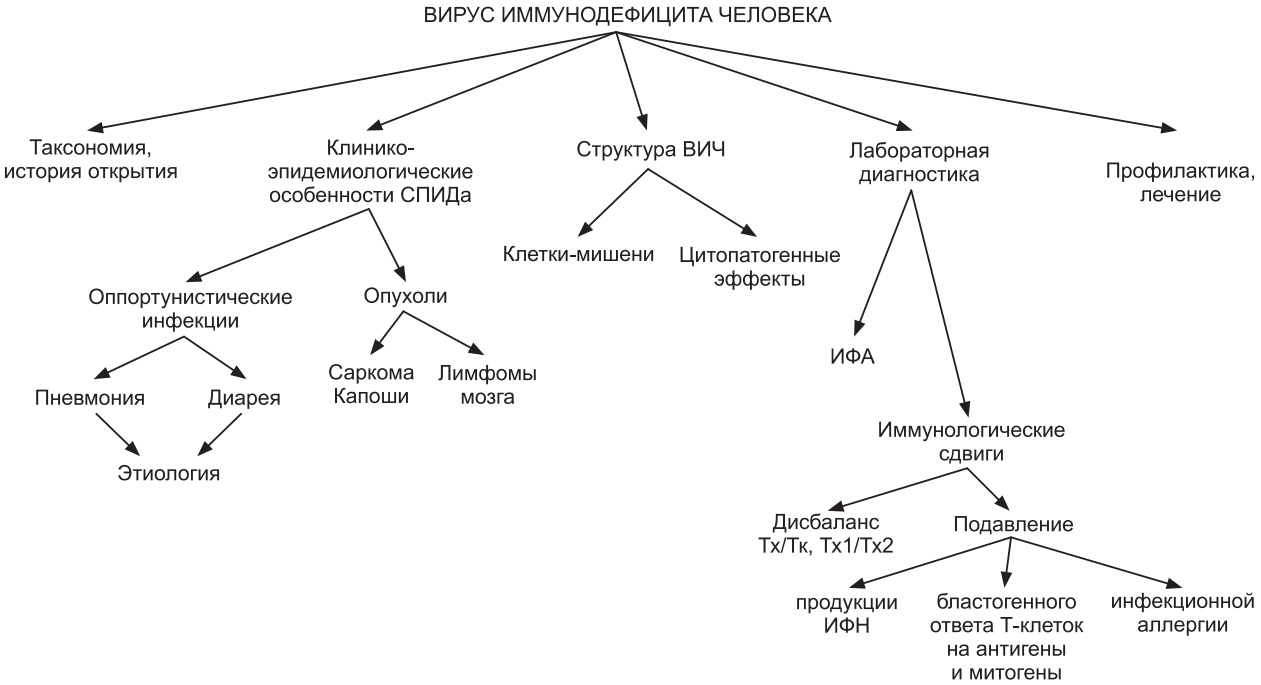
Главными мишенями для вируса являются $CD4^+$-Т-хелперы, а также незрелые и периферические Т-клетки, экспрессирующие одновременно CD4- и CD8-рецепторы. Вирусом легко инфицируются также дендритные клетки и макрофаги, несущие на поверхности небольшое число молекул CD4, но содержащие значительное их количество в цитоплазме. Мишенями для ВИЧ оказались также эозинофилы, мегакариоциты, ряд нервных, некоторые эпителиальные, эндотелиальные клетки и сперматозоиды, содержащие если не молекулу CD4, то ее варианты. Получены также данные, что проводниками вирусов в клетку могут являться не только CD4, но и другие мембранные структуры как дополнительные корецепторы. В частности, для

штаммов ВИЧ-1, пассируемых на Т-клеточных линиях, проводником вируса оказался белок фузин – рецептор α-хемокинов CXCR4, а для штаммов, репродуцируемых на макрофагальных линиях, – CCR5, являющийся рецептором β-хемокинов. Вспомогательную роль в проникновении ВИЧ в макрофаги играет также β2-интегрин LFA-1.

Цитопатогенные эффекты ВИЧ. Основным механизмом цитопатогенного действия ВИЧ является повреждение им мембран клеток в результате бурного размножения. За 1 с, в частности, через мембрану почкуется более 25 тыс. вирусных частиц, что заканчивается некрозом клеток. Гибель зараженных вирусом клеток во многих случаях является следствием слияния их оболочек и образования синцития, что обусловливает прямой путь передачи ВИЧ от одной клетки к другой. Значительная их часть, в том числе неинфицированных, гибнет по механизму апоптоза, т. е. программировано вследствие поступления «команды» извне или ядра при взаимодействии gp120 с молекулами CD4.

Изменение иммунологических показателей при ВИЧ-инфекции. На высоте заболевания резко снижается содержание $CD4^+$-Т-хелперов; соотношение $CD4^+/CD8^+$ становится равным 0,3 и менее; регистрируется общая лимфопения с уменьшением содержания не только $CD4^+$-, но и $CD8^+$-клеток и, в меньшей мере, В-лимфоцитов; происходит сдвиг баланса Тх1/Тх2 в сторону Тх2, что снижает уровень Т-клеточного звена иммунной системы и степень противовирусной защиты. Интересно, что цитотоксические $CD8^+$-лимфоциты больных ВИЧ-инфекцией вырабатывают набор цитокинов, свойственный Тх2-клеткам.

В условиях преобладания Тх2-зависимого гуморального звена иммунитета уровень антител к ВИЧ остается достаточно высоким. Более того, концентрация IgG и IgA может даже повышаться, однако защитного эффекта они не оказывают, так как вирусные частицы очень быстро проникают в клетки, к тому же они не вызывают комплементзависимого лизиса инфицированных клеток и не делают их чувствительными к антителозависимому клеточному цитолизу. Одновременно у больных резко угнетается или полностью подавляется бластогенный ответ Т-клеток на антигены и митогены, а также кожные реакции гиперчувствительности на туберкулин, трихофитин, кандидин и другие


ВИРУС ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА
Таксономия, история открытия
Клинико-эпидемиологические особенности СПИДа
Структура ВИЧ
Лабораторная диагностика
Профилактика, лечение
Клетки-мишени
Цитопатогенные эффекты
Оппортунистические инфекции
Опухоли
Пневмония
Диарея
Саркома Капоши
Лимфомы мозга
Этиология
ИФА
Иммунологические сдвиги
Дисбаланс Тх/Тк, Тх1/Тх2
Подавление
продукции ИФН
бластогенного ответа Т-клеток на антигены и митогены
инфекционной аллергии

Граф 97

аллергены. На поздних стадиях развития СПИДа иммунодефицит усугубляется вследствие прогрессирующего истощения тимуса в результате поражения его эпителиальных клеток и резкого снижения активности нормальных киллеров, хотя они и не являются мишенями ВИЧ.

Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции и носительства ВИЧ. Диагностика основана, главным образом, на определении в крови больных и носителей вируса и специфических к нему антител с помощью непрямого метода ИФА (см. «Серотипаж вирусов»). Для подтверждения факта их наличия применяют также иммуноблот-тест. Способы выделения вируса иммунодефицита человека в Т-клеточных культурах настолько сложны, что остаются доступными лишь отдельным вирусологическим лабораториям. Косвенно диагноз ВИЧ-инфекции можно подтвердить с помощью микробиологических исследований, выявив в патологических материалах возбудителей СПИД-ассоциированых оппортунистических инфекций, например *P. carinii*, которая обнаруживается лишь у больных с первичным иммунодефицитом человека. С такой же редкостью при обычных пневмониях, не поддающихся коррекции химиопрепаратами, обнаруживается *Legionella pneumophilla*. То же можно сказать и о других условно-патогенных микробах и сапрофитах, вызывающих внутрибольничные инфекции.

Лечение и профилактика. Для лечения ВИЧ-инфицированных лиц и больных используются препараты антиретровирусной терапии, относящиеся к 5 классам: нуклеозидные, ненуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы протеазы и ингибиторы слияния (см. «Противовирусные препараты»). Вакцинопрофилактика не разработана.

Ортомиксовирусы гриппа

Клиника и эпидемиология. Грипп – острая инфекция дыхательных путей, периодически приобретающая эпидемический характер. Интенсивные эпидемии вызываются, главным образом, вирусом типа А. Вирусы типа В порождают небольшие эпидемические вспышки, а типа С – крайне редкие спорадические заболевания, в основном у детей. Начинается заболевание с общих симптомов. Чаще

всего наблюдаются лихорадка, озноб, головная и мышечная боль, разбитость, светобоязнь, слезотечение, жжение и боль при движениях глаз. Позже присоединяются респираторные проявления болезни – кашель, насморк. С 3–4-го дня начинается выздоровление, но возможны тяжелые осложнения (гриппозная и бактериальная пневмонии, обострение хронического бронхита, миозит, поражение центральной нервной системы, сердца и других органов). Источником инфекции является больной человек, механизм передачи – воздушно-капельный. Наиболее восприимчивы к гриппу старики и дети.

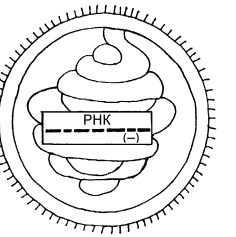


Рис.116. Ортомиксовирусы гриппа

Биологические особенности вирусов. *Ультраструктура.* Все три типа ортомиксовирусов – РНК-содержащие вирионы со спиральным типом симметрии нуклеокапсида, имеющие сферическую форму, диаметром 80–120 нм (рис. 116). У вновь выделенных штаммов обнаруживаются филаментозные формы вирионов, длина которых может достигать 4 мкм. Внутри вирионов находится 8 фрагментов однонитчатой линейной «минус-нитевой» РНК. Здесь же локализованы особого рода белки, по-видимому, осуществляющие вирусную транскриптазную активность. Внешняя оболочка вириона двухслойна. Внутренний электронно-плотный слой состоит из мембранного низкомолекулярного матриксного М-белка, наружный – образован двумя слоями липидов. Поверхность вирусных частиц покрыта близкорасположенными друг к другу «шипами», сформированными двумя гликопротеидными субъединицами – гемагглютинином, вызывающим агглютинацию эритроцитов 0-группы крови человека, и нейраминидазой, отщепляющей нейраминовую (сиаловую) кислоту, содержащуюся в мукопротеидных оболочках эритроцитов и других клеток.

Белки и антигены. В вирусной частице обнаруживаются семь специфических структурных белков. Основным внутренним белком, формирующим субъединицы капсида, является общий для всех вирусов типа А нуклеопротеид.

Вирусы типов А, В и С не имеют родственных антигенов, и между ними невозможна генетическая рекомбинация, поэтому их относят к разным видам.

При действии на вирионы гриппа эфира и дезоксихолата освобождаются два антигена: типоспецифический S-антиген (*solution* – растворимый), связанный с нуклеопротеидом, и штаммоспецифический оболочечный V-антиген (*viral* – вирусный), состоящий из гемагглютинина (H), нейраминидазы (N) и углеводного компонента.

S-антиген отличается высокой стабильностью, является общим для определенного вида вируса, неинфекционный и неиммуногенный, выявляется в РСК.

V-антиген весьма изменчив. Каждые 2–3 года в структуре H и N у вируса А происходят точечные мутационные изменения (антигенный дрейф), а через 10–15 лет – весьма значительные антигенные сдвиги, по-видимому, обусловленные генетической рекомбинацией (пересортировкой фрагментов геномов) между вирусом человека и вирусами гриппа животных или птиц (антигенный шифт).

В настоящее время описано около полутора десятков гемагглютининов и нейраминидаз, которые, со времени открытия вируса гриппа А в 1933 г. У. Смитом, К. Эндрюсом и П. Лейдлоу, эволюционировали в комбинациях от H0N1 до H1N1 (1947 г.), H2N2 (1957 г.), H3N2 (1968 г). При этом антигенный дрейф вызывал тяжелые эпидемии гриппа во многих областях и регионах, а антигенный шифт порождал пандемии, охватывающие все материки. В 1977 г. после многих лет отсутствия вновь появился вирус с антигенной структурой HIN1.

С V-антигеном связана также иммуногенная активность вируса гриппа, в частности продукция вируснейтрализующих и тормозящих гемагглютинацию антител. У некоторых людей противогриппозный иммунитет не вырабатывается, что обусловлено наличием у вируса гриппа общих антигенов с изоантигенами эритроцитов человека.

Резистентность. Вирус гриппа чувствителен к эфиру, детергентам, низким значениям pH и температуре 50–60 °С, при которой погибает в течение нескольких минут.

Иммунитет. Уровень противогриппозного иммунитета в основном определяют секреторные IgAS, которые вырабатываются антителопродуцирующими клетками слизис-

тых оболочек верхних дыхательных путей. В естественной резистентности к гриппу существенное значение имеют также неспецифические вирусные ингибиторы сыворотки крови здоровых людей. При заболевании гриппом происходит быстрое увеличение интерферонообразования. Достаточно высокий титр антител определяется на 7–8-й день от начала заболевания, когда в крови появляются антигемагглютинины, обладающие вируснейтрализующими свойствами, и антинейраминидазы, тормозящие выход вирионов из клеток. Постинфекционный иммунитет носит видоспецифический характер и продолжается от 1–2 (А-вирус) до 3–5 лет (В-вирус).

Лабораторная диагностика. В первые 5 дней с начала заболевания вирусы гриппа обнаруживаются в носоглотке. Их выделяют, заражая носоглоточным смывом 10–11-дневные куриные эмбрионы в полости амниона и аллантоиса с последующим культивированием при температуре 33 °С. Через 3–4 дня ставят РГА, добавляя к амниотической и аллантоисной жидкости эмбрионов эритроциты кур, морских свинок или 0-группы крови человека. При наличии гемагглютинации видовую принадлежность вирусов определяют с помощью РТГА, РН и РСК.

Выделить вирус можно также на первичных культурах почечных клеток обезьян, человека и телят. Диплоидные и гетероплоидные клетки (HeLa, КВ, клетки сердца, кишечника) обычно к вирусу нечувствительны. Развитие вирусов гриппа в клетках обнаруживается спустя 3–4 дня с момента их инфицирования по феномену гемадсорбции и реакции ее торможения специфическими сыворотками. Цитопатический эффект проявляется позже в виде накопления вакуолизирующих клеток, которые затем дегенерируют или отделяются от стекла. Некоторые штаммы вирусов гриппа способны образовывать бляшки.

Изредка прибегают к культивированию вирусов гриппа в организме хорьков и белых мышей, у которых после интраназального заражения может развиваться гриппозная пневмония.

Серодиагностика. Противогриппозные антитела в крови больных появляются поздно, вследствие чего серологические реакции используют для ретроспективной диагностики. Обычно прослеживается динамика нарастания

антител. С этой целью изучаются парные сыворотки, одна из них берется в первые дни заболевания, а другая – через 7–15 дней. Диагноз подтверждается четырехкратным увеличением титра антител (у детей – двукратным) в РСК, РТГА, ИФА.

Экспресс-диагностика. Она основана на обнаружении цитоплазматических включений и антигенов вирусов в цилиндрическом мерцательном эпителии носовой полости в РИФ и ИФА. При этом для приготовления мазков этот эпителий снимают тампонами, поочередно вводя их в носовые ходы на глубину 2–3 см с последующим погружением–отжатием в фосфатно-буферном растворе, центрифугированием суспензии. Сделанные из осадка *мазки в РИФ* обрабатывают антителами к вирусам гриппа А (H1N1), А (H3N2) и В, обращая внимание на тип, число клеток и уровень их свечения. Диагностическое значение имеет выявление отчетливо видимого зеленоватого свечения в бокаловидных или округлых клетках с крупным ядром и малой цитоплазматической зоной в мазках, содержащих не менее 15 таких клеток, среди которых у 5–7 яркость свечения оценивается на один крест и более.

Для постановки ИФА секреты носовой полости получают с помощью аспираторов. Перед исследованием их разводят в 5 раз фосфатно-буферным раствором с 0,05 % твина-50. Носоглоточные смывы, соскобы с трахеи получают в клинических условиях, ресуспензируя их в 2 мл фосфатно-буферного раствора, содержащего 0,05 % твина-20, и для высвобождения клеточных антигенов подвергают двухкратному замораживанию–оттаиванию.

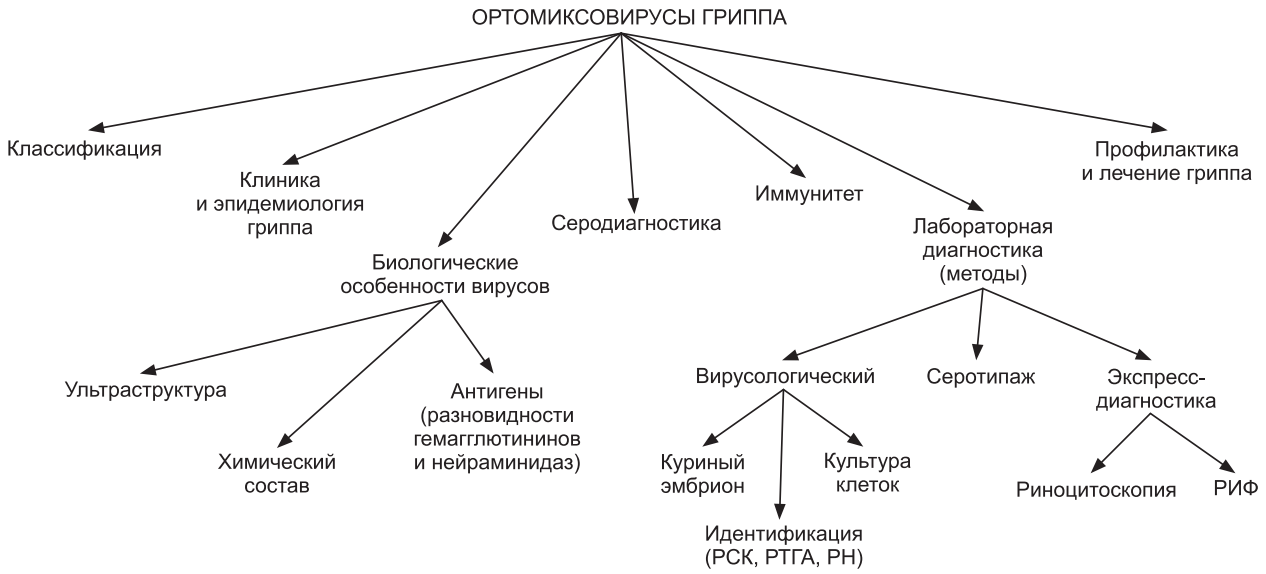
Риноцитоскопия. Мазки-отпечатки готовят из нижней носовой раковины. После высушивания препараты обрабатывают флюоресцирующими типоспецифическими антигриппозными сыворотками, акридиновым оранжевым (АО) и окрашивают по Романовскому – Гимзе. Исследуют под люминесцентным и иммерсионным микроскопами. Конъюганты меченых антител и вирусов в мерцательном эпителии приобретают цвет и оттенок флюорохрома, которым метились антитела: вирусные включения в мазках, обработанных АО, становятся огненно-красными, а в окрашенных по Романовскому – Гимзе – сине-фиолетовыми.

Специфическая профилактика и лечение. В настоящее время создано много гриппозных вакцин: из живых и инактивированных вирусов; мутантов и рекомбинантов; целых и разрушенных вирионов, а также из очищенных антигенов (гемагглютининов и нейраминидаз), которые применяются интраназально, энтерально и парентерально.

Широко использовавшиеся ранее гриппозные вакцины из ослабленных штаммов вирусов А и В для интраназального и перорального применения, заменены в России очищенной и концентрированной цельновирионной вакциной, содержащей по 20 мкг гемагглютининов вируса гриппа А двух антигенных разновидностей (H1N1 и H3N2) и 26 мкг вируса типа В. Она применяется однократно и вводится подкожно в объеме 0,5 мл или двукратно – интраназально в том же объеме (по 0,25 мл в каждый носовой ход) с интервалом 21–28 дней. Применяется также трехвалентная полимер-субъединичная вакцина Гриппол, содержащая поверхностные антигены вируса гриппа трех типов с иммуностимулятором полиоксидонием. Ее вводят детям с 3 лет и взрослым однократно подкожно по 0,5 мл. Специфическую профилактику гриппа у лиц старше 65 лет, взрослых и детей с хроническими заболеваниями почек, легких, сердца следует проводить очищенной инактивированной формолвакциной французской фирмы «Пастер-Мерье» Ваксигрип, содержащей вирус гриппа трех штаммов. Она выпускается в шприцах с одной дозой и во флаконах по 10, 20 и 50 доз. Взрослых и детей вакцинируют однократно, вводя им подкожно или внутримышечно 0,5 мл препарата, детям младше 10 лет – две инъекции по 0,25 мл с интервалом 1 мес.

После противогриппозной вакцинации показатели напряженности гуморального иммунитета соответствуют постинфекционному, но эффективность его в связи с уникальной способностью вируса гриппа А изменять антигенную структуру, к сожалению, может утрачиваться.

Ограниченно профилактика гриппа проводится ремантадином, арбидолом, оксолином, интерфероном, иммуноглобулином. Эти же препараты могут назначаться и для лечения, особенно в первые 2–3 дня заболевания. Для профилактики бактериальных осложнений гриппа применяют сульфаниламиды и антибиотики широкого спектра действия.


ОРТОМИКСОВИРУСЫ ГРИППА
Классификация
Клиника и эпидемиология гриппа
Биологические особенности вирусов
Серодиагностика
Иммунитет
Лабораторная диагностика (методы)
Профилактика и лечение гриппа
Ультраструктура
Химический состав
Антигены (разновидности гемагглютининов и нейраминидаз)
Вирусологический
Серотипаж
Экспресс-диагностика
Куриный эмбрион
Культура клеток
Идентификация (РСК, РТГА, РН)
Риноцитоскопия
РИФ

Граф 98

Парамиксовирусы парагриппа, эпидемического паротита, кори и РС-инфекции

Клиника и эпидемиология заболеваний. Парамиксовирусные инфекции – острые лихорадочные инфекции верхних дыхательных путей.

При парагриппе чаще всего поражается гортань. Тяжесть течения болезни определяется типом вируса. Легкую форму парагриппа вызывают типы 1 и 2 (першение в горле, охриплость, кашель), тяжелую со стенозом гортани – тип 3, тяжелейшую с глубокой интоксикацией – тип 4.

При эпидемическом паротите обычно опухают околоушные железы, реже поражаются яички и яичники, изредка – твердая мозговая оболочка и ткань мозга.

Корь начинается с лихорадки и катара верхних дыхательных путей, позже появляется обильная пятнисто-папулезная кожная сыпь. Большую опасность представляют осложнения (пневмония и энцефалит).

Респираторно-синцитиальная (РС) инфекция проявляется в виде пневмоний у детей или простого насморка у взрослых.

Основной источник парамиксовирусных инфекций – больные дети. Механизм передачи – воздушно-капельный.

Биологические особенности вирусов. Ультраструктура и основные свойства. Семейство парамиксовирусов отличается от ортомиксовирусов большими размерами, цельным нефрагментированным РНК-геномом, гемолитической активностью, тканевым тропизмом и отсутствием ядерной фазы репликации. Форма у них округлая, размеры варьируют от 150 до 300 нм, а при наличии в вирионах нескольких нуклеокапсидов – от 800 до 1000 нм. Свернутый в клубок тяж нуклеопротеида покрыт внутренней белковой оболочкой, а снаружи – липопротеидной с наличием в ней шипиков (рис. 117), образованных нейраминидазой (вирусы парагриппа и паротита) и гемагглютинином (парамиксовирусы и морбилливирус). В поверхностных структурах парамиксовирусов содержатся гемолизин и белки

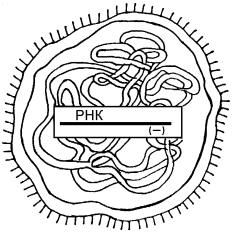


Рис. 117. Парамиксовирусы

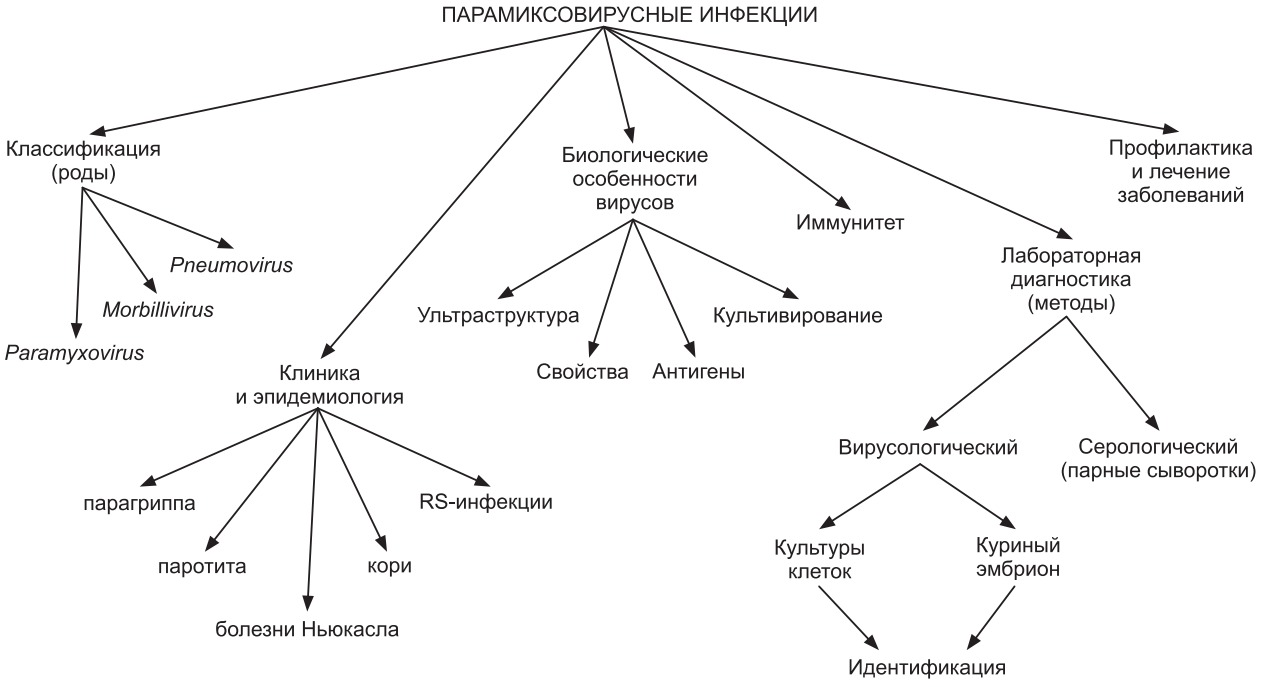
слияния, вызывающие формирование многоядерного синцития (Pneumovirus). Размножаясь в монослое, семейство парамиксовирусов формирует цитоплазматические включения. Все парамиксовирусы очень чувствительны к эфиру и многим другим химическим веществам.

Белки, антигены, ферменты. У парамиксовирусов имеется семь белков: NP-белок, L-белок (large) и P-белок связаны с внутренней оболочкой, а гемагглютинин, нейраминидаза, F-белок слияния и матриксный – с липопротеидной. Вирусы содержат поверхностные и внутренние специфические антигены. Единого для семейства и рода группового антигена нет, т. е. в антигенном отношении парамиксовирусы неоднородны. В их состав входят также РНК-полимераза, протеинкиназа и два фермента, модифицирующих концы иРНК.

Иммунитет. Дети в первые 3 мес. жизни резистентны к парамиксовирусным инфекциям, но со второго полугодия иммунитет у них полностью утрачивается. После перенесенной кори и эпидемического паротита развивается стойкий пожизненный иммунитет. К другим парамиксовирусным инфекциям постинфекционный иммунитет – малонапряженный и непродолжительный.

Лабораторная диагностика заболеваний, вызванных парамиксовирусами. При относительно легких формах болезней парамиксовирусы с наибольшим постоянством выделяются из смывов носоглотки, а при вирусемиях – из мочи, крови и спинномозговой жидкости. Парамиксовирусы размножаются в культурах почек обезьян или плода человека, в частности на перевиваемых клетках HeLa, Hep-2, где образуются гигантские клетки и синцитий. Культуры вирусов выращивают 2–3 недели. Куриные эмбрионы используют для культивирования вирусов паротита и парагриппа типа 1, при этом материал вводят в аллантоисную полость. Видовая принадлежность парамиксовирусов устанавливается с помощью РСК, РН, РТГА, РТГадс и реакции торможения гемолиза. Правда, следует отметить, что гемагглютинирующие и гемадсорбирующие свойства у респираторно-синцитиального вируса отсутствуют.

Серодиагностика. Основана на определении динамики увеличения титра антител при исследовании парных сывороток, взятых с интервалом 3–4 недели, в реакциях РСК, РН, РТГА, РТГадс и торможения гемолиза.


ПАРАМИКСОВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ
Классификация (роды)
Pneumovirus
Morbillivirus
Paramyxovirus
Клиника и эпидемиология
парагриппа
паротита
болезни Ньюкасла
кори
RS-инфекции
Биологические особенности вирусов
Ультраструктура
Свойства
Антигены
Культивирование
Иммунитет
Лабораторная диагностика (методы)
Вирусологический
Серологический (парные сыворотки)
Культуры клеток
Куриный эмбрион
Идентификация
Профилактика и лечение заболеваний

Граф 99

В экспресс-диагностике парагриппа и кори может быть использована РИФ. При этом с целью обнаружения в эпителиальных клетках парагриппозных антигенов мазки делают из отделяемого зева и слизи нижней носовой раковины, а для выявления коревых включений – из осадка мочи в первые 5 дней после кожных высыпаний. Их обрабатывают мечеными антителами против вирусов парагриппа, гриппа и кори.

Профилактика. Специфическая профилактика разработана только в отношении кори и эпидемического паротита. По календарю прививок она проводится в возрасте 1 года живыми ослабленными моновакцинами. Они вводятся одновременно или с интервалом в 1 мес. в разные участки тела. Непривитые или не болевшие дети старше 12 мес., подростки и взрослые по эпидемическим показаниям прививаются моновакцинами в первые 3 дня от момента контакта с больными корью и эпидемическим паротитом. В последние годы плановую профилактическую прививку против кори и эпидемического паротита у детей начали проводить комплексной тривакциной, в состав которой включили ослабленный рубивирус краснухи (вакцина Тримовакс). Ревакцинация ею проводится в 6 лет (в случаях перенесенной кори, паротита или краснухи – моновакцинами). Пассивная профилактика действенна в отношении кори. Она осуществляется человеческим иммуноглобулином, который вводится в объеме от 1,5 до 3 мл, но не позднее 5-го дня с момента инфицирования детей.

Аденовирусные инфекции

Клиника и эпидемиология аденовирусных болезней. Аденовирусы человека вызывают острый катар верхних дыхательных путей, конъюнктивит, пневмонии, гастроэнтериты, этиологически чаще всего связанные с 1–7, 14 и 21-м серотипами.

Источником инфекции являются больные, реконвалесценты и здоровые носители. Наиболее восприимчивы к аденовирусам дети от 6 мес. до 5 лет. Механизм передачи инфекции – воздушно-капельный и фекально-оральный. Аденовирусные болезни по частоте заболеваемости занимают второе место после гриппа.

Биологические особенности вирусов. *Ультраструктура.* Аденовирусы – типичные нуклеокапсиды диаметром 70–90 нм, состоящие из двунитчатой линейной ДНК (12–14 %),

покрытой капсидом, в котором содержится 252 капсомера. Вирионы имеют форму икосаэдра, грани которого образованы 240 гексонами (6-гранными капсомерами), а полигональные основания – 12 пентонами с отходящими от них булавовидными нитями (рис. 118).

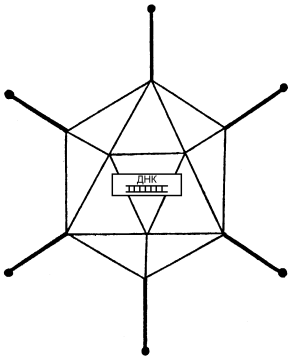


Рис. 118. Аденовирусы

Белки и антигены. В составе аденовирусов находятся группоспецифические А-антигены, содержащиеся в нуклеокапсиде и гексонах, пентонные В-антигены, по структуре которых они подразделены на 3 подгруппы, и типоспецифический С-антиген нитей вириона. По его различию выделяют 41 серовар вирусов, поражающих человека, из них 40-й и 41-й чаще всего вызывают гастроэнтериты.

Свойства. Аденовирусы агглютинируют эритроциты обезьян-резус и крыс, довольно устойчивы во внешней среде, выдерживают нагревание при температуре 50 °С и поскольку не содержат липидов, то не разрушаются эфиром и детергентами.

Культивирование. Аденовирусы размножаются в первичных и перевиваемых культурах клеток. Вызывают скучивание инфицированных клеток, их округление и образование внутриядерных включений, а в последующем – деструкцию монослоя. Животные к аденовирусам проявляют высокую степень устойчивости. Некоторые аденовирусы обладают онкогенными свойствами, в частности серотипы 12, 18 и 31 вызывают саркому у новорожденных сирийских хомяков и крыс и злокачественную трансформацию культур почек и фибробластов, полученных от них.

Лабораторная диагностика аденовирусных болезней. Исследуют отделяемое слизистой оболочки носоглотки и конъюнктивы глаз или кал. Специфические антигены в носовом отделяемом и содержащихся в нем клетках выявляют так же, как и при гриппе, с помощью РИФ и ИФА.

Аденовирусы выделяют на перевиваемых клетках HeLa, КВ, Нер-2 или первичной культуре эмбриональной почки человека, заражая их надосадочной жидкостью гомогенизированного материала больных. Инфицированные культуры клеток инкубируют при 37 °С в течение 14 дней.

Вызвавшие дегенерацию клеток аденовирусы идентифицируют с помощью РСК или РПГ, позволяющих определить групповые антигены, а также РН или РТГА, которые дают возможность выявить типоспецифические антигены.

Серодиагностика аденовирусных болезней основана на определении нарастания титра антител к групповому и типоспецифическому антигену в парных сыворотках, взятых у больных в начале заболевания и при выздоровлении.

Профилактика и лечение. Для профилактики аденовирусных инфекций предложены инактивированная формалином и живая поливалентная вакцины, в состав которых входят наиболее эпидемиологически значимые серотипы 3, 4 и 7. Формолвакцина применяется подкожно и внутримышечно. Широкому внедрению живой вакцины в практику препятствуют данные об онкогенном действии аденовирусов. В качестве этиотропных средств лечения больных рекомендуется использовать трифторидин (вироптик) и рибавирин; закапывать в носовую полость и конъюнктивальный мешок 0,05 %-ный раствор дезоксирибонуклеазы; внутримышечно вводить специфический иммуноглобулин.

Граф 100

Вирусы простого герпеса, цитомегалии, ветряной оспы и опоясывающего герпеса

Клинико-эпидемиологические особенности герпесвирусных инфекций. *Простой герпес (simplexherpes), ветряная оспа (varicella) и опоясывающий герпес (zoster)* – лихорадочные заболевания, характеризующиеся высыпаниями на коже и слизистых оболочках везикул (мелких пузырьков), наполненных прозрачной жидкостью. При самой распространенной форме простого герпеса – гингивостоматите – они локализуются по красной кайме губ вокруг рта, а при генитальной – на кожных покровах наружных половых органов. Ветряночные везикулы появляются на лице, волосистой части головы, туловище и конечностях, а при опоясывающем герпесе – по ходу межреберных нервов. Высыпание пузырьков сопровождается общим недомоганием, ощущением зуда, жжением, болью. При благоприятном течении герпетических инфекций везикулы через несколько дней подсыхают и покрываются корочкой, которая затем отпадает, не оставляя рубцов или других дефектов кожи (если они рано вскрываются, то быстро эпителизируются). При тяжелых формах заболеваний происходят диссеминация вирусов и слияние везикул, некротизация, геморрагии в них с обширным поражением слизистых оболочек рта, зева, миндалин, гортани. Изредка развивается пневмония, менингоэнцефалит, гепатит.

Цитомегалия обычно протекает как безобидное воспаление слюнных желез, но при острой форме цитомегаловирус (ЦМВ) проникает в печень, селезенку, почки, костный мозг, вызывая желтуху, эритробластоз и летальный исход. У беременных и людей с иммунодефицитами может развиваться мононуклеозоподобный синдром.

Источником этих герпесвирусных инфекций являются вирусоносители и больные люди. Первичное заражение вирусом простого герпеса (ВПГ) происходит при родах. Попав в организм, он из первичного очага мигрирует в тройничный нерв (ВПГ 1-го типа) и поясничные нервные узлы (ВПГ 2-го типа), где сохраняется на протяжении всей жизни. При охлаждении, переутомлении, болезнях, стрессовых ситуациях дочерние популяции ВПГ по центробежным нейронам достигают первичного очага и, репродуцируясь в чувствительных эпителиальных клетках,

вызывают рецидивы гингивостоматита и генитального герпеса. Вирус ветряной оспы передается воздушно-капельным путем или контактным при соприкосновении с отделяемым везикул. До 6–9 мес. дети защищены от болезни материнскими антителами. Переболевшие ветряной оспой дети повторно не болеют, хотя у 2/3 выздоровевших вирус остается в организме неопределенно долгое время и в 10 % случаев при снижении резистентности вызывает опоясывающий герпес (чаще у детей старше 10 лет и взрослых). Контакт восприимчивых детей с больным опоясывающим герпесом ведет к возникновению ветряной оспы.

ЦМВ (герпесвирус 5-го типа распространен повсеместно (у людей старше 30 лет антитела к нему выявляют в 80 % случаев). Передается детям от матери при рождении и кормлении, а взрослым – при гемотрансфузиях и половых контактах.

Обладает тератогенным действием на человеческий эмбрион; приводит к недоношенности и мертворождению, а у родившихся живыми детей могут быть дефекты развития или генерализация цитомегалии с поражением внутренних органов, головного и спинного мозга. Длительная персистенция герпесвирусов приводит к хромосомным аберрациям и перерождению клеток в злокачественные, что экспериментально доказано для ВПГ.

Биологические особенности вирусов. *Ультраструктура.* Герпесвирусы – это сложные по организации генома и очень своеобразные по структуре оболочек ДНК-вирусы. Геном их представлен обычной двухнитчатой ДНК с незамкнутыми концами, которая заключена в белковый капсид, состоящий из 162 полых пяти- и шестигранной формы капсомеров, уложенных по кубическому типу симметрии. Суперкапсиды герпесвирусов и гликопротеиновые шипы у них образованы фрагментами тех ядерных мембран и белков клеток, в которых они размножались (рис. 119). Диаметр безоболочечных «голых» вирионов – около 100 нм, «одетых» – от 120 до 300 нм. Разграничивает их покровный слой, названный тегуменом (*tegumentum* – покрытие).

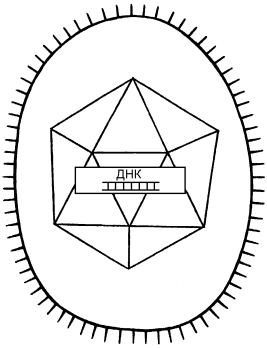


Рис. 119. Герпесвирусы

Белки и антигены. В состав вирионов входит около трех десятков полипептидов. Белки нуклеокапсида одинаковы у всех альфагерпесвирусов. У ВПГ типоспецифические антигены представлены гликопротеинами суперкапсида. Основными иммуногенами являются Gв, Gс и Gd, индуцирующие антитела и активирующие иммунокомпетентные клетки.

Резистентность. Вирионы чувствительны к эфиру, детергентам, низким значениям pH, повышенной температуре.

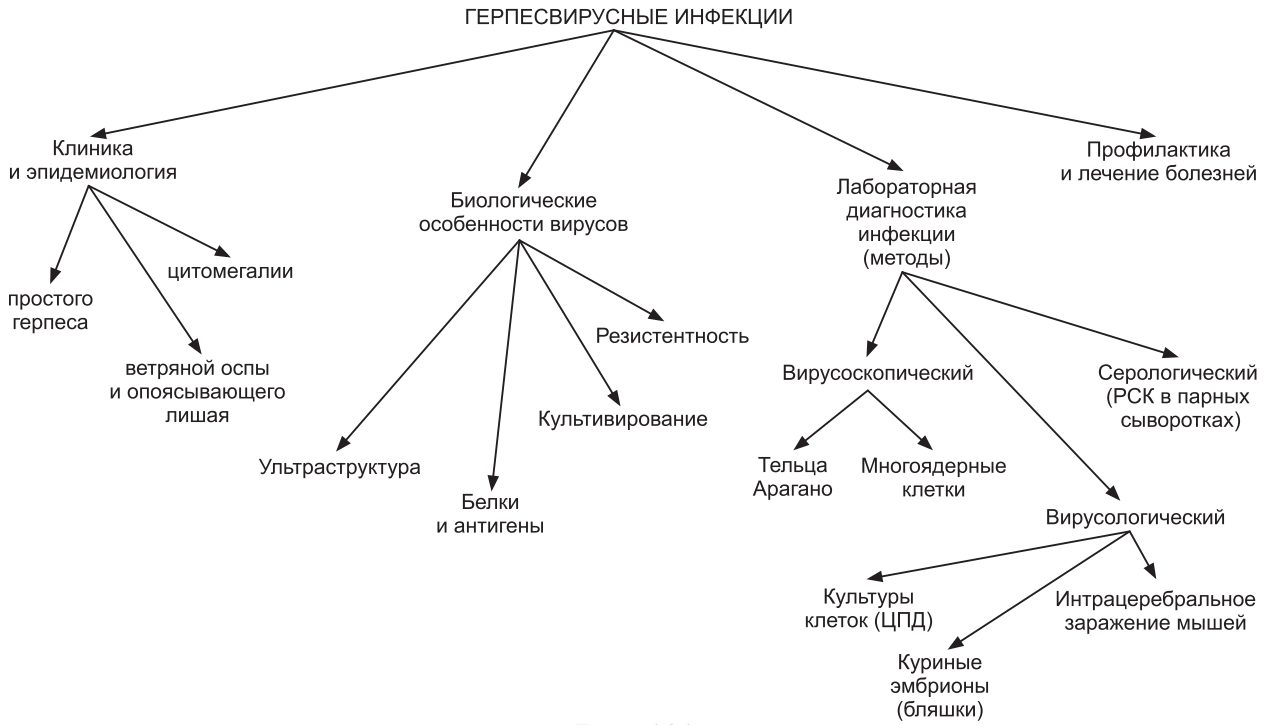
Лабораторная диагностика заболеваний. Материалами исследования являются содержимое пузырьков, носоглоточные смывы, слюна, кровь, спинномозговая жидкость, биоптаты органов и секционный материал.

В мазках из серозного содержимого ветряночных везикул, обработанных методом серебрения по Морозову, в иммерсионном микроскопе выявляют тельца Арагана, а в биоптатах тканей, пораженных вирусом простого, опоясывающего герпеса и ЦМВ, окрашенных по Романовскому – Гимзе, – гигантские многоядерные клетки с внутриядерными включениями (использование РИФ, РПГ позволяет обнаружить также вирусные антигены).

Выделяя из материалов герпесвирусы, используют первично-трипсинизированные эмбриональные тканевые культуры, фибробласты и диплоидные клетки легких человека, развиваясь в которых, они через несколько дней (вирус ветряной оспы – спустя 2–4 недели) вызывают цитопатический эффект, выражающийся в постепенно нарастающей деструкции клеток. ВПГ культивируется также в мозговой ткани белых мышей и на роговице кроликов, вызывая у них, соответственно, энцефалиты и кератиты. Для идентификации герпесвирусов применяют РСК и РН, реже – полимеразную цепную реакцию и ДНК-зондирование.

Серодиагностика. Наиболее чувствительна РСК. Обычно ее используют для выявления нарастания титра антител при ветряной оспе. Большой ценности в диагностике простого герпеса и цитомегалии она не представляет из-за частого обнаружения антител к ВПГ и ЦМВ в крови здоровых людей.

Специфическая профилактика и лечение. Созданы 3 герпесвирусные вакцины: живые цитомегаловирусные моно- и дивакцины в сочетании с аттенуированным виру-


ГЕРПЕСВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ
Клиника и эпидемиология
простого герпеса
ветряной оспы и опоясывающего лишая
цитомегалии
Биологические особенности вирусов
Ультраструктура
Белки и антигены
Культивирование
Резистентность
Лабораторная диагностика инфекции (методы)
Вирусоскопический
Тельца Арагано
Многоядерные клетки
Вирусологический
Культуры клеток (ЦПД)
Куриные эмбрионы (бляшки)
Интрацеребральное заражение мышей
Серологический (РСК в парных сыворотках)
Профилактика и лечение болезней

Граф 101

сом краснухи и убитая культуральная антисимплексгерпесная вакцина. Первые две применяются по эпидемическим показаниям, а третья – как лечебный препарат, назначаемый больным с упорно рецидивирующим простым герпесом. Профилактика ветряной оспы у детей, имевших контакт с больными, проводится противокоревым иммуноглобулином, который вводится внутримышечно в количестве 3–6 мл. Этот же иммуноглобулин назначается как стимулятор при простом герпесе. В качестве этиотропных препаратов при герпесвирусных инфекциях используются аномальные нуклеозиды в виде мазей (0,5–5 %) или растворов (0,1–0,5 %) (в частности, ацикловир и фамцикловир, ингибирующие ВПГ, ганцикловир, используемый как средство ингибирования ДНК-полимеразы ЦМВ), интерфероны и дезоксирибонуклеазы как примочки. Для профилактики вторичной инфекции больным назначаются антибиотики широкого спектра действия.

Вирусы гепатитов

Таксономия. Выделено восемь видов (типов) вирусов, вызывающих гепатит, – A, B, C, D, E, G, F и вирус TTV (*transfusion transmited virus*), из них идентифицированы и хорошо изучены первые шесть. Вирус гепатита B отнесен к роду *Orthohepadnavirus* сем. *Hepadnaviridae*, а пять других – в группу РНК-вирусов, в частности вирус A включен в род *Hepatovirus* сем. *Picornaviridae*; E – в род *Hepevirus* сем. *Caliciviridae*, D – в род *Deltavirus* сем. *Togaviridae*; C и G – в род *Hepacivirus* сем. *Flaviviridae*. F- и TTV-вирусы в систематике вирусов определенного местоположения пока не нашли (более того, имеются сомнения в принадлежности их к гепатовирусам).

По структуре генома и механизму передачи вирусы гепатитов подразделяют на две группы.

1. Вирусы с полноценным геномом и собственным механизмом репликации (A, B, C, E) и дефектные вирусы-сателлиты, к которым относятся дельтавирус, зависимый от ортогепаднавируса B, и G-сателлит – от C-вируса.

2. Вирусы, передающиеся трансфузионным, инъекционным, перинатальным и половым путями (B, C, D, G и TTV) и вирусы с фекально-оральным механизмом передачи (A, E и, предположительно, F).

Клиника и эпидемиология вирусных гепатитов. Вирусные гепатиты – антропонозные инфекции. По этиологии и эпидемиологическим особенностям, среди них различают три клинические формы: 1) вирусный гепатит А (ВГА), который нередко называется инфекционным и эпидемическим; 2) вирусный гепатит В (ВГВ), или сывороточный гепатит; 3) вирусные гепатиты, клинически сходные с ВГА и ВГВ, вызываемые другими видами вирусов. Независимо от клинической формы ВГА и ВГВ протекают как острое или хроническое инфекционное заболевание, но часто проявляются как инаппарантная бессимптомная инфекция.

Основными симптомами остротекущих ВГА и ВГВ являются интоксикация, увеличение пораженной печени с пожелтением коньюнктивы глазного яблока и кожных покровов, но в большинстве случаев регистрируются безжелтушные формы гепатитов. Те и другие, как правило, заканчиваются полным выздоровлением. ВГВ, правда, нередко осложняется массивным некрозом паренхимы печени, заканчивающимся смертельным исходом. В более отдаленные сроки другими опасными его исходами являются развитие цирроза печени и раковое перерождение. К таким же последствиям ведет развивающийся всегда хронически вирусный гепатит С, при котором, кроме желтухи, регистрируются артралгии, васкулиты, миокардиты, легочные поражения и др. Вирусы-сателлиты дельта и G вызывают гепатиты только совместно с В- и С-вирусами. При одновременном заражении человека В- и дельта-вирусом течение коинфекции относительно доброкачественное, но выздоровление затягивается, а при заражении дельта-вирусом инфицированных В-вирусом лиц микст-инфекция усугубляет процесс отечно-асцитическим синдромом и опасностью развития рака печени. Вызванный G-сателлитом и С-вирусом гепатит протекает так же, как гепатит С, и с теми же последствиями. Гепатит, вызванный Е-вирусом, проявляется недомоганием и чаще всего протекает без желтухи. Источником инфекции является больной или вирусоноситель.

Характерная особенность вирусных гепатитов – множественность факторов передачи. Так, гепатит А, как и кишечные инфекции, передается через зараженную вирусом воду и пищевые продукты, предметы домашнего оби-

хода и производственной обстановки. Инфицирование возможно также воздушно-капельным путем. Болезнь проявляется после сравнительно непродолжительного инкубационного периода, длящегося 3–6 недель. Эпидемические вспышки ВГА чаще всего наблюдаются в летне-осенний период времени.

Вирус гепатита В циркулирует в крови больных или носителей и редко выделяется с экскретами и мочой. В кровь инфицированных он проникает за 1–2 мес. до проявления болезни и в организме выздоровевших от гепатита персистирует многие месяцы и годы. Обнаруживается не только у реконвалесцентов, но и в крови никогда не болевших выраженным гепатитом. Распространение гепатита В обусловлено массовым проведением медицинских манипуляций, требующих инструментального обследования больных и парентерального введения им крови и лечебно-профилактических препаратов. С учетом сказанного понятно, почему этот гепатит называют не только сывороточным или посттрансфузионным, но и шприцевым. Возможны также вертикальная передача вируса от матери к плоду и инфицирование ВГВ половым путем. Возникает ВГВ после 2–6-месячного инкубационного периода.

Механизм передачи инфекции при вирусных гепатитах E и F таков же, как у ВГА, а у C, D, G и TTV – как у ВГВ.

Биологические особенности вирусов гепатита. *Ультраструктура и антигены.* Вирусы гепатитов имеют сферическую форму. У РНК-содержащих вирусов диаметр варьирует от 25–27 нм (вирион A), до 35–38 (E и D), достигая 50 нм (C). Пикорнавирусы A и калицивирионы E – простые вирусы, тогавирусы D и флавивирионы C и G – сложные. Геном A, E и C вирионов представлен линейной нефрагментированной +РНК, а у дельта – кольцевой. Нуклеокапсид их организован по типу кубической симметрии. Основным антигеном вируса гепатита A является HA-Ag. Антигены других РНК-вирусов гепатитов изучены недостаточно.

Сложное строение имеют вирионы ортогепаднавируса, или частицы Дейна. Как и другие вирусы гепатитов, они имеют округлую форму с диаметром 42,5 нм. В сердцевине частицы Дейна, окруженной белковой мембраной, содержится геном вируса, представленный циркулярно-замкнутой ДНК с недостроенным на треть длины участ-

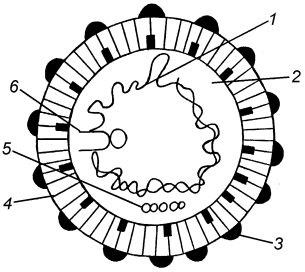


Рис. 120. Гепаднавирус:
1 – однонитчатый участок ДНК; *2* – двунитчатый участок ДНК; *3* – HBs-антиген; *4* – HBe-антиген; *5* – HBc-антиген; *6* – ДНК-полимераза

ком в одной ее цепи, вирусспецифическая ДНК-полимераза, достраивающая дефектную нить ДНК-вириона при репродукции в гепатоцитах, и два антигена (Ag): HBc (*cor* – конъюгированный), вмонтированный в ее мембрану, и HBe (*envelop* – свернутый), обособленный от нее. Во внешней оболочке частицы Дейна содержится антиген HBs (*superficial* – поверхностный), включающий два полипептидных фрагмента: $preS_1$-иммуноген и $preS_2$-рецептор, с помощью которого вирус адсорбируется на гепатоцитах (рис. 120).

Все три антигена частиц Дейна индуцируют в организме больных гепатитом В и вирусоносителей выработку антител, но больше всего их продуцируется по отношению к HBsAg как к самому сильному иммуногену. К тому же он вырабатывается в таком избытке, что часто полностью не аккумулируется вирионами и, проникая в кровь, циркулирует в виде пустотелых сферических (20 нм) и трубчатых (220–400 × 20 нм) микроструктур. Нередко частицы Дейна в крови отсутствуют, а HBsAg находится в высоких титрах. Объясняют это явление тем, что геном вируса гепатита В может интегрироваться с геномом гепатоцитов, и в этих случаях с провируса считывается только частичная информация, т. е. способность продуцировать HBsAg. При этом допускается, что с провируса считывается также информация, изменяющая антигенную структуру гепатоцитов с последующим развитием аутоиммунного патологического процесса, исходом которого может явиться некроз печени, переход острой формы болезни в хроническую, развитие цирроза и рака печени. В связи с этим большой интерес представляет еще и то, что у больных гепатитом В с такими осложнениями и исходами в сыворотке крови зачастую обнаруживаются антитела к четвертому, наименее изученному HBxAg частиц Дейна и дефектному дельта-вирусу, предположительно опосредующим антигенную трансформацию клеток печени, в том числе злокачественное их перерождение.

Резистентность вирусов. Вирус гепатита А и другие РНК-вирусы гепатитов, не имеющие внешней оболочки, устойчивы к эфиру и детергентам. Они длительно сохраняются при низких температурах и нагревании до 60 °С, устойчивы к хлору, инактивируются при кипячении, действии сухого жара и дезинфицирующих веществ. Вирус гепатита В тоже высокоустойчив, длительно сохраняется в сыворотке, плазме, донорской крови и с трудом инактивируется при кипячении.

Культивирование. К заражению вирусами гепатитов чувствительны шимпанзе и некоторые другие приматы, но в практике биологический эксперимент не используют. Для выделения вируса гепатита А пригодны лишь лейкоцитарные и органные культуры. Вирус гепатита В культивируется в монослое человеческих гепатоцитов, где образуются как вирусные частицы, так и их антигены.

Иммунитет. Восприимчивость к вирусным гепатитам абсолютна, однако, новорожденные от переболевших матерей наследуют иммунитет, сохраняющийся до 1 года, что определяется передачей антител через плаценту. Высокая устойчивость к вирусным гепатитам у взрослых людей обусловлена скрытой иммунизацией при повторных контактах с вирусами, а в целом – коллективным иммунитетом. Приобретенный иммунитет после гепатита А сохраняется пожизненно. Стойкая невосприимчивость к повторному заболеванию формируется также после перенесенного гепатита Е. Напротив, у переболевших гепатитом В постинфекционный иммунитет – малонапряженный и сравнительно непродолжительный, но реинфекции относительно редки (около 6,5 %). Перекрестного иммунитета между разными нозологическими формами гепатита не создается, что свидетельствует о резких различиях в антигенной структуре вирусов, которые их вызывают.

Лабораторная диагностика. Поскольку выделить вирусы гепатита из патологических материалов больных крайне трудно, их дифференциация основана на использовании серологических способов выявления специфических антигенов, антител и вирусных РНК. В частности, диагностика ВГВ построена на определении в сыворотке крови больных HBsAg и антител к ним. Обнаруживаются HBsAg в острой стадии заболевания, правда, не у всех больных, а только у большинства (55–70 %); исчезают при

выздоровлении, но у части переболевших могут сохраняться в крови многие месяцы. Антитела к HBsAg обнаруживаются в крови только через несколько месяцев от начала болезни. HBsAg и специфические антитела к ним определяют в РПГ и реакции встречного иммуноэлектрофореза, ИФА и РНГА. При отрицательных результатах прибегают к выявлению антител к HBcAg, которые удается обнаружить лишь на стадиях завершения инфекционного процесса и выздоровления больных. Диагностика всех других вирусных гепатитов основана на выявлении вирусспецифических IgM методом ИФА или РИА. Продуцируются они, однако, медленно и в крайне низких титрах. Ранние IgM к вирусам E и G обнаруживаются с 10–15-х сут после инфицирования, к дельта-вирусу – спустя 10–15 сут после заболевания, а к С-вирусу – через 3 мес. от его начала. Вирусные РНК и ДНК идентифицируются с помощью полимеразной цепной реакции и методом молекулярной гибридизации.

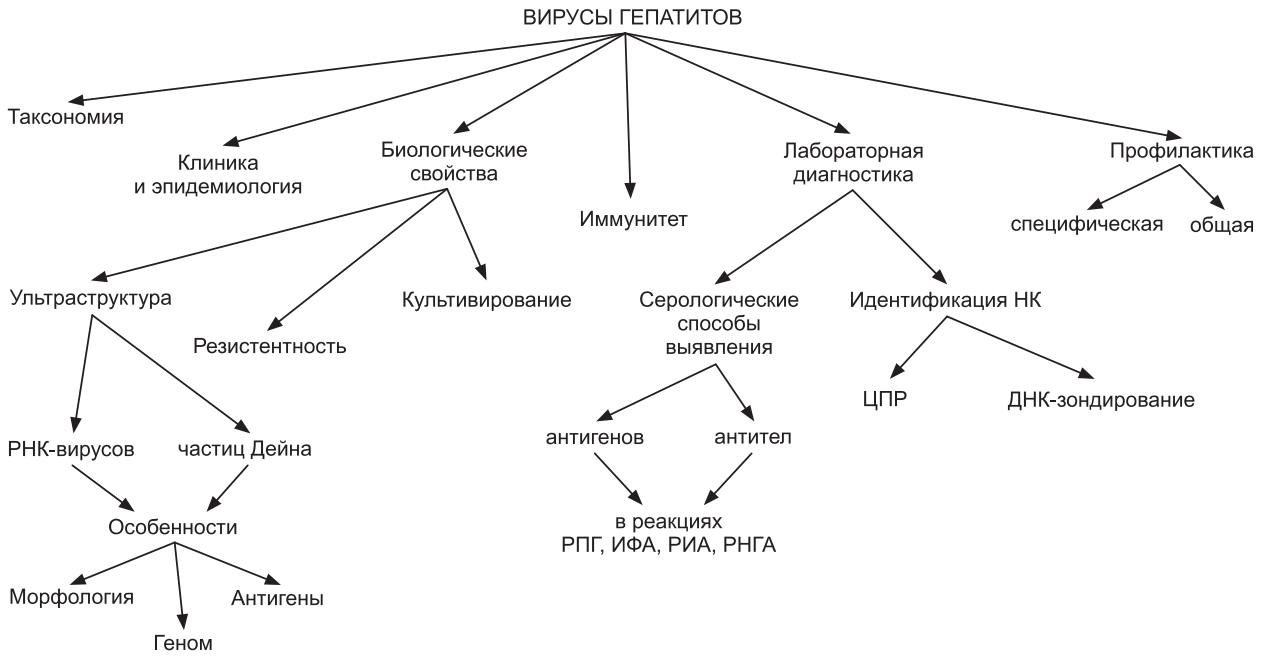
Профилактика и лечение. В комплексе мер общей профилактики ВГА предусматриваются соблюдение личной и общественной гигиены, своевременная изоляция больных, текущая и заключительная дезинфекция, направленные на прерывание многочисленных путей фекально-орального механизма передачи инфекции. Проводившаяся ранее пассивная профилактика иммуноглобулином ВГА у детей оказалась безуспешной. В настоящее время с целью его профилактики применяют вакцины Геп-А-ин-Вак (Россия), Вакта (США), Хаврикс (Бельгия), Аваксим (Франция), содержащие разные штаммы вируса гепатита А, инактивированные формалином и адсорбированные на гидроксиде алюминия. При этом российская и американская вакцины выпускаются во флаконах, а бельгийская и французская, кроме того, в шприцах. Все они используются по эпидемическим показаниям и взрослым вводятся внутримышечно в дельтовидную мышцу по 0,5–1 мл, а детям – в переднебоковую область бедра по 0,25–0,5 мл, применяя для годовалых вакцину Хаврикс, для двухлетних – Вакта или Аваксим, а для трехлетних детей – Геп-А-ин-Вак. Создание прочного иммунитета достигается повторными прививками. Например, ревакцинация Геп-А-ин-Вак у взрослых проводится спустя 1 и 6 мес., а у детей – через 1 мес.

Для специфической профилактики ВГВ широко используются несколько рекомбинантных вакцин, в частнос-

ти жидкие вакцины для парентерального введения H-B-VAX II и Engerix-A, представляющие собой адсорбированные на гидроксиде алюминия очищенные HBsAg, извлеченные из культуры рекомбинантного штамма *Saccharomyces cerevisiae*, в геном которого встроен кодирующий его ген гепаднавируса. По защитному эффекту они идентичны вакцинам из плазменного HBsAg, но, в отличие от них, не вызывают аллергических реакций. Обладают высокой иммуногенностью и хорошо переносятся даже новорожденными. Вакцины вводятся внутримышечно, но не в ягодичную область, как обычно, а в дельтовидную мышцу, где они лучше рассасываются. Детей по календарю профилактических прививок иммунизируют в первые сутки с момента рождения, через 1 мес. и в 5-месячном возрасте, каждый раз вводя им по 0,5 мл вакцины, содержащей 2,5 мкг HBsAg (H-B-VAX II) или 10 мкг HBsAg (Engerix-A). Ревакцинацию проводят в 13 лет одной инъекцией вакцины, содержащей вдвое больше HBsAg. Взрослых иммунизируют дозами 10 мкг HBsAg (H-B-VAX II) и 20 мкг HBsAg (Engerix) тоже трижды, с интервалом 1 мес. после первой инъекции, а после второй – 2 мес. Общая профилактика обеспечивается использованием одноразовых шприцев и систематическим контролем крови доноров на наличие HBsAg.

Специфическая профилактика вирусных гепатитов C, D, E, G не разработана. Полагают, что вакцина против гепатита B создает иммунитет также против гепатита D.

В качестве этиотропных препаратов для лечения вирусных гепатитов используют рекомбинантные интерфероны, в частности реаферон, фоскарнет, рибавирин и ламивудин, ингибирующие ДНК-полимеразу вируса гепатита B. Патогенетическая терапия строится с учетом клинических форм и стадий заболевания. Так, больным легкими формами вирусного гепатита назначают щадящую, полноценную и калорийную диету, рекомендуют витамины и обильное питье. При среднетяжелых формах болезни внутривенно вводят большие количества дезинтоксикационных средств. При тяжелой интоксикации показаны инфузии плазмы, цельной одногруппной резус-совместимой крови, преднизолон и другие гормоны, а в случае гепатодистрофии – антибиотики для подавления гнилостной микрофлоры кишечника и защиты печени от их эндотоксинов.


ВИРУСЫ ГЕПАТИТОВ
Таксономия
Клиника
и эпидемиология
Биологические
свойства
Иммунитет
Лабораторная
диагностика
Профилактика
специфическая
общая
Ультраструктура
Резистентность
Культивирование
Серологические
способы
выявления
Идентификация НК
ЦПР
ДНК-зондирование
РНК-вирусов
частиц Дейна
антигенов
антител
в реакциях
РПГ, ИФА, РИА, РНГА
Особенности
Морфология
Геном
Антигены

Граф 102

Пикорнавирусы полиомиелита, Коксаки- и ЭКХО-инфекций

Клиника и эпидемиология. Пикорнаэнтеровирусные инфекции проявляются внезапным повышением температуры, слабостью, нередко катаральными явлениями верхних дыхательных путей и расстройством кишечника.

При наиболее частой, спинальной форме полиомиелита температура через 1–2 дня резко снижается, и вслед за этим в ближайшие часы возникает паралич проксимального отдела нижней конечности (редко – двух) как следствие разрушения полиовирусом двигательных нейронов передних рогов спинного мозга. Коксаки- и ЕСНО-инфекции – лихорадочные болезни с синдромами поражений сердца и, реже, центральной нервной системы, но без параличей. Кроме того, вирусы Коксаки являются этиологическим фактором эпидемической миалгии и тяжелой пустулезной ангины, а вирусы ЕСНО – гастроэнтеритов и диарей.

Источником всех трех энтеровирусных инфекций является больной человек и вирусоноситель. Наиболее восприимчивы к ним дети в возрасте 4 мес.– 10 лет.

Энтеровирусы передаются фекально-оральным путем, а в ранние периоды заболевания при ангине и катарах верхних дыхательных путей – аэрогенно-капельным.

В отличие от Коксаки- и ЕСНО-инфекций, полиомиелит – управляемая инфекция. Так, Американский, Западно-Тихоокеанский и Европейский регионы мира сертифицированы ВОЗ как свободные от этой инфекции. В Республике Беларусь, в частности, вот уже более 30 лет не выделяются дикие типы полиовируса.

Биологические особенности энтеровирусов. *Ультраструктура и свойства.* Структура энтеровирусов очень проста. Они содержат цельнолинейную однонитчатую РНК, обладают кубической симметрией и икосаэдральной формой капсида (рис. 121). Диаметр вирусных частиц варьирует от 20 до 30 нм. Так как в составе энтеровирусов отсутствуют липиды, то они устойчивы к эфиру и жирорастворителям. Резистентны также к 70-гра-

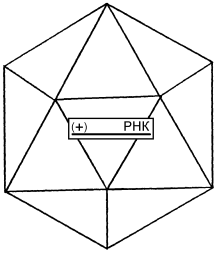


Рис. 121. Пикорнаэнтеровирусы

дусному спирту, 5 %-ному лизолу, 3 %-ному фенолу, резкому понижению и повышению pH, неделями сохраняются при комнатной температуре; чувствительны к формальдегиду, соляной кислоте (0,1 %-ный раствор), хлору (0,3–0,5 мг/л). Пастеризация молока при температуре 61,5 °С в течение 30 мин обеспечивает полную гибель энтеровирусов, а при температуре 100 °С они погибают мгновенно.

Патогенность для животных. К полиовирусу чувствительны шимпанзе, макаки-резус и зеленые мартышки, а серотип 2 вызывает заболевание у хлопковых крыс и белых мышей. Таким же спектром патогенности обладают некоторые серологические типы Коксаки А, а все другие вирусы Коксаки болезнетворны только для мышей-сосунков. Вирусы ЕСНО не патогенны для лабораторных животных.

Распространение. Энтеровирусы широко распространены в природе. Основными их резервуарами в окружающей среде являются фекалии и хозяйственно-бытовые сточные воды. В речной и водопроводной воде энтеровирусы выживают при температуре 18–20 °С около 1 мес., на овощах и фруктах – 10–20 дней, в почве – месяцами. В связи с этим возникает необходимость систематического определения зараженности внешней среды энтеровирусами и проведения профилактических мероприятий.

Иммунитет. После заражения энтеровирусами прежде всего вырабатываются вируснейтрализующие антитела, которые сохраняются на протяжении всей жизни. Комплементсвязывающие и преципитирующие антитела возникают позже и через несколько месяцев могут совсем исчезнуть. Кроме гуморального иммунитета, развивается местная тканевая резистентность, по-видимому, обусловленная наличием в кишечнике повышенного содержания вируснейтрализующих антител, относящихся к IgAS. Постинфекционный иммунитет – стойкий, но имеет типоспецифический характер. Не болевшие приобретают иммунитет путем неприметной иммунизации при вирусоносительстве или после абортивных форм энтеровирусных инфекций.

Лабораторная диагностика энтеровирусных инфекций. В первые дни заболевания вирусы полиомиелита, Коксаки и ЕСНО циркулируют в крови, в течение 1–2 недель находятся в носоглотке и кале. Следовательно, выде-

лить энтеровирусы ранее всего можно из крови, позже – из смывов носоглотки и, главное, фекалий. Используя последние, вначале получают осветленную суспензию, встряхивая 2 г фекалий в 10 мл раствора Хенкса с наличием в нем 0,5 мл хлороформа и стеклянных бус, после чего 20 мин центрифугируют при 3000 об/мин и температуре 4 °С. Далее, в целях стандартизации исследования, по рекомендации экспертов ВОЗ, осветленная суспензия фекалий по 2,5–3 мл засевается на свежевыросшие 24–48-часовые монослои трех перевиваемых линий клеток: 1) RD, полученной из рабдосаркомы человека, на которой хорошо размножаются полио- и ECHO-вирусы; 2) HEp-2 Cincinati, селекционированной из эпителиоидной карциномы, предназначенной для выделения полио- и Коксаки-В-вирусов; 3) L20B, созданной на основе мышиных клеток с помощью методов генетической инженерии, на которой размножаются только полиовирусы.

Культивируют энтеровирусы в ультратермостате при 36 °С, ежедневно микроскопируя инфицированные клетки в течение 7 сут на предмет обнаружения цитопатического эффекта. Обнаружив в клеточном пласте первые признаки ЦПД, наблюдение продолжают до охвата в процесс дегенерации 75 % монослоя, после чего устанавливают видовую и типовую принадлежность энтеровируса в РН на той же линии клеток, в которой его получили. В частности, для типирования полиовируса используют трехвалентную 1+2+3 и двухвалентные сыворотки к типам 1+2, 1+3, 2+3, которые, смешав с культуральной жидкостью (по 0,2 мл каждого компонента), вносят в свежесформированный монослой. Поместив смеси в ультратермостат, тип полиовируса устанавливают по иммунной сыворотке, обеспечивающей нормальное развитие монослоя. Обработанный в гетерологичных сыворотках полиовирус вызывает такое же разрушение монослоя, как и интактный. В культурах клеток под слоем агара энтеровирусы образуют разной формы и величины бляшки. При окраске нейтральным красным они имеют вид светлых пятен на фоне окрашенного монослоя.

Коксаки-вирусы часто выделяют, заражая патологическим материалом 1–4-дневных мышей-сосунков. При этом Коксаки А вызывают у них генерализованный миозит, а Коксаки В – очаговые миозиты и дистрофические изменения в межлопаточном буром жире. Для идентифи-

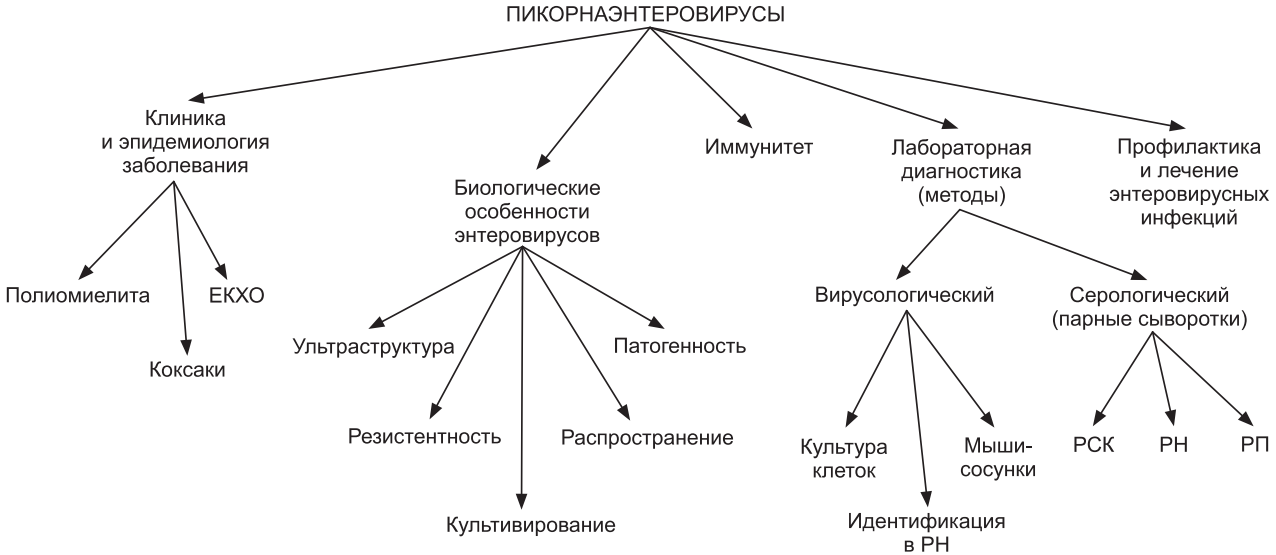
кации типов вирусов Коксаки реакцию нейтрализации ставят на новорожденных мышах.

Серодиагностика. Используется для ретроспективной диагностики. При этом ставят РН, реже – РСК. Кровь у больных берут в первые дни заболевания и спустя 2–3–4 недели после начала болезни. Антигеном служат стандартные дозы вируса или культуральная жидкость с высоким его содержанием. Достоверность диагноза подтверждается 4-кратным нарастанием титра антител во второй сыворотке.

Абсолютное диагностическое значение имеют одновременное выделение энтеровирусов из крови, спинномозговой жидкости и значительное нарастание титра антител в парных сыворотках. Точная диагностика полиомиелита, Коксаки- и ЕСНО-инфекций в последние годы стала основываться на методах идентификации НК с помощью ДНК-зондирования и полимеразной цепной реакции.

Профилактика и лечение энтеровирусных инфекций. Специфическая профилактика проводится только в отношении полиомиелита. Чаще всего применяется живая ослабленная вакцина Сейбина, которая представляет собой смесь адаптированных к эпителию кишечника трех типов полиовируса, полученных на первичной культуре клеток почек африканских зеленых мартышек. Она выпускается в виде жидкого препарата красновато-оранжевого цвета и принимается через рот. Первичную иммунизацию этой вакциной начинают с 3-месячного возраста, вводя ребенку за 1 ч до еды капельницей 0,2 мл препарата *per os* с последующими повторениями в 4 и 5 мес. Детей ревакцинируют однократно в 1,5 года, 2 и 6 лет. Во многих странах для профилактики полиомиелита используют трехвалентную вакцину Солка, содержащую инактивированные формалином три антигенных типа полиовируса. Она вводится внутримышечно или подкожно. Благодаря массовой вакцинации детского населения заболеваемость полиомиелитом снизилась до единичных случаев. При общении с больным полиомиелитом все контактные люди должны получить оральную полиомиелитную вакцину; полностью привитым назначают одну дозу, а непривитым – три (по схеме первичной иммунизации).

Получить вакцины против других энтеровирусных инфекций не удается из-за наличия большого количества серотипов вирусов Коксаки и ЕСНО. Специфических средств лечения энтеровирусных инфекций нет.


ПИКОРНАЭНТЕРОВИРУСЫ
Клиника и эпидемиология заболевания
Биологические особенности энтеровирусов
Иммунитет
Лабораторная диагностика (методы)
Профилактика и лечение энтеровирусных инфекций
Полиомиелита
ЕКХО
Коксаки
Ультраструктура
Патогенность
Резистентность
Распространение
Культивирование
Вирусологический
Серологический (парные сыворотки)
Культура клеток
Мыши-сосунки
Идентификация в РН
РСК
РН
РП

Граф 103

Риновирусные инфекции

Как и все пикорнавирусы, род *Rhinovirus* представлен маленькими (22–30 нм) вирионами, в составе которых находится цельная однонитчатая +РНК, связанная с белком VPg. По структуре типоспецифического антигена среди них различают 113 серотипов, а по способности к репродукции в клетках приматов – Н- и М-группы. Так, вирусы Н (*human*) размножаются и вызывают цитопатические изменения в диплоидных клетках человеческого эмбриона R-линии клеток HeLa, а вирусы группы М (*monkey*) – в клетках почек обезьян, почек эмбриона человека и перевиваемых линиях человеческих клеток.

Клиника и эпидемиология. Риновирусные инфекции проявляются острым ринитом (насморком), вслед за которым могут возникать хронический бронхит, воспаление придаточных носовых пазух и среднего уха. Реже риновирусы вызывают бронхопневмонию. Источниками инфекции являются больные люди, выделяющие возбудитель за 2 дня до заболевания и на протяжении 2–3 сут после его начала. Риновирусы передаются аэрозольным путем. Риновирусные инфекции регистрируются во все сезоны года, но чаще в осенне-зимний период.

Лабораторная диагностика. Основана на выделении вирусов из носового секрета путем заражения вышеперечисленных культур клеток с последующей идентификацией их в реакции нейтрализации.

Специфическая профилактика и терапия риновирусных инфекций не разработаны.

Реовирусы респираторных и кишечных инфекций

Клинико-эпидемиологические особенности. Для человека патогенны четыре рода реовирусов – собственно реовирусы, ротавирусы, орбивирусы и колтивирусы. Собственно реовирусы вызывают острые катары дыхательных путей и гастроэнтериты, ротавирусы – гастроэнтериты, составляющие около 60 % всей кишечной патологии у детей младшего возраста, а орби- и колтивирусы – общелихорадочные инфекции с гиперемией конъюнктивы и кожи, головной и мышечной болью, сонливостью.

Источником реовирусных инфекций являются больные и здоровые носители, а колти- и орбивирусных – также грызуны и птицы. Передаются реовирусы воздушно-капельным и фекально-оральным путем, ротавирусы – только фекально-оральным, орбивирусы – аэрозольным путем и кровососущими членистоногими, в частности, мокрецами, клещами, комарами, москитами.

Ультраструктура. Реовирусы представляют собой простые вирусы, покрытые псевдомембраной клеточного происхождения. Они отличаются тем, что содержат двунитчатую линейную РНК, состоящую из 10–12 фрагментов. Капсид реовирусов двухслойный. При этом его структура у ротавирусов напоминает колесо со спицами, а у орбивирусов – сплошное кольцо. Диаметр нуклеокапсида – 60–75 нм (рис. 122).

Белки и антигены. Реовирусы содержат от четырех (ротавирусы) до восьми (собственно реовирусы) структурных полипептидов. Те из них, которые составляют наружный

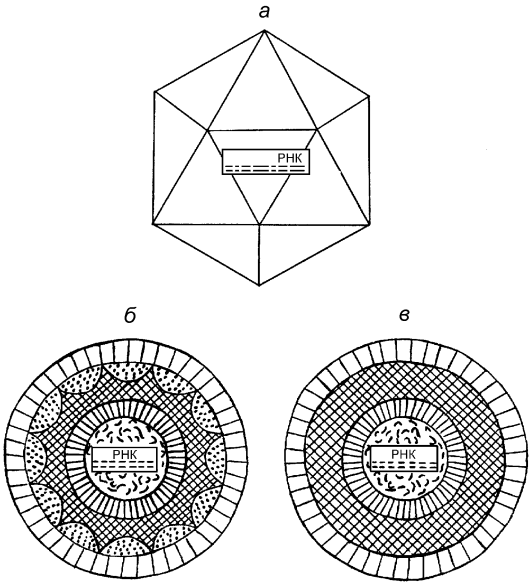


Рис. 122. Реовирус (*а*), ротавирус (*б*), орбивирус (*в*)

капсид, являются типоспецифическими антигенами, а входящие в состав внутреннего капсида – групповыми антигенами. Типоспецифические белки обладают способностью агглютинировать эритроциты человека 0-группы. В сердцевинах реовирусов имеется РНК-полимераза, а у собственно реовирусов – также фосфогидролаза, гуанил- и метилтрансфераза.

Резистентность. Реовирусы устойчивы к эфиру и детергентам, относительно резистентны к дезинфицирующим веществам. Разрыхление капсидов протеолитическими ферментами приводит к усилению инфекционной активности реовирусов, возможно, потому, что облегчает раздевание вирионов в клетках.

Лабораторная диагностика. Реовирусы обнаруживаются в крови, носоглоточных смывах и фекалиях. Выделить из материалов больных удается лишь собственно рео-, орби- и колтивирусы, заражая ими культуры почек обезьян, перевиваемые линии клеток, куриные эмбрионы, хомяков и помет белых мышей. Идентифицируют вирусы с помощью РН, РСК и РТГА, применяя эталонные типоспецифические сыворотки. Нарастание титра антител в парных сыворотках определяют с помощью тех же реакций, используя в качестве антигена культуральную жидкость инфицированных культур клеток. Диагноз – ротавирусный гастроэнтерит – подтверждается при обнаружении в электронном микроскопе соответствующего вируса в фекалиях больных, а при наличии родственной по антигенной структуре культуры ротавирусов животных – путем определения титра антител в парных сыворотках с помощью РСК и РТГА.

Специфическая профилактика и терапия реовирусных инфекций отсутствуют.

Коронавирусы респираторных и кишечных инфекций

Коронавирусы вызывают у человека респираторные инфекции, в частности атипичную пневмонию SARS, отличающуюся высокой контагиозностью и летальностью, а при вирусемии – энтериты. Передаются от больных воздушно-капельным путем.

РЕОВИРУСНЫЕ И КОРОНАВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ
Клиника и эпидемиология
реовирусных
коронавирусных
респираторных и кишечных инфекций
Биологические особенности вирусов
Ультраструктура
Белки и антигены
Резистентность
Лабораторная диагностика
реовирусных (методы)
инфекций
коронавирусных (методы)
вирусологический
серологический (РСК, РТГА)
Вирусоскопия (РИФ)
Серодиагностика (РСК, РТГА, РН)
Культура клеток
Куриные эмбрионы, животные
Идентификация рео-, орби- и колтивирусов в РН, РСК, РТГА

Граф 104

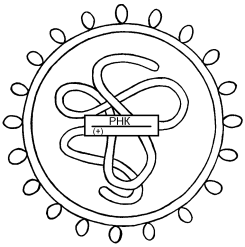


Рис. 123. Коронавирусы

Биологические особенности коронавирусов. Вирионы имеют округлую форму с частоколом булавовидных выступов вокруг. Диаметр их – от 75 до 160 нм. В сердцевине вириона различают центральное тело (нуклеокапсид) и матрикс, отделяющий его от липопротеидной оболочки (рис. 123). Геном коронавирусов представлен однонитчатой цельной плюс-нитевой РНК. В составе вирионов содержатся белок нуклеокапсида, гликопротеиды и матричный белок. По структуре антигенов их разделяют на четыре группы. Вирионы агглютинируют эритроциты кур, мышей и крыс. Культивируются в органных культурах трахеи, почек и кишечника эмбриона человека.

Лабораторная диагностика. Основана на использовании вирусоскопии и серологических способах определения титра антител в сыворотке больных. Материалами для вирусоскопии служат слизь из зева и серозное отделяемое из носа, в которых с помощью РИФ выявляют антигены вирусов. Нарастание титра вирусспецифических антител в парных сыворотках определяют в РСК, РТГА и РН.

Специфических средств профилактики и лечения коронавирусных инфекций нет.

Поксвирус натуральной оспы

Клиника и эпидемиология. Классическая форма оспы человека (*variola mayor*) – особо опасная инфекция с летальностью, превышающей 50 %. Заболевание начинается с лихорадки, болей в крестце и икроножных мышцах. Продромальная стадия вирусной интоксикации длится 2–3 дня и заканчивается внезапным снижением температуры. Вслед за этим на лице, а далее, последовательно – на руках, туловище и ногах появляются кожные высыпания. Вначале сыпь имеет вид бледно-розовых пятен (макулы), которые поэтапно, с интервалом 2–3 дня, превращаются в узелки (папулы), а затем в многокамерные пупкообразные пузырьки-жемчужины (везикулы), окаймлен-

ные венчиком гиперемии. На 8 – 9-й день везикулы нагнаиваются и образуются пустулы. Процесс нагноения сопровождается вторичной лихорадкой. При подсыхании пустул и образовании корок отмечается мучительный зуд. При благоприятном исходе болезнь заканчивается на 30–40-й день полным отпадением корок. На их месте остаются звездчатые рубцы. При геморрагической (черной) оспе в элементы сыпи проникает кровь, и они становятся темно-багровыми. Обычно черная оспа не оставляет надежды на выздоровление.

Легкие формы натуральной оспы (*variola minor*) характеризуются сглаженностью клинической симптоматики, укороченным циклом развития сыпи, локализованностью зон высыпаний, низкой контагиозностью и невысокой летальностью. Встречается также оспа без сыпи.

Источником инфекции является больной человек. Механизм передачи в основном воздушно-капельный, но инфицирование происходит также пылевым и контактным путями.

Совместными усилиями мирового сообщества натуральная оспа ликвидирована. Последний случай заболевания оспой был зарегистрирован в 1977 г. в Сомали. Для этого потребовалось около 20 лет планомерной вакцинации всего населения Земли под эгидой ВОЗ. С 1980 г. прививка противооспенной вакциной повсеместно отменена. Но настороженность в отношении натуральной оспы все-таки осталась. Дело заключается в том, что в период ее ликвидации в некоторых районах Африки были открыты очаги оспы обезьян, вирусы которой, как, например Тана, циркулирующий в долине одноименной реки и озера в Кении, могут вызвать генерализованное заболевание у человека. Патогенными для людей являются также поксвирусы коровьей оспы узелков доильщиц, и болезни ОРФ, резервуаром которой являются в основном овцы.

Биологические особенности вируса. *Ультраструктура.* Вирионы оспы – сложные ДНК-содержащие вирусы кирпичеобразной формы размером 150–200 × 300 нм. На ультратонких срезах зрелых вирусных частиц различают вироплазму, нуклеоид в виде двояковыпуклой линзы, напоминающей восьмерку, два боковых тела и внешнюю липопротеидную оболочку (рис. 124).

Белки и антигены. В составе вирионов содержится 30 структурных белков, включая ДНК-зависимую РНК-

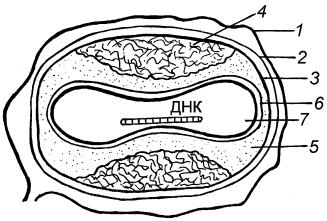


Рис.124. Поксвирус:
1 – остатки цитоплазматической мембраны; *2* – внешняя оболочка; *3* – внутренняя оболочка; *4* – боковое тело; *5* – вироплазма; *6* – внешняя оболочка нуклеоида; *7* – нуклеоид

полимеразу и около десятка других ферментов, связанных с транскрипцией ДНК и модификацией иРНК; 17 из них находятся в сердцевине вириона, а 13 – в оболочке. К структурным белкам относятся 4 антигена: общий для всего семейства поксвирусов NP-антиген, связанный с белком нуклеокапсида; растворимые термолабильный L- и термостабильный С-антиген; гемагглютинин-липопротеид, агглютинирующий эритроциты цыплят. Кроме того, вирионы имеют общие антигены с эритроцитами крови человека II и IV групп, в связи с чем эта категория людей отвечает запоздалой иммунной реакцией, что усугубляет тяжесть течения оспы.

Резистентность. Вирус оспы устойчив к эфиру и очень чувствителен к нагреванию. В высушенном состоянии сохраняет жизнеспособность месяцами. В течение 1 ч инактивируется под действием 1 %-ного раствора хлорной извести, 3 %-ных растворов хлорамина, лизола и фенола.

Иммунитет. Естественного иммунитета к натуральной оспе у людей нет. В процессе заболевания в крови больных обнаруживаются различные антитела, но прямой связи между их уровнем и напряженностью иммунитета установить не удается. В связи с этим предполагается, что противооспенный иммунитет обусловливается клеточными факторами и выработкой интерферона. У переболевших оспой возникает очень напряженный и длительный иммунитет, практически исключающий возможность реинфекции.

Лабораторная диагностика. Основывается на вирусоскопии патологического материала, выделении культуры поксвируса и ее идентификации. На первом этапе диагностики натуральной оспы из содержимого оспенных везикул и пустул готовятся мазки и обрабатываются методом серебрения по Морозову. Под иммерсионным

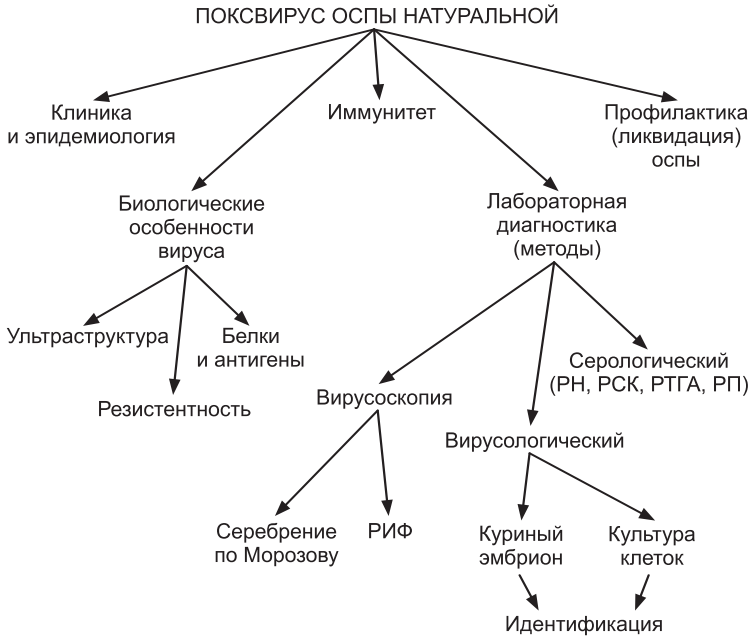
микроскопом обнаруживаются тельца Пашена. Дополнительное электронно-микроскопическое исследование позволяет уточнить ультраструктуру элементарных телец, а РИФ – их принадлежность к вирусам оспенной группы.

Выделить ортопоксвирус из везикул, пустул и крови легче всего удается путем заражения 3–12-дневных куриных эмбрионов. При нанесении материала, содержащего вирус, на ХАО образуются белые точечные и куполообразные бляшки. Вирус натуральной оспы выращивают также на различных культурах клеток. В первичных культурах он вызывает разобщение, округление и увеличение клеток с последующим разрушением монослоя. Подобный цитопатический эффект наблюдается также в перевиваемых культурах, но с той разницей, что в первые часы репродукции вируса отмечается пролиферативная реакция клеток. В зараженном монослое через 10–72 ч вирус образует цитоплазматические включения Гуарниери, а спустя 72–96 ч – бляшки. На заключительном этапе вирус оспы идентифицируют с помощью РН и РТГадс специфической сывороткой или иммуноглобулином.

Серодиагностика. Противооспенные антитела обнаруживаются в крови больных к концу первой недели заболевания. Для их выявления ставятся РН на куриных эмбрионах, РСК и РТГА. Антигеном служит вирус вакцины. Так как вируснейтрализующие, комплементсвязывающие антитела и гемагглютинины находятся в сыворотке крови вакцинированных лиц, то диагноз подтверждается по нарастанию их титра в парных сыворотках, взятых у больных с интервалами 7–10 дней.

Используя кроличью иммунную сыворотку, в везикуло-пустулезном содержимом и вытяжке из оспенных корок с помощью реакции микропреципитации в агаровом геле можно обнаружить оспенные антигены.

Специфическая профилактика. До 1980 г. противооспенный иммунитет создавался живой дермальной вакциной или ововакциной для накожного применения. В плановом порядке ими прививались новорожденные в возрасте 3–5 мес., а в случаях заболеваний оспой – все население. Кроме вакцин, при экстренной профилактике по эпидемическим показаниям назначался донорский противооспенный иммуноглобулин и метисазон.



Граф 105

ЗООАНТРОПОНОЗЫ

Лиссавирус бешенства

Клинико-эпидемиологические особенности бешенства. Бешенство (*rabies*, *lyssa*) у человека – острое заболевание, при котором избирательно поражаются нервные клетки гиппокампа, продолговатого мозга, мозжечка. Первыми симптомами болезни являются зуд и боли в области оставшегося от укуса рубца, повышенная чувствительность ко всевозможным раздражителям, нарушение сна и чувство тревоги. Пароксизм (приступ) бешенства развивается внезапно и проявляется вздрагиванием всего тела, судорогами глотательных и дыхательных мышц, интенсивным потоотделением. Позже, в результате поражения вирусом слюнных желез, начинается обильное слюнотечение. Про-

вокация повторных приступов наступает под влиянием шума льющейся из крана воды или при попытке напиться (гидрофобия), незначительного дуновения ветра (аэрофобия), яркого света (фотофобия), громкого разговора (акустикофобия). Параличи и парезы при бешенстве чрезвычайно разнообразны. В паралитической стадии возбуждение проходит, а спустя 1–3 дня при кажущемся выздоровлении внезапно наступает смерть.

Источником бешенства в дикой природе являются плотоядные животные, главным образом, лисицы, волки, шакалы, куницы, хорьки, барсуки, крысы, мышевидные грызуны, а в странах Южной Америки – летучие мыши-вампиры. В городских очагах заражение человека происходит от кошек и собак. Вирус бешенства передается через укус или ослюнение кожи. Инкубационный период составляет 30–90 дней, но может варьировать от 10 дней до 1 года.

Биологические особенности лиссавирусов. *Ультраструктура.* Лиссавирусы имеют пулевидную форму и размеры 170 × 70 нм. Нуклеокапсид вирионов представляет собой однонитчатую спираль РНК, окруженную оболочкой, состоящей из гликопротеидов, образующих шипики (рис. 125).

Белки, антигены, ферменты. Лиссавирусы содержат: белок N, образующий субъединицы нуклеокапсида и являющийся вместе с тем группоспецифическим антигеном; оболочечный гликопротеид G как протективный и типоспецифический антиген; матриксный белок, выстилающий с внутренней стороны внешнюю оболочку; РНК-полимеразу, протеинкиназу и трансферазу.

Резистентность. Лиссавирусы чувствительны к эфиру, хлороформу, этиловому спирту, йодистым препаратам, хлорамину, лизолу и повышенной температуре.

Культивирование. Репродуцируются лиссавирусы в культурах клеток почек хомяка, диплоидных клеток человека, эмбриона овцы и др.

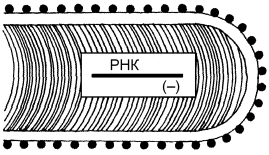


Рис. 125. Лиссавирус бешенства

Свойства вирусов бешенства. Циркулирующие в различных районах мира варианты вирусов бе-

шенства по биологическим, антигенным свойствам и типу репродукции более или менее однотипны, но различаются по степени патогенности, межорганной диссеминации в зараженном организме и способности к формированию внутриклеточных включений. Функциональная активность субвирусных структур неодинакова. Оболочечные белки вириона обусловливают иммуногенную активность, гликопротеиды – адсорбционную способность и гемагглютинирующие свойства.

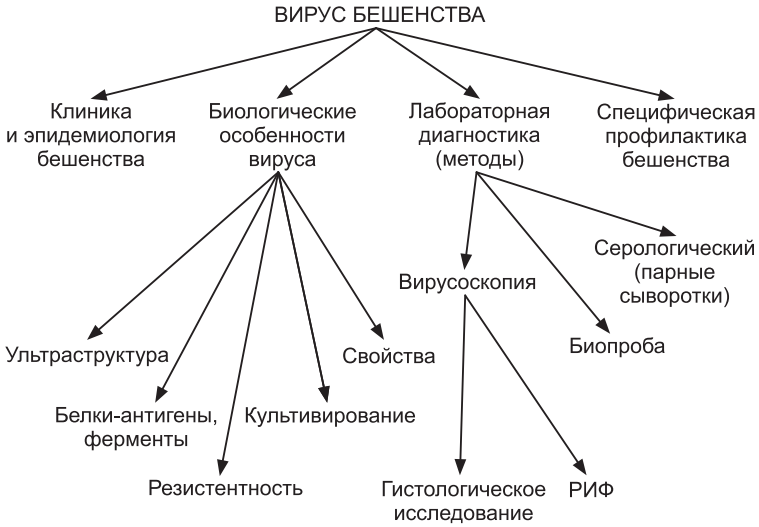
Лабораторная диагностика бешенства. Основана на выявлении цитоплазматических телец Бабеша – Негри в мазках и срезах мозга погибших животных или умерших людей (см. «Микроскопические способы обнаружения вирусов»). В настоящее время широко используется РИФ, с помощью которой удается выявить не только внутриклеточные включения, но и антигены лиссавируса. Важно подчеркнуть, что ее применяют также в интравитальной диагностике бешенства собак и людей. С этой же целью используют полимеразную цепную реакцию.

При отрицательных результатах вирусоскопии прибегают к биологическому эксперименту, вводя молодым мышам или 1–4-дневным сосункам под твердую мозговую оболочку эмульсию мозга или слюну павших от бешенства животных.

Серодиагностика. Для обнаружения специфических антител в сыворотке крови больных используют различные серологические реакции, но самой удобной из них является РН на мышах, применяющаяся также в оценке уровня иммунитета у привитых антирабическими вакцинами.

Специфическая профилактика бешенства. Антирабическую вакцину получил в 1882 г. Л. Пастер путем длительных пассажей через мозг кролика дикого вируса бешенства, превратив его в фиксированный вирус, который утратил вирулентность в отношении человека и собак. Для предупреждения бешенства у укушенных лиц в настоящее время предложено несколько типов вакцин, которые готовятся из мозга овец, сосунков белых крыс и кроликов, зараженных аттенуированным фиксированным вирусом бешенства, а в последнее время – из культур клеток, инфицированных им. Лучшей из них оказалась мало-

реактогенная лиофилизированная вакцина из производственного фиксированного вируса бешенства Внуково-32, выращенного на первичной культуре клеток почек сирийского хомяка. При этом концентрированная и очищенная вакцина с иммуногенной активностью 25 МЕ, инактивированная УФ-лучами и формалином, вводится с лечебно-профилактической целью в объеме 1 мл в дельтовидную мышцу в день обращения за медпомощью, на 3, 7, 14, 30 и 90-е сут, а Рабивак – Внуково-32, инактивированная ультрафиолетом с иммуногенной активностью 0,5 МЕ, в зависимости от тяжести укусов – в подкожную клетчатку живота по 3–5 мл на протяжении 7, 12, 18, 21-х сут с последующими 2–3 ревакцинациями (на 10 и 20-е или 10, 20 и 35-е сут после окончания основного курса вакцинации). При укусах верхних конечностей, плеча, туловища, шеи, лица, головы, особенно в тех случаях, когда они наносятся дикими плотоядными животными, грызунами или летучими мышами-вампирами, первую дозу вакцины сочетают с введением антирабических иммуноглобулинов (40 МЕ/кг – лошадиного или 20 МЕ/кг – человеческого).



Граф 106

Тогавирусы и флавивирусы основных природно-очаговых инфекций

Наиболее распространенными и эпидемиологически значимыми тогавирусными инфекциями с природной очаговостью являются два африканских (восточный и западный) и венесуэльский лошадиные энцефаломиелиты, а флавивирусными – желтая лихорадка, денге, комариный летне-осенний (японский), клещевые весенне-летние (дальневосточный) и восточноевропейский энцефалиты, а также омская геморрагическая лихорадка. Все они начинаются с внезапно возникающей лихорадки и сопровождаются интоксикацией, головными болями, желтухой, увеличением печени и селезенки, кровоизлияниями во внутренние органы и в кожные покровы, поражением сердечно-сосудистой системы и почек (желтая лихорадка); болями в суставах и мышцах, зудящими кожными высыпаниями и геморрагическими поражениями эндокарда, слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, брюшины, центральной нервной системы (денге); помрачением сознания, психическими расстройствами (энцефаломиелиты) с нарушениями витальных функций (лошадиные энцефаломиелиты) и эпилептическими припадками, гемипарезами и мозжечковыми расстройствами (японский энцефалит); развитием парезов и параличей мышц плечевого пояса и шеи (клещевой дальневосточный энцефалит). Летальность при этих тяжелейших инфекциях может достигать 10–20 %, а при желтой лихорадке, отнесенной в группу особо опасных карантинных инфекций, – 80–90 %. Сравнительно легко протекает омская геморрагическая лихорадка с кровоизлияниями различной локализации, летальность при ней не превышает 0,5–3 %.

Большая часть тога- и флавивирусных инфекций встречается в Южной Америке и Африке. Их выраженная зональность связана с природными взаимоотношениями между источником болезни, переносчиком и условиями среды обитания (ландшафтные, климатические, погодные). Источниками природно-очаговых инфекций служат всевозможные животные (чаще мышевидные грызуны) и птицы, сезонные миграции которых могут способствовать трансконтинентальному обмену тогавирусами. Заражение людей в основном происходит трансмиссивным путем

через укусы членистоногих, от которых выделено больше трети известных тога- и флавивирусов. Половина из них получена от комаров, главным образом *Culex* и *Aedes*, около четверти – от клещей, 7 % – от мокрецов, 4 % – от москитов. Передающиеся ими вирусы составляют особую группу, которую называют арбовирусами (***ar**thropoda* – членистоногие, ***bo**rne* – рожденные). Кроме трансмиссивного механизма заражения тога- и флавивирусами, возможны и другие пути – контактный, алиментарный, пылевой, свойственные робовирусам, циркуляция которых в природе связана с грызунами (***ro**dent* – грызун + ***bo**rne*). В тропическом поясе температурные условия обеспечивают круглогодичную циркуляцию вирусов, которая может прекращаться или затрудняться во время сухого сезона. В умеренном климатическом поясе тога- и флавивирусные инфекции распространяются в весенне-летний период года преимущественно иксодовыми клещами, являющимися к тому же резервуарами вирусов в природе, передавая их потомству трансовариальным путем.

Биологические особенности тога- и флавивирусов. *Ультраструктура.* Тога- и флавивирусы – это РНК-содержащие вирусы сферической формы. Диаметр тогавирусов 50–70 нм, а флавивирусов – 35–50 нм. Вирионы тех и других состоят из нуклеокапсида и тесно прилегающей к нему липопротеиновой оболочки с шипиками у флавивирусов длиной 5 нм, а у тогавирусов – 10 нм (рис. 126).

Белки и антигены. Тога- и флавивирусы содержат одинаковый нуклеокапсидный С-белок, отличающийся лишь по молекулярной массе. Группо- и видоспецифические антигены находятся у них во внешней оболочке и у тогавирусов представлены двумя суперкапсидными гликопротеинами V1 и V2, а у флавивирусов – гликопротеином и чистым протеином.

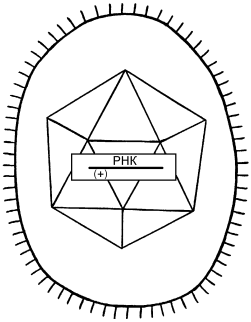


Рис.126. Тога- и флавивирусы

Резистентность. Тога- и флавивирусы чувствительны к эфиру и органическим растворителям, инактивируются протеазами, разрушаются при кислых и резко щелочных значениях pH, погибают при температуре 56–60 °С в течение 30–60 мин.

Свойства. Попадая в кровоток, тога- и флавивирусы репродуцируются в эндотелии сосудов и, повреждая капилляры, вызывают пятнисто-папулезную сыпь и токсикоз. Повторно проникая в кровь, они диссеминируют в различные органы и ткани, где вызывают воспалительно-некротические процессы. Обладают гемагглютинирующими свойствами, из них около 60 % агглютинируют эритроциты гусей. Некоторые тогавирусы вызывают лизис эритроцитов различных животных и птиц. Размножаются в цитоплазме многих первичных и перевиваемых клеток, однако только в некоторых из них проявляют ЦПД.

Лабораторная диагностика. Тога- и флавивирусы выделяют из крови больных и спинномозговой жидкости умерших. С этой целью чаще всего используют клетки почек свиньи или сирийского хомяка, куриные фибробласты, линию клеток от комаров *Aedes albopictus*. Цитопатический эффект наступает через несколько дней в виде изменений формы клеток с последующей дезинтеграцией цитоплазмы и ядер.

Хорошо размножаются в куриных эмбрионах, лучше всего – в желточном мешке. Их выделяют также путем интрацеребрального и внутрибрюшинного инфицирования мышей-сосунков и золотистых хомяков. Через 2–6 дней отмечается поражение бурого жира, внутренних органов и, главное, центральной нервной системы с развитием параличей.

Видовую принадлежность тога- и флавивирусов определяют с помощью РСК, РТГА и РН на мышах и культурах клеток. Для групповой идентификации используют политиповые сыворотки, полученные иммунизацией белых мышей тканевой суспензией, зараженной несколькими вирусами.

Серодиагностика. Природа заболеваний устанавливается с помощью тех же серологических реакций, которые применяются для идентификации тога- и флавивирусов. При наличии парных сывороток, из которых одна взята в разгар болезни, диагностическое значение имеет четырехкратное увеличение титра антител в сыворотке, полученной спустя 2–3 недели.

Специфическая профилактика и лечение. Вакцинопрофилактика широко и с большим успехом используется

в борьбе с желтой лихорадкой, клещевым энцефалитом и омской геморрагической лихорадкой.

При этом прививка против желтой лихорадки производится ослабленным вакцинным штаммом флавивируса 17Д, полученным М. Тейлором при длительном пассировании вируса в культуре ткани, или штаммом Даккар, ослабленным путем многократных внутримозговых пассажей на белых мышах. Обе вакцины после однократного подкожного введения создают прочный иммунитет сроком на 10 лет. Для профилактики клещевого весенне-летнего энцефалита используют две культуральные инактивированные вакцины: концентрированную сухую и сорбированную жидкую. Первая предназначена для вакцинации взрослых, второй можно иммунизировать детей, начиная с 4 лет. Курс вакцинации сухой концентрированной вакциной состоит из двух подкожных прививок по 0,5 мл (осенью и весной) с последующей ревакцинацией через 1–2 года, весной. Жидкую сорбированную вакцину вводят трижды – первые две прививки делают осенью с интервалом 2–4 недели, третью – через 3 мес., весной.

К достоинству противоклещевой вакцины следует отнести прежде всего то, что она создает перекрестную устойчивость к омской геморрагической лихорадке. Срочная профилактика тогавирусных инфекций проводится вирусспецифическими иммуноглобулинами, которые в первые дни болезни могут быть, в частности, использованы для лечения клещевого энцефалита и омской геморрагической лихорадки.

Краснушная инфекция

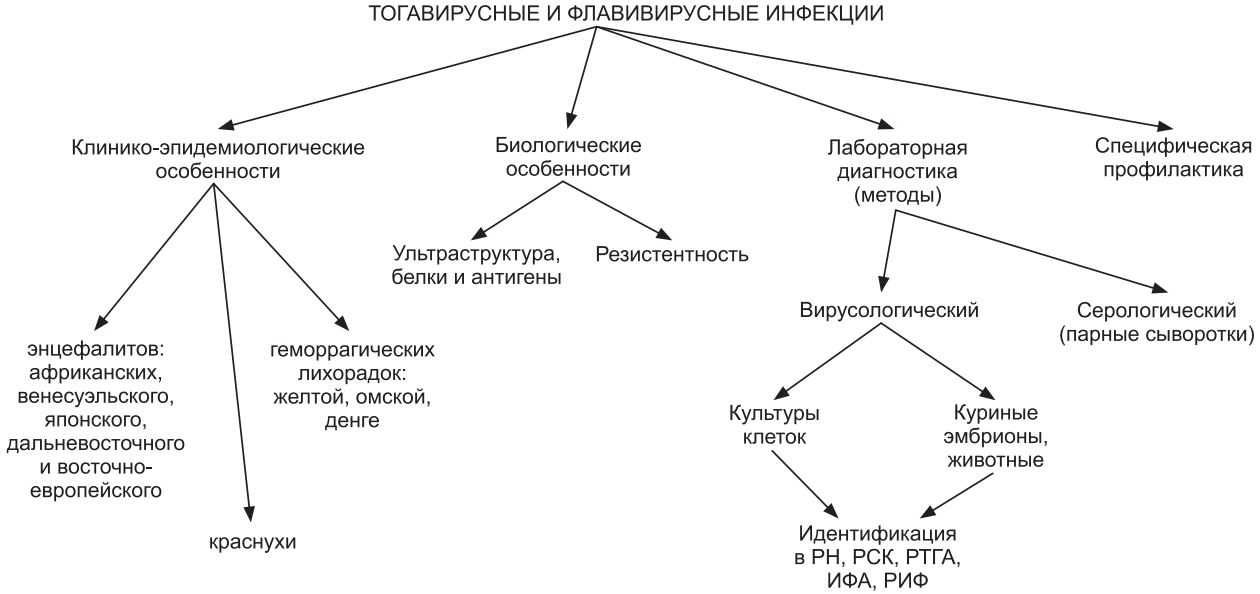
Вирус краснухи, или *Rubivirus* – единственный представитель одноименного рода сем. *Togaviridae*, который вызывает заболевание только у человека. Как и все тогавирусы, рубивирус имеет сферическую форму. Диаметр его вирусных частиц варьирует от 50 до 60 нм. Геном образован цельной молекулой +РНК. В оболочке рубивируса содержатся гликопротеины E_1, агглютинирующие эритроциты кур, и E_2-рецепторы к клеткам-мишеням. Антигены у всех штаммов одинаковы. Инфицируя человека, ру-

бивирусы вначале размножаются в верхних отделах дыхательных путей, а через неделю проникают в кровоток и диссеминируют в различные органы.

Клиника и эпидемиология. Краснуха – остропротекающая инфекция, проявляющаяся у детей кратковременной лихорадкой с увеличением лимфатических узлов, главным образом затылочных, и обильной мелкоточечной бледно-розовой сыпью на руках и ногах, спине и ягодицах, бесследно исчезающей через несколько дней. У взрослых протекает тяжело и при осложнении краснушными энцефалитами и энцефаломиелитами в 20–50 % случаев заканчивается смертельным исходом. Чрезвычайно опасна для беременных женщин и плода, так как провоцирует аборты и повреждает ткани всех зародышевых листков эмбриона. Наибольшую опасность представляет трансплацентарное инфицирование плода в первые 3 мес. беременности, когда риск развития патологии у него составляет 30–50 %. Источником обычной краснушной инфекции является больной, от которого вирус передается здоровым аэрозольным путем.

Лабораторная диагностика. Выделяют рубивирус, заражая отделяемым носоглотки культуры клеток амниона человека, почек кроликов и обезьян, размножаясь в которых, он оказывает ЦПД и проявляет эффект интерференции, защищая клетки от ЦПД других вирусов, что используется в его идентификации. Агглютинирует эритроциты кур, голубей, гусей и вызывает их гемолиз, что позволяет идентифицировать рубивирус в РН гемолитической активности. В серодиагностике применяют РСК, РТГА и ИФА, определяя в парных сыворотках больных титр нарастания иммуноглобулинов. Серологическое исследование беременных проводят после контакта с больным краснухой. Выявление у них IgM указывает на текущую или недавно перенесенную краснушную инфекцию.

Специфическая профилактика и лечение. В профилактике краснухи используется вакцина Тримовакс, в которой помимо ослабленного рубивируса содержатся аттенуированные вирусы кори и эпидемического паротита. Вводится она детям по истечении 1 года и в 6 лет. Лечение краснухи симптоматическое.


ТОГАВИРУСНЫЕ И ФЛАВИВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ
Клинико-эпидемиологические особенности
Биологические особенности
Лабораторная диагностика (методы)
Специфическая профилактика
Ультраструктура, белки и антигены
Резистентность
Вирусологический
Серологический (парные сыворотки)
энцефалитов: африканских, венесуэльского, японского, дальневосточного и восточно-европейского
краснухи
геморрагических лихорадок: желтой, омской, денге
Культуры клеток
Куриные эмбрионы, животные
Идентификация в РН, РСК, РТГА, ИФА, РИФ

Граф 107

Буньявирусы геморрагических лихорадок

Клиника и эпидемиология. Все буньявирусные инфекции – природно-очаговые болезни, обусловленные тесной взаимосвязью существования и выживания источника инфекции и переносчика. Вызываются они арбо- и робовирусами. Особенно широко распространены буньявирусные инфекции в субтропиках и тропическом поясе, но некоторые из них встречаются на многих материках, как, например, конго-крымская геморрагическая лихорадка, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, флеботомная москитная лихорадка. Проявляются они внезапно возникающей лихорадкой с головными и мышечными болями, конъюнктивитом, кишечными коликами и церебральной гипертензией (москитная лихорадка), пятнисто-папулезными кожными высыпаниями, носовыми кровотечениями, многократной и подчас кровавой рвотой (конго-крымская лихорадка). При геморрагической лихорадке с почечным синдромом одновременно развивается олигурия или даже анурия.

Источником инфекции при москитной лихорадке является больной человек в стадии генерализованной вирусемии, а переносят ее самки москита *Phlebotomus papatasii*, вследствие чего заболевание называется также флеботомной лихорадкой или лихорадкой паппатачи. Распространена она на побережье Средиземного моря, в Индии, Африке, США, Крыму, на Кавказе.

Резервуаром вируса геморрагической лихорадки с почечным синдромом, который включен в род *Hantavirus*, могут быть различные грызуны, выделяющие его со слюной, мочой и фекалиями. Передается он контактным, воздушно-пылевым и алиментарным путями. Заболевание регистрируется на Дальнем Востоке, Урале, в Ярославской области, в Закарпатье и Скандинавии.

Источниками и переносчиками вируса конго-крымской геморрагической лихорадки, отнесенного к роду *Nairovirus*, являются пастбищные клещи родов *Hyaloma* и *Dermacentor* (циркуляцию вируса поддерживают зайцы, коровы, овцы). От больного человека вирус передается контактным путем.

Летальность от конго-крымской лихорадки может достигать 30–40 %, от флеботомной – около 5 %. Летальные исходы от геморрагической лихорадки с почечным синдромом единичны.

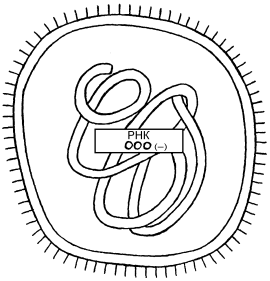


Рис.127. Буньявирусы

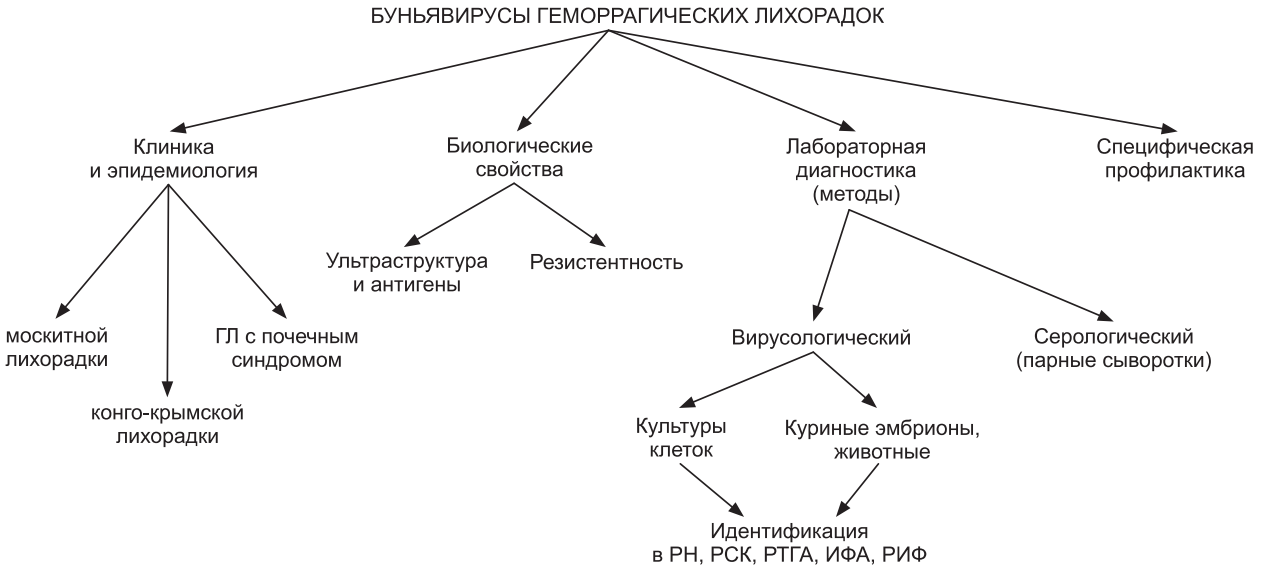
Ультраструктура и антигены. Буньявирусы имеют округлую форму, их диаметр составляет 100±10 нм (рис. 127). В сердцевине вирионов находятся три различающиеся по молекулярной массе сегмента кольцевой однонитчатой РНК: длинный L (*long*), средний M (*medium*) и короткий S (*short*). При этом L-сегмент кодирует L-белок (транскриптазу), M-сегмент – поверхностные гликопротеины G1 и G2, обладающие гемагглютинирующими свойствами и являющиеся протективными антигенами, а S-сегмент – N-белок, или нуклеопротеид, связанный с нуклеокапсидом.

Резистентность. Вирусы чувствительны к эфиру, детергентам и быстро инактивируются при температуре 56 °С.

Иммунитет. После перенесенных заболеваний развивается стойкий видоспецифический иммунитет.

Лабораторная диагностика. На пике заболеваний, когда отмечается вирусемия, исследуется кровь. Выделить из нее буньявирусы можно путем интрацеребрального заражения мышей-сосунков, куриных фибробластов или клеток почек эмбриона человека. Идентифицируют их с помощью РН на тех же мышах-сосунках и культурах клеток, используя эталонные сыворотки. С той же целью ставят РСК и РТГА. Вирусспецифические иммуноглобулины выявляют в РСК, РНГА, ИФА, прямой и непрямой РИФ.

Специфическая профилактика и лечение. Для специфической профилактики могут использоваться иммунные сыворотки, получаемые гипериммунизацией лошадей, или гомологичные иммуноглобулины. Неспецифическая профилактика сводится к применению репеллентов, инсектицидов, акарицидов и защитной спецодежды. Средства этиотропной терапии отсутствуют.


БУНЬЯВИРУСЫ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК
Клиника и эпидемиология
Биологические свойства
Лабораторная диагностика (методы)
Специфическая профилактика
москитной лихорадки
конго-крымской лихорадки
ГЛ с почечным синдромом
Ультраструктура и антигены
Резистентность
Вирусологический
Серологический (парные сыворотки)
Культуры клеток
Куриные эмбрионы, животные
Идентификация в РН, РСК, РТГА, ИФА, РИФ

Граф 108

Аренавирусы лимфоцитарного хориоменингита и геморрагических лихорадок

Среди аренавирусных инфекций у людей чаще всего регистрируется доброкачественный лимфоцитарный хориоменингит (ЛХМ), протекающий в большинстве случаев как грипп, но иногда осложняющийся асептическим серозным менингитом или менингоэнцефалитом с повышенным содержанием лимфоцитов в цереброспинальной жидкости. Источником инфекции являются домашние мыши. Люди заражаются ЛХМ аэрозольным путем, вдыхая воздух с частицами высохших выделений животных.

Аренавирусные геморрагические лихорадки – нигерийская (Ласса), боливийская (Мачупо), аргентинская (Хунин), венесуэльская (Гуанарито) – проявляются высокой температурой с ознобом, глубокой интоксикацией, множественными кровоизлияниями в кожу и внутренние органы, поражениями нервной системы и в 20–70 % случаев заканчиваются смертельным исходом. Источниками геморрагической лихорадки Ласса, эндемичной для Западной Африки, являются многососковые и серые крысы (реже – мыши); боливийской, аргентинской и венесуэльской – дикие грызуны, населяющие травяные равнинные степи Южной Америки (пампасы). Человек заражается ими трансмиссивным путем при укусах клещами, аэрозольным и алиментарным, – при употреблении воды и пищи, инфицированных выделениями животных, а также – при контактах с больными людьми (что характерно для южноамериканских лихорадок).

Ультраструктура и антигены аренавирусов. Вирионы имеют сферическую форму. Диаметр их в среднем составляет 110–130 нм. Внутри вирусных частиц содержится 10–20 электронно-плотных гранул-песчинок (рис. 128). Геном аренавирусов представлен фрагментированной на 5 сегментов -РНК. Нуклеокапсид их покрыт суперкапсидом с многочисленными булавовидными гликопротеиновыми шипами, обла-

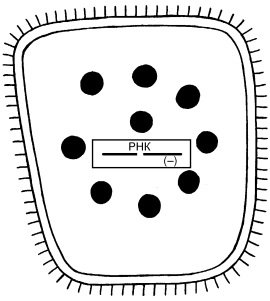


Рис.128. Аренавирусы

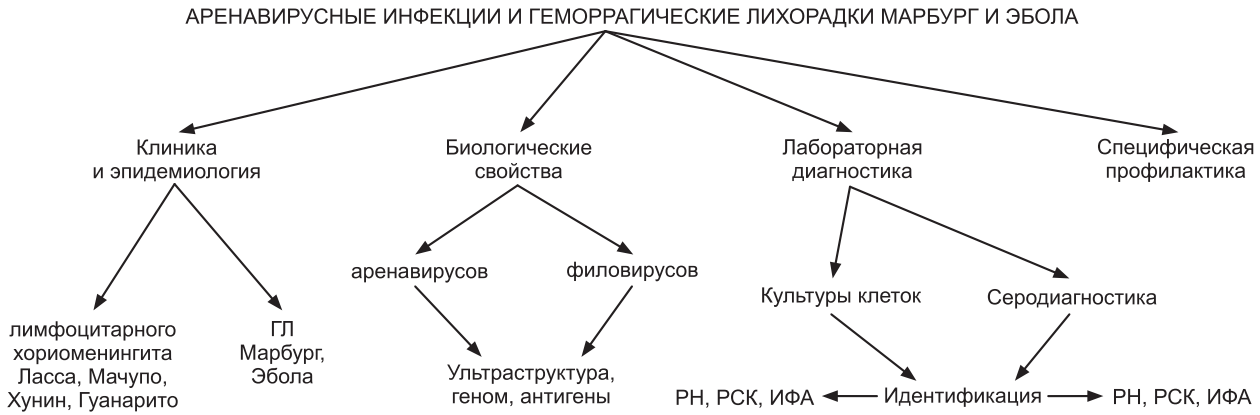
дающими иммуногенностью и способностью агглютинировать эритроциты. Возбудители аренавирусных геморрагических лихорадок имеют общий группоспецифический внутренний растворимый антиген, по различию которого их и дифференцируют.

Лабораторная диагностика. Вирус ЛХМ выделяют из крови и спинномозговой жидкости, а вирусы геморрагических лихорадок – из крови, мочи и смывов носоглотки путем внутримозгового заражения ими помета или молодых белых мышей, хомяков или морских свинок. Для выращивания аренавирусов пригодны многие культуры клеток, но лучшими для вируса ЛХМ являются фибробласты куриного эмбриона, а для вирусов геморрагических лихорадок – перевиваемая линия Vero, на которой особенно ярко проявляется их цитопатическое действие с разрушением монослоя и образованием бляшек. Аренавирусы идентифицируют в РН, РСК или РИФ. Антитела в сыворотке больных выявляют с помощью РИФ и РСК.

Специфическая профилактика аренавирусных инфекций осуществляется аттенуированными живыми вакцинами. В лечении больных используются симптоматические препараты, реже – сыворотки от иммунизированных доноров и реконвалесцентов (лихорадка Ласса). В борьбе с распространением ЛХМ и геморрагических лихорадок широко применяются дератизационные препараты.

Геморрагические лихорадки Марбург и Эбола

Клиника и эпидемиология. Геморрагические лихорадки Марбург и Эбола – особо опасные инфекции. Начинаются остро с резкого повышения температуры до 38–40 °С, головной боли и конъюнктивита, а заканчиваются – множественными кровоизлияниями в кожные покровы и внутренние органы. Летальность варьирует от 30 до 90 %. Первая эпидемическая вспышка болезни Марбург была зарегистрирована в 1967 г. в Германии среди сотрудников вирусологической лаборатории, работавших с культурами клеток обезьян, а Эбола – в 1976 г. в Заире. Заболевания регистрируются в разных странах Африки – Заире и Южном Судане, Кении, Кот д'Ивуар, Габоне (Эбола), ЮАР, Кении (Марбург), циркулируют также в Юго-Восточной Азии, в частности в Индонезии, где лихорадка Эбола возникала среди обезьян.


АРЕНАВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ И ГЕМОРРАГИЧЕСКИЕ ЛИХОРАДКИ МАРБУРГ И ЭБОЛА
Клиника и эпидемиология
Биологические свойства
Лабораторная диагностика
Специфическая профилактика
лимфоцитарного хориоменингита Ласса, Мачупо, Хунин, Гуанарито
ГЛ Марбург, Эбола
аренавирусов
филовирусов
Ультраструктура, геном, антигены
Культуры клеток
Серодиагностика
РН, РСК, ИФА
Идентификация
РН, РСК, ИФА

Граф 109

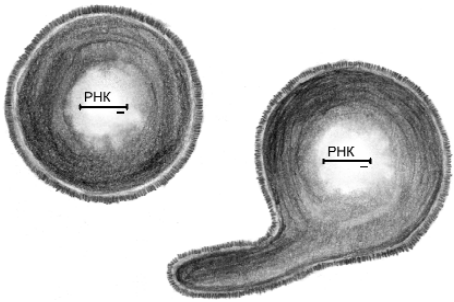


Рис.129. Филовирусы

Ультраструктура. Филовирусы Марбург и Эбола имеют округлую форму диаметром 80 нм или вид цифры 6 (рис. 129), длина нити которой варьирует от 790 нм у Марбург до 970 нм у Эбола. Оба вириона имеют внешнюю оболочку с шиповидными выступами. Вирионная РНК у них одноцепочечная, и, по-видимому, минус-нитевая. Реплицируются и формируются филовирусы в цитоплазме клеток, отпочковываясь на конечном этапе сборки от их мембран.

Лабораторная диагностика. Выделяют филовирусы из крови, геморрагических экссудатов и мочи, заражая ими культуры клеток обезьян с последующей идентификацией в РН, РСК и ИФА. Антигены филовирусов в патологических материалах можно обнаружить с помощью непрямой РИФ, а вирусспецифические антитела в сыворотке больных и реконвалесцентов – в РСК и РН.

Специфическая профилактика и терапия не разработаны.

Паповавирусы

Папилломавирусы вызывают у человека доброкачественные сосочкообразные разрастания кожи и слизистых оболочек, называемые папилломами, а полиомавирусы JC и BK – прогрессивную многоочаговую лейкоэнцефалопатию, сопровождающуюся дегенерацией мозговой ткани.

Обезьяний вирус SV-40 абсолютно безвреден для человека несмотря на то, что *in vitro* он вызывает злокаче-

ственное перерождение клеток. Об этом свидетельствуют 40-летние эпидемиологические наблюдения над десятками миллионов людей, привитых в детстве вакциной против полиомиелита, которая готовилась на контаминированной им культуре клеток почек обезьян (см. «Онкогенные вирусы» и «Вирусы медленных инфекций»).

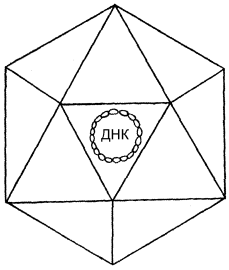


Рис.130. Папова-вирусы

Биологические особенности паповавирусов. Вирионы папова – типичные нуклеокапсиды, в составе которых содержится 72 капсомера, имеют форму икосаэдров диаметром 45–55 нм (рис. 130).

Геном, белки и антигены. Уникальной особенностью генома вирусов папова является то, что он представлен кольцевой сверхспирализованной двухцепочечной молекулой ДНК. В составе вирионов содержатся капсидные вирусспецифические белки и клеточные белки-гистоны, ассоциирующиеся с вирусной ДНК в процессе ее репликации и сборки нуклеокапсида.

Парвовирусы

Хорошо репродуцирующиеся роды *Parvo-* и *Densovirus*, имеющие полноценный геном, непатогенны для человека. Третий род – *Dependovirus*, или аденоассоциированные вирусы, обнаруживается в культурах аденовирусов человека, являющихся для них вирусами-помощниками, так как геном этих парвовирусов – дефектный. Предполагается, что *Dependovirus* участвует в развитии аденовирусной инфекции, но каким образом – остается неизвестным.

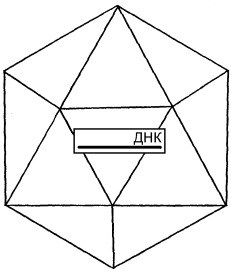


Рис.131. Парво-вирусы

Биологические особенности Dependovirus. Аденоассоциированные вирусы, единственный род классифицированных дефектных ДНК-вирусов человека, имеют

форму икосаэдров с диаметром 18–26 нм (рис. 131). Капсид вирусных частиц составлен из 32 капсомеров. Заключенный в него геном вирионов представлен однонитчатой цельно-линейной ДНК.

Калицивирусы

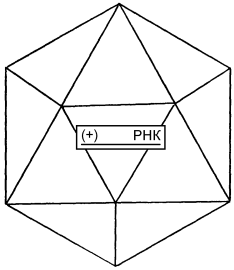


Рис.132. Калицивирусы

Среди калицивирусов патогенными для человека являются вирус Норфолк, вызывающий гастроэнтериты у детей, и вирус гепатита Е. По основным свойствам они сходны с пикорнавирусами. Имеют икосаэдральную форму и диаметр 20 нм (рис. 132). На поверхности вирионов – 32 чашеобразных вдавливания. Их капсид состоит из 180 белковых молекул. Геном представлен плюс-нитевой однонитчатой РНК с молекулярной массой $2{,}6 \cdot 10^6 - 2{,}8 \cdot 10^6$. В вирионах содержатся основной и минорный капсидные белки. Калицивирусы устойчивы к эфиру и детергентам, чувствительны к низким значениям pH, инактивируются при температуре 56 °С.

Астровирусы

Известно 5 сероваров звездчатых вирусов, выделенных в 1975 г. в семейство *Astroviridae* (*astron* – звезда). Диаметр их составляет 28–30 нм. Геном астровирусов представлен однонитевой РНК, кодирующей синтез четырех структурных белков. Астровирусные инфекции распространены повсеместно. Чаще всего их регистрируют у подростков и юношей. Проявляются они диареей или только рвотой и, спустя несколько дней, заканчиваются выздоровлением.

Онкогенные вирусы

История открытия. Вирусная природа опухолей была предсказана в 1903 г. А. Боррелем. Спустя 5 лет В. Эллер-

манн и О. Банг сообщили, что лейкоз кур вызывается вирусом, однако в то время это заболевание считали неопухолевым разрастанием кроветворной ткани. Неоспоримые доказательства вирусной этиологии опухолей были получены американским ученым Ф. Роусом (Раусом) в 1911 г., установившим, что саркома кур может передаваться бесклеточным фильтратом опухоли. В 1966 г. за это открытие он был удостоен Нобелевской премии. Большой вклад в обоснование вирусной теории новообразований внесли открытия вируса фибромы и папилломы кролика (Р. Шоуп, 1932), рака почек леопардовых лягушек (Б. Люке, 1934), рака молочных желез мышей (Дж. Биттнер, 1936), возникающего у потомства через 8–10 мес. после вскармливания, что объясняет процентное увеличение числа опухолей при старении организма.

Вирусогенетическая теория новообразований. *Теория интеграционных вирусов.* Вирусная теория опухолей получила научное обоснование в 60–70-е гг. XX в., после того как лауреат Нобелевской премии Р. Дульбекко в 1965 г. установил, что полиовирус в культуре ткани может присоединяться к клеточной ДНК и вызывать неопластическую трансформацию. Дальнейшие исследования показали, что, интегрируя с геномом клеток, опухолеродные вирусы функционируют в них как трансдуцированные в бактериях гены, изменяя их наследственные свойства после определенного срока латенции. Превратив клетку в злокачественную, онкогенный вирус в дальнейшем развитии опухоли не участвует, но сохраняется в ней как часть хромосомы. Ввиду утраты некоторых генов, интегрированный вирус теряет способность к воспроизводству целых вирусных частиц. По этой причине в опухоли обнаруживаются лишь структурные компоненты вируса (маскированная форма вируса, «дремлющий» вирус) и особые гетерогенные антигены. Маскированные вирусы активируются при пассажах через организм чувствительных животных, в клетках которых происходит образование полноценных вирионов.

Гипотезы онкогена и онкогенного протовируса. В настоящее время вирусогенетическая теория новообразований дополнена гипотезами онкогена и протовируса.

По гипотезе онкогена, предложенной Р. Хюбнером и Дж. Тодаро, в геноме каждой клетки организма новорож-

денных содержатся опероны онкогенных вирусов, способных детерминировать образование трансформирующего белка, индуцирующего злокачественное перерождение клеток. Это в течение долгого времени не происходит потому, что после рождения они сразу же подавляются специальными репрессорами. Активация онкогенов происходит только после их дерепрессии. Провоцирующими ее агентами могут явиться многие экзогенные и эндогенные факторы. В частности, репрессоры онкогенов могут быть сняты в процессе старения, изменения гормональной деятельности и действия таких мощных мутагенов, как диоксины, метилхолантрен и бензо(а)пирен, ионизирующая радиация, УФ-лучи, магнитные и электромагнитные поля. По гипотезе онкогена, таким образом, в основе опухолевого роста клеток лежит нарушение нормального функционирования генетического аппарата клеток .

Согласно гипотезе протовируса, никаких онкогенов нормальная клетка не имеет. Ее автор Г. Темин считает, что к злокачественному перерождению ведет случайное образование в хромосоме клетки структурных генов онкогенного вируса (онкогенного протовируса), которое происходит в процессе дифференциации тканей, когда в генетический аппарат клеток многократно включаются новые фрагменты ДНК (нормальные протовирусы).

Природа онкогенных вирусов

Детальные исследования показали, что опухолеродные вирусы встречаются среди всех групп вирусов.

Онкогенные ДНК-вирусы. Вначале внимание сосредоточилось на ДНК-содержащих вирусах полиомы, вызывающих множественные опухоли у мышей, и на обезьяньем вирусе SV-40, выделенном из клеток почек обезьян-резус, которые вакуолизируют клетки зеленых мартышек и трансформируют клетки хомяков, крыс и других животных. Эти вирусы, очень сходные с вирусом папилломы кролика, позже объединили в группу папова (от первых слогов – ***па****пиллома,* ***по****лиома,* ***ва****куолизирующий*). Далее в экспериментах была установлена опухолеродность аденовирусов (особенно 12, 18 и 31-го типов). Настоящей сенсацией явилось обнаружение опухолеродных свойств у вируса герпеса 4-го типа, или ЭБВ, который выделили Майкл

Эпстайн и Ивонна Барр из лимфомы Беркитта, поражающей детей 2 – 14 лет в Экваториальной Африке (Уганда). Эта саркома поражает челюсти, слюнные железы, глазницу, трубчатые кости и внутренние органы. Развивается болезнь необыкновенно быстро. Средняя продолжительность жизни больного ребенка не превышает 3 мес. Затем вирус Эпстайна – Барр нашли в лимфосаркоме африканской жабы ксенопус, которую теперь считают природным источником лимфомы Беркитта. Далее появились сообщения, что на юге Китая вирус ЭБВ вызывает назофарингиальную карциному, в Европе и Америке – инфекционный мононуклеоз и, с большим постоянством, рак шейки матки. Тщательное изучение ЭБВ завершилось обнаружением опухолеродных свойств у всех видов сем. Herpesviridae, исключая разве только вирус *varicella-zoster*.

Онкорнавирусы. Опухолеродность РНК-вирусов, выделяемых из опухолей животных, долгое время оспаривалась вследствие того, что невозможно было даже представить, как их геном, не имея сродства с ДНК, может интегрироваться с клеточным геномом. В 1970 г. было установлено, что некоторые из них содержат особый, ранее никому неизвестный фермент – РНК-зависимую ДНК-полимеразу, которая на вирионных РНК синтезирует ДНК-копию, т. е. был установлен механизм интеграции РНК-генома с клеточным ДНК-геномом через ДНК-транскрипт. РНК-зависимую ДНК-полимеразу, осуществляющую обратную транскрипцию, как уже отмечалось, назвали обратной (реверсальной) транскриптазой, содержащие ее вирусы – ретровирусами (рис. 133), а вызывающие опухоли РНК-вирусы – онкорнавирусами.

После того как выяснилось, что онкорнавирусы, а их сейчас насчитывают десятки вариантов, в своем геноме содержат клеточный онкоген, большинство ученых стали считать, что они являются основными индукторами канцерогенеза у животных. К ним, в частности, относят многочисленные вирусы сарком и лейкозов мышей, кошек, птиц, крупного рогатого скота и даже штаммы РНК-вирусов, полученных из опухолей человека.

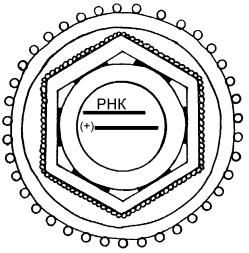


Рис.133. Ретровирусы

Среди онкорнавирусов выделяют две группы: экзогенные, или извне инфицирующие организмы, распространяющиеся обычно горизонтальным путем, и эндогенные, находящиеся в клеточных геномах в виде ДНК-провирусов, передающиеся вертикальным путем, но способные заражать другие организмы при переходе из интегрированного в автономное состояние. При этом в процессе неправильного отщепления провирусов могут появляться дефектные онкорнавирусы, часть генома которых остается в клеточном геноме или они возникают мутационным путем.

Онкогенные вирусы-сателлиты. Если онкорнавирусы дефектны, то в их воспроизводстве участвуют вирусы-помощники, которые синтезируют для них белковые оболочки, как, например, птичьи лейкозные вирусы для саркоматозных. Формирующиеся вирусы-гибриды легко инфицируют чувствительных животных, т. е. неперевиваемая опухоль становится перевиваемой. Приобретая капсид помощника, онкогенный вирус-гибрид может преодолевать видовой барьер. Так, например, была показана возможность злокачественной трансформации клеток млекопитающих и пресмыкающихся птичьим вирусом саркомы Рауса.

Ультраструктура онкорнавирусов. Классифицировано 4 морфологически сходных типа онкорнавирусов – A, B, C и D – и два типа лимфотропных вирусов человека – HTLV-I и HTLV-II (*human t-lymphotropic virus*). Все они являются ретровирусами и в целом составляют подсемейство *Oncovirinae*.

Типы A, B и C имеют округлую форму, а D – грушевидную. Диаметр каждого из них колеблется от 80 до 100 нм. В составе всех четырех вирионов различают сердцевину, в которой содержится заключенный в капсид нуклеопротеид, и окружающую его липопротеидную оболочку с выступающими кнаружи гликопротеидами, имеющими у типа B отростчатую, а у A, C и D – пуговчатую форму. Сердцевина у вирионов типа A – кольцевидная с внутренней полостью и расположена по центру, у типа C – округлая, плотная и тоже центрально спроецированная, у частиц B и D – овальные, примыкающие к внешней оболочке (рис. 134). Онкорнавирусы HTLV-I и II по структуре близки ВИЧ.

Вирионы типа B обнаруживаются при раке молочных желез мышей, C-вирионы – при лейкозах и саркомах, а D-

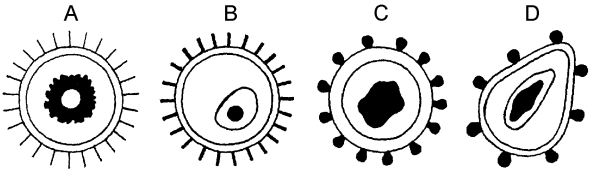


Рис.134. Строение онковирусов: типы A, B, C, D

вирионы – в перевиваемых раковых клетках животных и человека. А-частицы, по-видимому, представляют собой незрелую промежуточную стадию развития этих трех вирионов, поскольку отдельно от них в опухолях не встречаются. Клетками-мишенями Т-лимфотропных вирусов являются, так же как у ВИЧ, $CD4^{+}$-лимфоциты. При этом HTLV-I вызывает Т-клеточные лимфомы на юго-западе Японии и в странах Карибского моря, а HTLV-II – волосато-клеточный лейкоз.

Биологические особенности онкорнавирусов. Общим для всех типов онкорнавирусов является то, что геном у них диплоидный, представленный двумя идентичными одноцепочечными цельно-линейными +РНК и тремя вирионными генами: *gag* (*group specific antigen*), *pol* (*polimerase*) и *env* (*envelope proteins*). В своем составе они имеют более десятка белков, в том числе оболочечные типоспецифические гликопротеиды-антигены и группоспецифические сердцевинные антигены с обратной транскриптазой и триптофановой тРНК-затравкой. Синтез ДНК-транскриптов у них осуществляется после высвобождения в клетке вирионной РНК и происходит в 3 этапа: синтез на РНК одной нити ДНК; ферментативное разрушение РНК-матрицы; синтез второй нити ДНК на ДНК-копии с последующим замыканием в кольцо и интеграцией с клеточным геномом. Транскрибируются онкорнавирусы в геноме клетки РНК-полимеразой II на одной нити ДНК провируса и при этом образуются длинная нить РНК, идентичная вирионной, и более короткие, соответствующие отдельным генам онковируса. Продуктами трансляции являются гигантские полипептиды-предшественники, нарезающиеся затем на короткие. Сборка вирионов начина-

ется в цитоплазме, а завершается в клеточной мембране при отпочковывании от нее онкорнавирусов. Отличаются онкорнавирусы тем, что имеют дополнительные гены опухолеродности. В частности, типы A, B, C и D, кроме *gag*-, *pol*- и *env*-генов содержат *scr*-онкогены клеточного происхождения, а HTLV – вирионный ген pX. Первые, как показывают эксперименты, обладают прямым действием на перерождающиеся клетки и к тому же более высоким онкогенным потенциалом. Онкогенное действие HTLV, не имеющих онкогена *scr*, объясняют их интеграцией в тот район генома клеток, где находится ген, кодирующий синтез ИЛ-2, с последующей активацией вирионными промоторами избыточной продукции цитокина, активирующего бесконтрольную пролиферацию Т-лимфоцитов.

Антигенно-биохимические сдвиги при злокачественном перерождении клеток. Вирусная трансформация нормальных клеток в злокачественные сопровождается антигенным переструктурированием и нарушением энергообмена в них. Ранее всего в перерождающихся клетках появляется особый ядерный белок или Т-антиген (*tumor* – опухоль), отличающийся по структуре от вирусных и клеточных протеидов. Далее в опухолевых клетках происходит антигенная трансформация внешних мембран. Прежде всего, в них накапливается вирусспецифический антиген V, аналогичный виду онкогенного вируса, и видоспецифический для ткани Т-антиген, препятствующий пересадке опухоли, вследствие чего получил название трансплантационного. Параллельно с этим, в опухолевых клетках обнаруживаются несвойственные им изоантигены других клеток, например почечные в печеночных или наоборот, что называют *антигенной дивергенцией*. Нередко опухолевые клетки утрачивают собственные для них антигены, и это принято именовать *антигенным упрощением*. В некоторых опухолевых клетках появляются эмбриональные антигены, по структуре аналогичные тем, которые содержались у плода во время внутриутробного развития. Так, например, при первичном раке печени появляется α-фетопротеин (эмбриональный эквивалент сывороточного альбумина), при раке толстой кишки ракоэмбриональный антиген, при хориокарциноме и се-

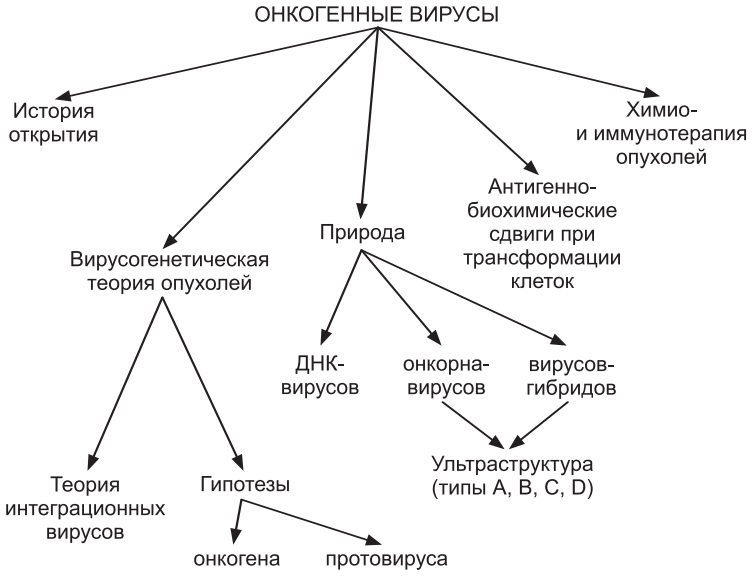
миноме хорионический гонадотропин (гормон, в норме продуцируемый плацентой), которые полностью исчезают из тканей человека спустя несколько недель после рождения. Появление эмбриональных антигенов в опухолевых клетках называют *антигенной реверсией*. Кроме того, в опухолях обнаруживаются и другие гетерогенные антигены, например белки вирусной оболочки, регуляторные белки и ферменты. Опухолевые клетки легче и быстрее, чем нормальные, склеиваются растительными агглютининами. Полагают, что это связано с обнажением и скучиванием на отдельных участках оболочки рецепторов. В трансформированных клетках резко снижается уровень циклического аденозин-3,5-монофосфата, что стимулирует их деление. Более того, злокачественные клетки утрачивают свойства контактной задержки и, в отличие от нормальных, продолжают размножаться, наползая друг на друга. И, наконец, в них накапливается большое количество мукополисахаридов, скрывающих чужеродные антигены, а также изменяется транспорт углеводов и других веществ.

Антигенная дивергенция или антигенное упрощение не вызывают иммунного ответа. Организм недостаточно сильно реагирует на антигенную реверсию, так как аутоагрессивные клоны лимфоцитов к ним элиминируются в процессе внутриутробного развития плода. Иммунная система организма выраженной реакцией элиминации отвечает на антигены онкогенного вируса, вызвавшего опухоль, и трансплантационный антиген.

Вирусные новообразования у человека. В последние 20–30 лет из различных злокачественных опухолей человека выделено несколько десятков онкорнавирусов, но их природа и роль в возникновении рака, саркомы и лейкозов не выяснена. Неизвестными остаются источники и механизмы передачи злокачественных опухолей. Иначе обстоит дело с вирусной этиологией доброкачественных новообразований – бородавок, остроконечных кондилом и папиллом глотки, гортани и мочевого пузыря. Вызываются они 30 типами папилломавирусов, но чаще всего 11, 16, 18 или 30 сероварами. В клетках бородавок и доброкачественных эпителиальных разрастаний папилломавирусы находятся в виде автономных реплицирующихся кольце-

вых двухцепочечных молекул-плазмид, которые в редких случаях могут встраиваться в хромосому клетки-хозяина и приобретать свойства онкогенов. Считается, что в большинстве случаев папилломавирусы передаются через микротравмы кожи, при половых сношениях и вертикальным путем при рождении ребенка. Цур Хаузен из 16-го и 18-го серотипов папилломавирусов создал вакцину против рака шейки матки, за что был удостоен Нобелевской премии в 2010 г.

Химиоиммунотерапия опухолей. Для лечения опухолей используются цитостатики и биопрепараты. Как и большинство иммунодепрессантов, цитостатики являются химическими соединениями, ингибирующими синтез НК, вследствие чего они могут обладать также антивирусным действием. В качестве цитостатиков широко используют некоторые антибиотики: актиномицины применяют для лечения аденокарциномы почки, оливомицин – для лечения опухолей яичка и носоглотки, рубомицин – в терапии хорионэпителиомы матки и острых лейкозов, брунеомицин – при лимфогрануломатозе, блеомицин – для лечения эпителиальных опухолей. Противоопухолевый эффект обнаружен также у ряда антиметаболитов, в частности у антифолиевых препаратов аминоптерина и метатрексата. Выявлено антибластомное действие у многих веществ растительного происхождения, в первую очередь у виналкалоидов (винкристин и винбластин). Большие надежды возлагаются на биопрепараты. Пытаются создать вакцины из онкогенных вирусов. Отмечено благотворное действие противоопухолевых антител, которые часто конъюгируют с цитотоксическим веществами, например с рицином. В лечении новообразований могут быть использованы факторы некроза опухолей α и β, разрушающие перерождающиеся клетки с развитием в тканях геморрагического некроза, интерфероны, угнетающие пролиферацию опухолевых клеток и активирующие нормальные киллеры, цитотоксические лимфоциты и макрофаги. Разрабатываются методы стимуляции неспецифической резистентности организма адъювантами, например вакциной БЦЖ при лейкозах. Ведутся поиски репрессоров РНК- и ДНК-содержащих опухолеродных вирусов, ингибиторов обратной транскриптазы онкорнавирусов и антисыворотки к ней.



Граф 110

Медленные инфекции человека и животных

Отличительные особенности медленных инфекций. Медленные инфекции в отличие от острых и, главное, хронических инфекций характеризуются многомесячным (многолетним) бессимптомным инкубационным периодом и прогрессирующим (как правило, без ремиссий) развитием. Заболевания протекают без лихорадки и воспалительных явлений. В основе всех их лежит деструкция тканей мозга, которая заканчивается парезами, параличами, нарушениями психической деятельности, слабоумием, пневмонией, сепсисом и неминуемой смертью.

Этиология медленных инфекций. Различают две группы медленных инфекций: прионовые инфекции и медленные инфекции, вызываемые обычными облигатными и факультативными вирусами.

Клинико-эпидемиологические особенности прионовых инфекций. Прионы у людей вызывают куру и болезнь Крейтцфельдта – Якоба (БКЯ), а у животных – «бешенство» коров, скрепи у овец и коз, энцефалопатию домаш-

них норок и хроническое истощение одомашненных оленей и лосей. При всех этих болезнях поражается головной мозг, деструктивные процессы в котором заходят так далеко, что после смерти его консистенция и цвет напоминает пеструю губку. Не случайно куру, БКЯ, «бешенство» коров, скрепи и другие прионовые инфекции объединили в группу подострых губкообразных энцефалопатий.

В результате разрушений нейронов при *куру* возникает слабость и боль в коленных суставах, неустойчивость походки и позы, позднее нарушается координация движений, что вынуждает больных людей к сидячему образу жизни, далее появляется характерное дрожание туловища и покачивание головы из стороны в сторону (в переводе *куру* – дрожание от холода и страха). Болезнь продолжается 6–9 мес. (реже 1–2 года) и заканчивается смертью от застойной пневмонии и сепсиса.

Болезнь Крейтцфельдта – Якоба (спастический псевдосклероз) проявляется нарушением чувствительности и болями в конечностях, судорогами, расстройствами речи, глотания, потерей зрения, прогрессирующим слабоумием. Течение болезни затяжное и может продолжаться от 1–2 до 6 лет.

«*Коровье бешенство*» начинается с быстротечной потери веса и нарушением равновесия при ходьбе. Затем возникает непрерывное мотание головы из стороны в сторону, дугой изгибается спина, и корова набрасывается на своих сородичей, из ее пасти сочится слюна. Такой симптомокомплекс впервые был описан в конце 1984 г. на ферме Питшем в Южной Англии. Странная в то время болезнь коров, названная *питшемским синдромом*, заканчивалась спустя 6 недель поголовной гибелью скота.

У заболевших овец при *скрепи* вначале возникает резкое раздражение кожи и нестерпимый зуд, что вызывает у животных непреодолимое стремление тереться (*scraping*) об изгородь, деревья, стены, расчесывая кожные покровы вплоть до крови, далее появляется спотыкающаяся походка и полное нарушение координации движения. Заболевание развивается исподволь и продолжается несколько месяцев.

Трансмиссивная энцефалопатия у норок начинается с признаков двигательных расстройств, в последующем развивается сонливость, появляются судорожные припад-

ки, утрачивается блеск меха, животные теряют в весе и через 2–6 недель погибают.

Куру – эндемическое заболевание, встречающееся только среди народности форе, проживающей в восточной части о. Новая Гвинея, а *БКЯ* распространена спорадически повсеместно. Заражение куру происходит в результате ритуального поедания мозга умерших от этого заболевания людей. Эпидемический процесс при спорадической форме БКЯ полностью не раскрыт, но теперь уже ни у кого нет сомнений, что возникает она вследствие употребления зараженной прионами говядины. К концу 90-х гг. XX в. органы здравоохранения многих стран запретили использование наиболее инфицированных частей туши коров: головного и спинного мозга, селезенки, кишечника. Остановлено производство кормовых добавок для скота и птиц из говяжьих субпродуктов, являющихся резервуаром инфекции. Проблема БКЯ, однако, осталась. С 1988 по 1996 г. только страны Азии закупили у Великобритании почти 1 млн т говяжьего мяса. На борьбу с искоренением «коровьего бешенства» Англия потратила миллиарды долларов, уничтожая во время эпизоотий всех подряд коров старше 30 мес. В настоящее время «бешенство» коров стало регистрироваться почти во всех странах Центральной Европы.

Передача *скрепи* происходит при совместном содержании здоровых и больных овец и коз. Возбудитель *трансмиссивной энцефалопатии* норок выделяется больными животными с калом, и воротами инфекции, несомненно, служит пищеварительный тракт; допускается, что источниками инфекции могут быть скунсы и еноты.

Природа и свойства прионов. Прионы – белковые инфекционные агенты, выделенные С. Прузинером в 1982 г. из ткани мозга овец, погибших от скрепи и названных им скрепи-специфическим белком PrP^{sc} (***sc**rapie*). Этот белок с молекулярной массой 27–30 кД, полимеризуясь, образует парные фибриллы размером 100 · 10–20 нм (рис. 135), склонные к агрегации. Дальнейшие исследования позволили установить, что образование инфекционных прионовых белков PrP^{sc} происходит не в результате их репродук-

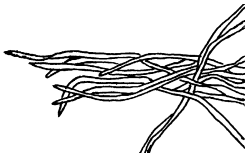


Рис.135. Прионы

ции, а вследствие трансформации близких им по конфигурации молекул нейронального белка PrP^c (*cell* – клетка), который участвует в реализации функций синапсов и регуляции внутриклеточного содержания Ca^{2+}, обеспечивая трофику нейронов, чувствительность хеморецепторов к гормонам, медиаторам, модуляторам и резистентность к повреждающим факторам. Превращение нормального нейронального белка PrP^c с молекулярной массой 33–35 кД в инфекционный прионовый PrP^{sc} происходит вследствие мутации гена, кодирующего его, и цепной реакции взаимодействия молекул PrP^c с PrP^{sc}, в результате чего из димеров непрерывно образуются одни молекулы прионового белка. Накапливаясь в цитоплазматических везикулах, они вначале нарушают функцию синапсов, затем приводят к дегенерации нейронов, а позднее откладываются в амилоидных бляшках.

Прионовые формы белков отличаются высокой устойчивостью к УФ-облучению, ионизирующей радиации, ультразвуку, нуклеазам, формальдегиду, 70 %-ному этанолу и другим дезинфицирующим веществам, переносят высокие температуры, оставаясь жизнеспособными даже после 30-минутного кипячения. Столь же необычны и их биологические свойства: не антигенны, не чувствительны к интерферону, не интерферируют с обычными вирусами.

Культивирование. Прионы не репродуцируются в интактных клеточных культурах, но успешно размножаются в культурах клеток, приготовленных из мозга больных животных (вирусы скрепи и трансмиссивной энцефалопатии норок) или длительно персистируют в клетках мозга больного человека (вирус БКЯ) и эксплантатах мозговой ткани зараженных животных (вирус куру).

Патогенность. Прионы патогенны для шимпанзе и некоторых других видов обезьян (PrP^{sc} БКЯ, куру), мышей, крыс, хомяков, песчанок (PrP^{sc} овец), хомяков, хорьков, скунсов, енотов, белкообразных обезьян (PrP^{sc} трансмиссивной энцефалопатии норок).

Этиология и клинико-эпидемиологические особенности медленных инфекций, вызванных типичными вирусами с необычными свойствами. *К обычным облигатным вирусам* медленных инфекций относят три вида: 1) паповаподобные вирусы, которые вызывают прогрессирую-

щую многоочаговую лейкоэнцефалопатию (ПМЛ) у человека, характеризующуюся очагами демиелинизации в белом веществе мозга, снижением и потерей зрения; 2) вирус висна-мэди у овец, поражающий центральную нервную систему с развитием параличей (*висна* – чахнущий) или вызывающий пневмонию с тяжелой одышкой (*мэди* – одышка); 3) парвовирус алеутской болезни норок (серо-голубой породы), поражающий костный мозг, селезенку, лимфатические узлы, печень, почки с явлениями кровоизлияний во внутренние органы.

ПМЛ – типичный антропоноз, заболеваемость спорадическая, но результаты серологических обследований свидетельствуют о широком распространении паповавирусов среди людей. Источник и пути передачи ПМЛ неизвестны. Висна-мэди и алеутская болезнь норок – зоонозы, которые передаются контактным либо воздушно-капельным путями, возможно, алиментарным и трансмиссивным. Описаны случаи заболевания людей алеутской болезнью норок.

К обычным факультативным вирусам относят два вида: 1) вирус кори, вызывающий не острую инфекцию с кожными высыпаниями, как обычно, а подострый склерозирующий панэнцефалит (ПСПЭ), начинающийся с разрастания волокнистой глии в белом веществе мозга, которое приводит к головным болям, забывчивости и заканчивающийся парезами, кахексией, распадом интеллекта и комой; 2) вирус врожденной краснухи, заражающий плод внутриутробно и в результате нарушения эмбриогенеза вызывающий глухоту, слепоту, пороки сердца и другие аномалии развития у детей.

ПСПЭ и врожденная краснуха – антропонозные и главным образом детские инфекции. ПСПЭ заболевают чаще всего дети в возрасте 5 – 15 лет и реже взрослые лица, перенесшие в прошлом корь или вакцинированные живой коревой вакциной. Заражение детей вирусом врожденной краснухи происходит трансплацентарно от больной матери.

Биологические свойства обычных вирусов МВИ. Обычные вирусы медленных инфекций имеют специфическую корпускулярную форму и строго детерминированные размеры. Так, паповавирусы ПМЛ и парвовирус алеутской болезни норок – икосаэдральные, с диаметрами 45–55 и 23 нм соответственно, остальные три вириона медленных

инфекций – сферические, с диаметром 150–500 нм у вируса кори, 60–80 – у вирусов краснухи, 80–100 нм – у вируса висна-мэди. Первые два вируса – папова и парвовирус – типичные нуклеокапсиды, или простые ДНК-содержащие вирусы, три других – сложноустроенные РНК-вирусы, в составе которых находится обратная транскриптаза (вирус висна-мэди и, возможно, вирус кори). Обычные вирионы медленных инфекций выращиваются в культурах клеток. Репродуцируясь в них, они вызывают цитопатический эффект, проявляющийся в изменении структуры и гибели клеток, образовании специфических бляшек, цитоплазматических или внутриядерных включений. Маловирулентны или непатогенны для животных. Чувствительны к нагреванию, ультрафиолетовым лучам и ионизирующей радиации, инактивируются эфиром, хлороформом, этанолом, фенолом, формальдегидом, ферментами. Способны индуцировать воспалительные процессы, и в организме человека вызывают образование специфических антител (вирусы кори, висна-мэди, алеутской болезни норок), которые, однако, не всегда, соединяясь с вирусами, вызывают их нейтрализацию.

Патогенез медленных инфекций. Сведения о патогенезе МВИ очень скудны. Возникновение и последующее их развитие может определяться видовыми и штаммовыми особенностями вируса, генетически контролируемой восприимчивостью организма хозяина или отдельных особей. Немаловажное значение имеют возраст, способ заражения и инфицирующая доза.

Характеризуя патогенность вирусов медленных инфекций, прежде всего следует отметить, что они обладают уникальной способностью к персистированию в организме. Механизм персистенции объясняют очень низкой степенью инфекционности вирусов медленных инфекций или дефектностью обычных вирусов, т. е. неспособностью к формированию полных вирионов. Складывается впечатление, что некоторые из этих вирусов, например вирус алеутской болезни норок, сами по себе не вызывают ни поражений, ни клинических признаков заболевания. То же можно сказать о паповавирусах ПМЛ, проявляющейся только при нарушениях иммунологической реактивности организма, возникающих при аутоиммунных болезнях, туберкулезе, введении иммунодепрессантов. Возможно, что некоторые дефектные вирусы вызывают

медленные инфекции с помощью вирусов-синергистов. По мнению некоторых исследователей, персистирующий в мозговой ткани дефектный вирус кори, обладая синцитиогенным действием, способствует распространению другого вируса из группы папова, с накоплением которого и развивается ПСПЭ. Ряд ученых рассматривает возбудителя ПСПЭ как вариант или как мутанта коревого вируса, который селекционируется либо возникает в организме под влиянием специфических антител. Дефектностью или мутацией обычных вирусов медленных инфекций объясняют также трудность их выделения из секционных материалов.

Длительное пребывание возбудителей медленных инфекций в организме, иммунологическую резистентность и непостоянство выявления вирионов в патологических материалах больных можно связать с тем, что геном ряда обычных вирусов интегрирует с геномом клеток. Такой характер взаимоотношений с клеткой может быть не только у вируса висна-мэди, но и у вирионов кори и парвовирусов, что подкрепляется находками ДНК-транскриптов при ПСПЭ и алеутской болезни норок.

Репродуцируясь в организме, обычные вирусы медленных инфекций ингибируют иммунную систему, а при выработке специфических антител не обезвреживаются ими. При этом иммунные комплексы «вирусы–антитела» повреждают клетки, вызывают образование аутоантигенов, а затем и аутоантител, которые приводят к прогрессирующему развитию патологических процессов.

Взаимодействие прионов с клетками досконально не изучено. Известно лишь то, что оно может выражаться во внутриклеточной пролиферации с накоплением мембран и заканчивается дегенерацией инфицированных тканей.

Представление о генетической детерминированности прионовых медленных инфекций опирается, главным образом, на эпидемиологические наблюдения, показывающие резкое различие в восприимчивости к скрепи у разных пород овец, высокую заболеваемость куру среди племени народности форе, отсутствие ее в соседних с ними племенах, других районах мира и среди обслуживающего персонала, наличие естественной резистентности у многих особей животных и человека к прионовым медленным инфекциям.

МЕДЛЕННЫЕ ИНФЕКЦИИ
Отличительные особенности
Этиология
Клинико-эпидемиологические особенности прионовых инфекций (губкообразных энцефалопатий)
Характеристика PrP^sc
Этиология, клиника, эпидемиология вызванных
Биологические свойства обычных вирусов
Патогенез
Куру
БКЯ
«бешенства» коров
скрепи
энцефалопатии норок
Природа
Структура
Молекулярная масса
Культивирование
«Репродукция»
Патогенность
облигатными вирусами
факультативными вирусами
ПМЛ
висна-мэди
алеутской болезни норок
краснухи
ПСПЭ

Граф 111

ЭКОЛОГИЯ ВИРУСОВ

Рассматривая взаимоотношения вирусов с организмами, нужно иметь в виду, что они являются особыми симбионтами, паразитирующими на генетическом и биохимическом уровнях, но несмотря на это имеющими свою историю, независимую от эволюции организмов, в которых репродуцируются. Так же как про- и эукариотам, им присуща генетическая непрерывность, способность к воспроизводству и изменчивость, обусловленная мутациями и рекомбинациями.

В природе вирусы заняли все экологические ниши и входят в состав всех экологических систем, начиная с капли воды (микроэкосистема) и кончая биосферой (глобальная экосистема). По-видимому, нет ни одной клетки, в геноме которой отсутствовали бы профаги и провирусы. В связи с этим при выделении и идентификации вирусов трудно подобрать культуры клеток, свободные от вирусных генетических структур. По существу, генетический материал вирусов стал частью генетического фонда всех организмов (см. «Онкогенные вирусы»). Обнаружить его в эукариотических клетках, правда, нелегко. Гораздо труднее, чем при индукции лизогенных бактерий УФ-лучами или ДНК-тропными веществами.

Затрагивая проблему интеграционных вирусов, следует заметить, что она уже давно вышла за рамки научных интересов отдельных исследователей и приобрела большое практическое значение. Вирусная конверсия, например, затрудняет идентификацию бактерий и диагностику инфекционных болезней, с ней связывают злокачественное перерождение клеток, возникновение медленных вирусных инфекций, аутоиммунных и некоторых других патологических процессов.

Умеренные фаги и интеграционные вирусы животных и человека, перенося чужеродные гены, играют важную роль в эволюции их хозяев. Они могут инактивировать гены клеток или способствовать их экспрессии, вводить, устранять и (или) перемещать IS-элементы, способствовать рекомбинационным процессам, а также рекомбинировать с маскированными дефектными вирусами, находящимися в клеточном геноме. Передаются интеграционные вирусы потомству животных и человека трансовари-

альным путем через яйцеклетки, а к дочерним особям бактерий – при амитотическом делении.

Переходя в автономное состояние, интеграционные вирусы приобретают способность к репликации и по эффекту действия на клетки ничем не отличаются от инфекционных, т.е. оказывают ЦПД. Из этого, однако, нельзя делать вывод, что в экологических системах инфекционные вирусы нарушают природные взаимосвязи организмов. Напротив, они стабилизируют экосистемы. Находясь в симбиозе с организмами, инфекционные вирусы регулируют численность популяций на таком уровне, который сложился в процессе длительной эволюции. Вирулентные фаги, например, очищают водоемы от избыточного количества бактерий и водорослей, а вирусы животных сглаживают периодически возникающие всплески неумеренно размножившейся численности грызунов и насекомых (полевок, крыс, саранчи).

В антагонистическом симбиозе с хозяином вирусы как патогены очищают популяцию от генетически неполноценных особей, т. е. являются мощным фактором естественного отбора, а как антигены побуждают организмы к непрерывному совершенствованию механизмов иммунитета. В организме устойчивых особей происходит антигенная перестройка вирусов и оттачиваются их механизмы приспособления и выживания.

Нарушение сложившихся взаимоотношений в симбиозе вирус–хозяин, основанных на принципе неравновесной устойчивости, может приводить к распаду системы. При этом освобождается экологическая ниша, которая, как показывает сравнительный анализ инфекционной заболеваемости последних 30–40 лет, сразу же заполняется другим, не менее опасным паразитом. Так, на смену острым пришли торпидно протекающие внутрибольничные инфекции, вызванные госпитальными штаммами бактерий, медленные инфекции и аутоиммунные патологические процессы, индуцированные вирусами.

Происшедшие изменения взаимоотношений в системах вирус–хозяин на столь коротком временном промежутке, несомненно, связаны с ухудшением экологической обстановки. Это, в частности, подтверждается повсеместным ростом злокачественных опухолей, индукторами которых являются различные антропические факторы, про-

воцирующие активацию онкорнавирусов (см. «Онкорнавирусы»).

С резкими изменениями окружающей среды связывают также активацию дремлющих в природе вирусов. Например вирус крымской геморрагической лихорадки «проснулся» в 1953 г. при освоении целинных земель, где обильно размножился его резервуар-переносчик клещ *Hyalomma*, и вирус особо опасной аргентинской геморрагической лихорадки, возникшей с увеличением выплода грызунов *Calomys* вблизи Буэнос-Айреса на больших площадях, засеянных кукурузой.

К новым эпидемиям вирусных инфекций неизбежно приводит также освоение человеком необжитых регионов тундры на севере и джунглей на юге. Связывают их с отсутствием у мигрантов иммунитета к эндемическим вирусным болезням, которыми аборигены не болеют, так как с детства приобретают к ним устойчивость.

Кроме этих давно известных скрытых вирусов, которые периодически активируются факторами окружающей среды, есть, однако, и более загадочные, которые, пожалуй, можно назвать истинно новыми. К ним, в частности, относятся тогавирус О'ньонг-ньонг, вызвавший в 1959 г. в Восточной Африке эпидемию лихорадочной болезни суставов, флавивирус Росио, выделенный в 1975–1976 гг. при эпидемической вспышке энцефалита в Бразилии и филовирус Марбург, который в 1967 г., как мы уже отмечали, вызвал тяжелейшую геморрагическую лихорадку у сотрудников лаборатории, готовивших полиомиелитную вакцину на почках зеленых мартышек, привезенных из Уганды.

Чрезвычайно быстрое исчезновение вирусов О'ньонг-ньонг, Росио, Марбург объясняют тем, что они не нашли подходящего природного резервуара, но дело, вероятно, не только в нем. Многолетние исследования так и не дали ответа на вопрос, почему в Юго-Восточной Азии отсутствует желтая лихорадка при наличии там большого количества переносчика флавивируса *Aedes egypti*, ничем не отличающегося от южноамериканских комаров. Одна за другой были отвергнуты догма о различной компетентности регионарных комариных популяций к вирусу желтой лихорадки (*аэдес египти* оказались одинаково чувствительны к нему) и гипотеза вирусной интерференции, со-

гласно которой вирус денге, широко распространенный в Азии, якобы подавляет своего сородича в организме комара (большинство природных комаров оказалось не зараженными вирусом денге).

Новым, несомненно, является ВИЧ, но как, где и какие экологические коллизии обусловили его возникновение неизвестно. Едва ли он, как считает видный эколог Н. Реймерс, уже ранее существовал «на задворках эволюции». Одно только ясно – появился он совсем недавно (см. «Вирус иммунодефицита человека»).

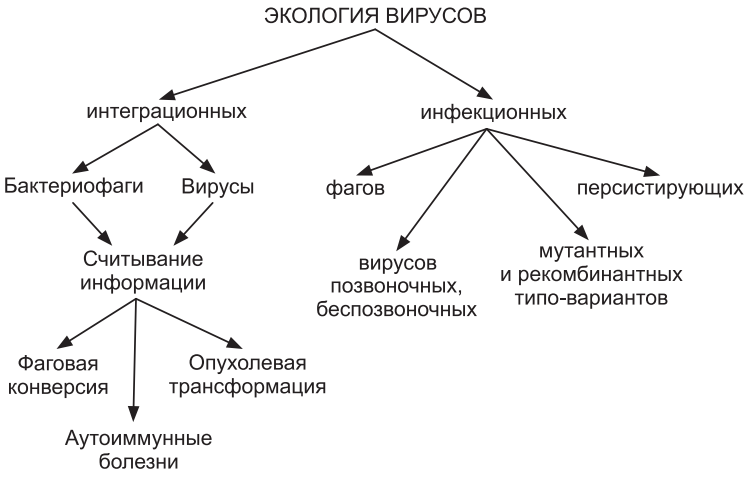
Роднит ВИЧ с вирусами О'ньонг-ньонг, Росио и Марбург старая истина – в филогенетически новых системах «паразит–хозяин» резко обостряется межвидовая борьба. Действительно, вызванные ими болезни протекают тяжело и оставляют мало шансов на выздоровление. Отличается ВИЧ от них разве только тем, что обрел долгосрочного хозяина.

Некоторых успехов добилась наука в разгадке появления новых типо-вариантов вирусов. Так, у ортомиксовирусов они возникают путем обмена сегментами между одновременно размножающимися в эпителиальной клетке антигенными вариантами или такой же реассортацией геномных сегментов между вирусами гриппа человека, животных и птиц. Полагают, что таким путем вслед за эпидемией «испанки» в 1918 г. возник вирус гриппа свиней. Не исключается, правда, что свиной вирус мог возникнуть в результате мутационной адаптации человеческого типа ортомиксовируса к животным.

Говоря о вирусных мутантах, надо отметить, что в экологии вирусов им уделяется большое внимание при объяснении патогенеза латентных и персистентных вирусных инфекций, при которых болезнь протекает скрыто или приобретает вялотекущий характер. Ослабляющее действие на острую инфекцию могут оказывать все мутанты с дефектным геномом, реплицирующиеся за счет генных продуктов инфекционного вируса-помощника, из которого они образовались. Лучше всего изучены в этом отношении дефектные интерферирующие вирусы. Так, показано, что накапливающиеся в организме зараженных животных ДИ-частицы предотвращают цитопатическое и летальное действие гомологичного вируса на культуру клеток *in vitro*, задерживают, а иногда полностью приос-

танавливают процесс их репликации, но чаще регулируют размножение друг друга так, что зараженные ими клетки длительное время развиваются нормально. На основании результатов этих экспериментов делаются вполне обоснованные предположения, что, поддерживая персистенцию вирусов, ДИ-частицы могут обеспечивать защиту организма от болезни и способствовать выздоровлению. Вместе с тем нужно учитывать, что персистенция вирусов может быть следствием возникающего иммунодефицита или толерантности к ним при заражении ими организма в эмбриональном или неонатальном (*neonatus* – новорожденный) периодах развития. Имеются также доказательства того, что персистенция вирусов является результатом клеточных мутаций. В частности, из популяций персистентно инфицированных клеток выделяли «излеченные» клетки, резистентные к повторной инфекции вирусом дикого типа.

Таким образом, повсеместность распространения вирусов и высокая их специфичность указывают на самое древнее происхождение системы «вирус–хозяин», терпимость в которой подчинена определенным экологическим закономерностям, пока еще недостаточно раскрытым.



Граф 112

ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ ПРОТОЗОЙНЫХ ИНВАЗИЯХ И ИХ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Патогенные простейшие имеют сложную антигенную структуру и содержат гораздо больший набор антигенов, чем бактерии. Организм больного человека реагирует на антигены простейших развитием разнообразных гуморальных и клеточных защитных реакций, но эффективность их при разных инвазиях неодинакова, что зависит от вида и локализации паразита в организме. При паразитемиях, например, вырабатывается большое количество паразитоцидных иммуноглобулинов, однако полной элиминации циркулирующих в крови простейших они не вызывают. Под их влиянием у части простейших быстро развивается изменчивость антигенной структуры. К таким паразитам, например, можно отнести африканские трипаносомы и малярийные плазмодии. Дизентерийные амебы, жиардии, трихомонады – слабые иммуногены. В ответ на их воздействие организм продуцирует невысокий титр антител. Столь же ограничена индукция клеточных реакций. Паразитирующие в спинномозговой жидкости и головном мозге простейшие иммунологических реакций не вызывают. Более того, такая локализация защищает их от паразитоцидного действия иммуноглобулинов, фагоцитов и цитотоксических лимфоцитов.

Идентификация протозойных болезней основана, главным образом, на глубоком знании их морфологической структуры (см. «Простейшие» в разд. I), способах приготовления, фиксации и окраски препаратов. При этом толстые капли не фиксируются, а мазки окрашиваются чаще всего по Романовскому – Гимзе и метиленовым синим. Результаты микроскопии в значительной степени зависят от выбора патологического материала, его характера, времени взятия от начала заболевания, срока исследования от момента его получения. В серодиагностике протозойных исследований используются все иммунологические реакции, но чаще всего – РИФ, РСК, РНГА, ИФА, которые, однако, часто оказываются недостаточно специфичными вследствие медленного нарастания антипротозойных иммуноглобулинов. В связи с этим большие перспективы в диагностике протозойных инфекций открывают ДНК-зонды и полимеразная цепная реакция. Биологический эксперимент ограниченно используют в диагностике токсоплазмоза, лейшманиозов и трипаносомозов, а

аллергическую кожную пробу – при эпидемиологическом обследовании на зараженность токсоплазмами и лейшманиями. Выделяют патогенных простейших на элективных средах, куриных эмбрионах, культурах человеческих клеток, а *Trypanosoma kruzi* – в организме «поцелуйных клопов» путем вскармливания их на больных, но работу эту осуществляет хорошо обученный контингент лиц специализированных лабораторий и научно-исследовательских институтов.

ТИП SARCOMASTIGOPHORA

Дизентерийная амеба

Таксономия. Дизентерийная амеба, или *Entamoeba histolytica*, являющаяся возбудителем амебиаза, была открыта в 1875 г. Ф.А. Лешем и подробно изучена в 1903 г. Ф. Шаудиным. Видовое название *Entamoeba histolytica* (*entos* – внутри, *amoibe* – изменение формы) получила потому, что, развиваясь в подслизистом слое и просвете толстой кишки, вызывает расплавление тканей. Относится к подтипу *Sarcodina* (*sarcodes* – «состоящий из мяса»), надклассу *Rhizopoda* (корненожек), классу *Lobosea*, подклассу *Gimnamoebia*, отряду *Amoebina* (т. е. с лопастевидными псевдоподиями «голые» амебы), сем. *Endamoebidae*.

Морфология. В цикле развития энтамеб различают две стадии: вегетативную (тканевую, большую, просветную, предцистную) и покоящуюся, или стадию цист (рис. 136). Все они имеют вид ядросодержащих телец. При этом вегетативные формы энтамеб содержат одно ядро, а цисты – от 1–3 (молодые) до 4 (зрелые); в центре каждого из них находится хорошо контурируемая кариосома в виде зернышка. Разные формы амеб отличаются по размерам, структуре цитоплазмы и наличию фагоцитируемых частиц. Так, диаметр тканевых энтамеб не превышает 20–25 мкм, у больших вегетативных форм (*forma magna*) – колеблется от 30 до 60 мкм, у просветных (*forma minuta*) и предцистных – уменьшается до 20–15, а у цист – до 9 мкм. Цитоплазма тканевых и больших вегетативных форм неоднородна, так как состоит из хорошо преломляющей свет гомогенной эктоплазмы (внешнего слоя) и располагающейся под ней тонкозернистой эндоплазмы. У остальных форм амеб цитоплазма однослойная: вакуолизированная –

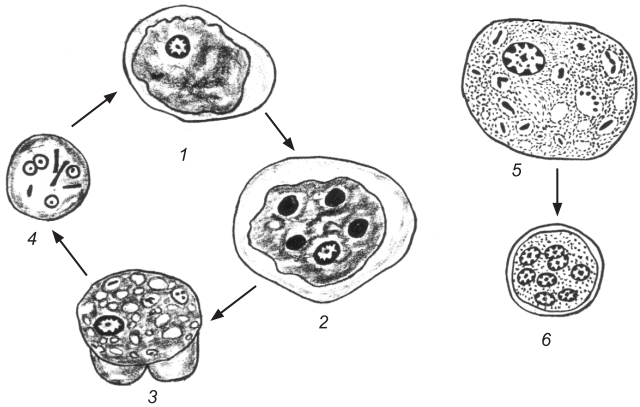


Рис.136. *Entamoeba histolytica* (*1–4*) и *Entamoeba coli* (*5–6*): *1* – тканевая форма; *2* – большая вегетативная; *3* – просветная; *4* – 4-ядерная циста; *5* – вегетативная форма; *6*– 8-ядерная циста

у просветных и тонкозернистая – у предцистных форм и цист. В цитоплазме больших вегетативных форм энтамеб часто содержатся эритроциты, у других форм – переваренные остатки пищи, в цистах – гликоген и хроматоидные палочки. Благодаря образованию псевдоподий энтамебы обладают медленным поступательным движением, но наиболее характерно оно для больших вегетативных форм.

Клиника и эпидемиология. Амебиаз – острая или хроническая кишечная инфекция, клинически труднодифференцируемая от бактериальной дизентерии: температура, как правило, субфебрильная или даже нормальная; интоксикация – незначительная. Острая форма амебиаза начинается с недомогания, болей в животе и поноса с выделением жидких фекалий, имеющих вид малинового желе. Проникая в подслизистую оболочку, амебы могут вызывать образование кратерообразных язв. Особую опасность представляют осложнения амебиаза перфоративным перитонитом, абсцессами печени, легких и головного мозга. Описаны амебные поражения промежности, ягодиц, влагалища и шейки матки. Заболевание распространено в тропических и субтропических регионах, встречается на Кавказе и Средней Азии. Источником амебиаза в преобладающем большинстве случаев являются амебоносители, выделяющие с фекалиями цисты. Попадая во

внешнюю среду, они сохраняются в почве около 30 сут, легко переносят низкие температуры, устойчивы к действию хлора и дезинфицирующих веществ, кислому содержимому желудка. Вследствие этого, заражение амебиазом происходит фекально-оральным путем при употреблении воды, овощей и других пищевых продуктов, зараженных спорами цистовыделителей. Большую роль в распространении амебиаза играют мухи.

Лабораторная диагностика. В распознавании амебиаза решающее значение имеет обнаружение в фекалиях вегетативных форм *E. histolytica* и ее цист. При этом на высоте заболевания обнаруживаются энтамебы-эритрофаги, а в период выздоровления – предцистные формы и, главное, 4-ядерные цисты. При микроскопическом исследовании нативных препаратов из фекалий с использованием нагревательного столика у амеб удается обнаружить псевдоподии и поступательное движение, а при добавлении концентрированного раствора Люголя – зерна гликогена в цистах. В гистологических срезах пораженных тканей и мазках из фекалий, обработанных железным гематоксилином или гематоксилин-эозином, цитоплазма вегетативных энтамеб окрашивается в серый цвет, а оболочка, ядра, кариосомы и эритроциты – в черный. В заключение следует отметить, что в кишечнике человека обитает неболезнетворная *Entamoeba coli*, которая намного крупнее дизентерийной, в ее цитоплазме содержатся бактерии, лейкоциты, но отсутствуют эритроциты; псевдоподии наблюдаются редко, а размер ее цист намного больше, чем у дизентерийной, и они содержат не 4, а 8 ядер (см. рис. 136). При внекишечных формах амебиаза прибегают к определению специфических антител в РНГА, РИФ, ИФА.

Культивирование. Выращивают *E. histolytica* на синтетической среде Павловой, содержащей в 500 мл дистиллированной воды 4,25 г NaCl, 0,3 г Na_2HPO_4, 0,5 г KH_2PO_4, 26 мл лошадиной сыворотки и 10 мг крахмала (навеска на кончике скальпеля). Пышный рост энтамеб получают на ней спустя 2–3 сут выращивания.

Патогенность. Вирулентность амеб варьирует. В некоторых случаях можно воспроизвести экспериментальный амебиаз. Наиболее чувствительны к дизентерийным амебам котята и белые крысы. Заражая их через прямую кишку, получают характерные изъязвления слизистой оболочки и даже абсцессы печени.

Лечение. В лечении амебиаза широко используют метронидазол (трихопол), хиниофон (ятрен), алкалоид корня ипекакуаны – эметин и 4-замещенное аминохинолина – хлорохин в комбинации с тетрациклинами. Все они нарушают синтез НК энтамебы. В частности, метронидазол, отличающийся универсальной амебоцидной активностью в отношении любой формы *E. histolytica*, подавляет синтез ее НК в результате прямого взаимодействия с нуклеотидами и множественного нарушения структуры ДНК под воздействием накапливающихся нитрозогидроксиламиногрупп, образующихся вследствие восстановления нитрогруппы препарата. Хиниофон подавляет жизнедеятельность просветных форм амеб, эметин действует на тканевые формы амебы в стенке кишечника и печени, хлорохин – на амебы в печени. Антипротозойный эффект тетрациклинов обусловлен влиянием их на бактерии, усугубляющие течение амебиаза.

Граф 113

Возбудители лейшманиозов

Таксономия. Лейшмании относятся к одноименному роду *Leischmania*, подтипу *Mastigophora*, классу *Zoomastigophora*, отряду *Kinetoplastida*. Различают четыре группы лейшманий.

1. Группа *L. donovani*, выделенная У. Лейшманом и Ч. Донованом в 1900–1903 гг. в Индии от больных кала-азар (черной болезнью), или, как теперь ее называют, висцеральным лейшманиозом.

2. Группа *L. tropica*, открытая в 1898 г. П.Ф. Боровским при кожном лейшманиозе в Средней Азии, где его, по привязанности к территории, характеру поражения кожи и длительности течения городские жители называли ашхабадкой, сухой язвой, годовиком, а сельские – пендинкой, мокнущей язвой, полугодовиком (сейчас лейшманиоз Средней Азии называют лейшманиозом Старого Света, ашхабадку – антропонозным, а пендинку – зоонозным лейшманиозом).

3. Группа *L. mexicana*, вызывающая кожный лейшманиоз Нового Света.

4. Группа *L. brasiliensis*, являющаяся возбудителем кожно-слизистого лейшманиоза Нового Света, который в Центральной и Южной Америке, где он встречается, называют эспундией.

В составе каждой группы лейшманий выделяют по 3–4 подвида: в гр. *L. donovani* – подвиды *donovani*, *infantum*, *archibaldi*; в гр. *L. tropica* – *tropica* (*minor*), вызывающая антропонозный кожный лейшманиоз, *major* – зоонозный и др.; в гр. *L. mexicana* – *mexicanica*, *amazonensis*, *venezuelensis* и др.; в гр. *L. brasiliensis* – *brasiliensis*, *panamensis* и др.

Клиника и эпидемиология. *Висцеральный лейшманиоз, или болезнь кала-азар,* развивается исподволь. Вслед за первичным аффектом (папулой) у больных появляется волнообразная лихорадка (37,5–38 °С), бледность кожных покровов, увеличение селезенки, печени и лимфатических узлов. В разгаре болезни кожа становится восковидной, иногда с землянистым оттенком, а при гиперфункции надпочечников – темной (кала-азар). Больные теряют в весе, и у них развивается кахексия, появляются отеки и кровоизлияния в кожу и внутренние органы, кровотечения из носа и десен, резко ухудшаются показатели крови.

При отсутствии лечения больные погибают через 1,5–3 года. У маленьких детей висцеральный лейшманиоз протекает в более тяжелой форме с явлениями интоксикации и прогрессивного поражения внутренних органов на фоне высокой температуры (39–40 °С) и заканчивается летальным исходом через 3–6 – 9–12 мес.

Нозологические формы кожных лейшманиозов начинаются с возникновения одиночной или множественных папул (бугорков), которые со временем подвергаются деструкции и рубцеванию. Так, при лейшманиозах Старого Света папулы образуются на лице, шее и конечностях, изъязвляются через 3–5 мес., а рубцуются через 1 год (антропонозный лейшманиоз) или же быстро некротизируются с полным рубцеванием язв через 5–6 мес. (зоонозный лейшманиоз). Специфической особенностью лейшманиозов Нового Света является то, что лейшманиозные папулы, язвы и рубцы у мексиканцев обычно локализуются на ушах и приводят к грубым деформациям ушных раковин (кожная форма), а у бразильцев и панамцев – в области носогубного треугольника, где лейшманиозный процесс вызывает у них вначале деформирование рта и носа, заканчивающееся разрушением носовой перегородки, твердого нёба и деструктивными изменениями в глотке (кожно-слизистая форма, или эспундия).

Лейшманиозы – трансмиссивные эндемичные инфекции, распространенные в тропиках и субтропиках; они спорадически встречаются на всех континентах, кроме Австралии. Источником висцерального лейшманиоза являются грызуны, лисы, шакалы и собаки (в Индии и Бангладеш – исключительно человек); зоонозного кожного лейшманиоза Старого Света – мыши, грызуны, песчанки; антропонозного (городского) – больные им люди кожного и кожно-слизистого лейшманиоза Нового Света – лесные грызуны. Переносят лейшманиозы в Средней Азии москиты рода *Phlebotomus*, а в Центральной и Южной Америке – москиты *Lutzomyia*.

Биологические особенности лейшманий. *Морфология.* Лейшмании морфологически тождественны. В их жизненном цикле различают две последовательно сменяющиеся стадии развития: безжгутиковую (лейшманиальную) стадию амастигот, паразитирующих внутриклеточно в коже, слизистых оболочках, селезенке, печени, лимфатических

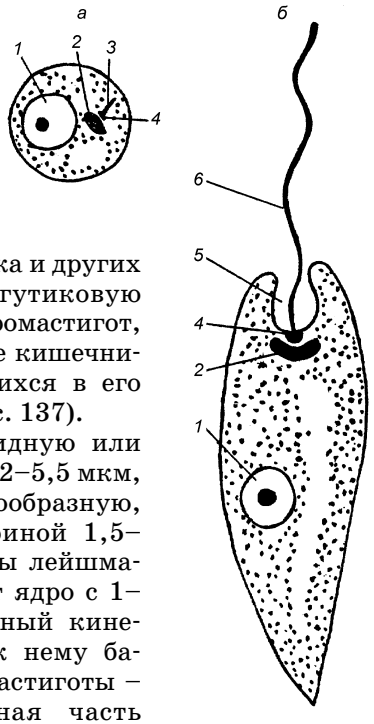


Рис.137. Амастиготы (а) и промастиготы (б) лейшманий:
1 – ядро; *2* – кинетопласт; *3* – ризопласт; *4* – базальное тело жгута; *5* – жгутиковый карман; *6* – жгут

узлах, костном мозге человека и других позвоночных хозяев; и жгутиковую (лептомонадную) стадию промастигот, размножающихся в просвете кишечника москита и скапливающихся в его глотке спустя 9–10 дней (рис. 137).

Амастиготы имеют овоидную или округлую форму диаметром 2–5,5 мкм, а промастиготы – веретенообразную, длиной 12–20 мкм и шириной 1,5–3,5 мкм. Те и другие формы лейшманий в цитоплазме содержат ядро с 1–2 ядрышками, палочковидный кинетопласт и примыкающее к нему базальное тело жгутика; у амастиготы – ризопласт (внутриклеточная часть жгутика), у промастиготы – жгут длиной 16–20 мкм, выходящий из тела через жгутиковый карман, образованный инвагинацией клеточной мембраны. Тело лейшманий покрыто трехслойной мембраной, под которой расположен слой 100–200 микротрубочек. По Романовскому – Гимзе цитоплазма лейшманий окрашивается в серо-голубой цвет, ядро – в красно-фиолетовый, кинетопласт – в темно-фиолетовый, ризопласт и жгут – в розовый. Размножаются лейшмании продольным делением надвое.

Культивирование. Лейшмании выращивают в культурах клеток и на кровяном агаре Николя – Нови – Ниля (900 мл дистиллированной воды, 14 г агар-агара, 6 г хлористого натрия, 10–25 % дефибринированной кроличьей крови – pH 7,4–7,6), засевая пунктаты костного мозга, грудины, лимфатических узлов, печени и грануляционной ткани. При этом в монослое клеток получают амастиготы, а на питательной среде NNN – промастиготы.

Патогенность. К лейшманиям чувствительны экспериментальные животные, но вызвать генерализованную инфекцию удается у них не всегда. В положительных случаях паразиты обнаруживаются в селезенке, печени, костном мозге.

Иммунитет. При висцеральном лейшманиозе антитела начинают вырабатываться уже на ранних стадиях болезни. При кожных формах они обнаруживаются нерегулярно и, как правило, в низких титрах. В процессе болезни возникает аллергизация организма. Больные зоонозным кожным лейшманиозом Старого Света реагируют положительной реакцией на лейшмании с 10–15-го дня болезни, антропонозным – на 6-й мес., а висцеральными формами – после перенесенной инфекции. Полную невосприимчивость к суперинфекции у больных зоонозной формой лейшманиоза можно констатировать на стадии язвы к 3–4-му мес. заболевания, а у больных антропонозной формой – на 10–12-м мес. После перенесенного висцерального лейшманиоза развивается стойкая невосприимчивость к реинфекции. Повторные заболевания кожными формами лейшманиоза встречаются не чаще 2 % случаев.

Лабораторная диагностика. Диагноз лейшманиоза основан: 1) на обнаружении амастигот в мазках из соскобов и отделяемого язв, пунктатов костного мозга и лимфатических узлов, реже – из крови (кала-азар); 2) промастигот в мазках из культур, выросших на среде NNN, в которых лейшмании под иммерсионным микроскопом располагаются в виде звездчатых связок, сцепленных переплетенными жгутами (рис. 138); 3) положительной

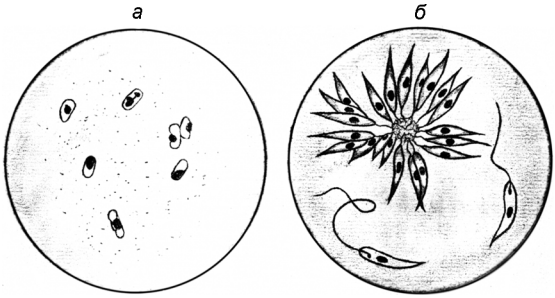
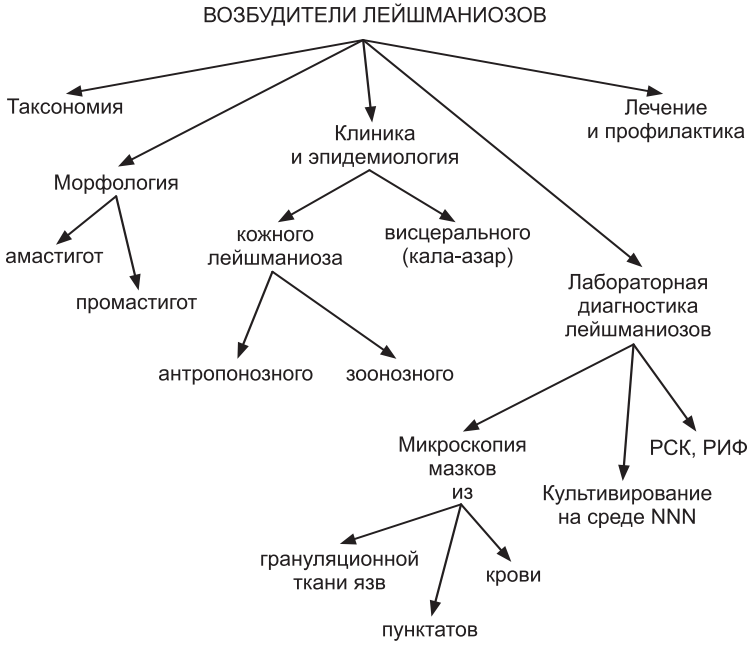


Рис. 138. Лейшмании:
а – безжгутиковые формы из язвы кожного лейшманиоза;
б – жгутиковые культуральные формы

РСК, РИФ, РНГА, РИА, ИФА с лейшманиозным антигеном; 4) положительной кожно-аллергической пробе с лейшманином.

Лечение и профилактика. Лейшманиозным больным назначают солюсурьмин или другие органические соединения пятивалентной сурьмы, которые, трансформируясь в трехвалентные, связывают SH-группы белков, блокируя ферменты лейшманий, участвующие в гликолизе и цикле Кребса. Применяется также глюкантим и пентамидин. Для лечения кожных форм лейшманиоза используются мепракин (акрихин) и метронидазол. Профилактические меры направлены на обезвреживание источников инфекции, в частности на уничтожение грызунов и бродячих собак. В борьбе с москитами используются инсектициды и репелленты, защитная одежда. Для профилактики кожных лейшманиозов используется живая вакцина; спустя 3 мес. у привитых вырабатывается прочный, практически пожизненный иммунитет.



Граф 114

Возбудители трипаносомозов

Таксономия. Возбудителями трипаносомозов человека в современной систематике являются два вида: 1) *Trypanosoma brucei* (Брюса), вызывающая африканский трипаносомоз, в состав которого на положении подвидов вошли гамбийская *T. gambiense*, открытая Дж. Даттоном (1902), и родезийская *T. rhodesiense*, описанная Г. Фентемом (1910); 2) американская *T. cruzi* (Круза), выделенная в 1909 г. К. Шагасом. Оба вида относятся к роду *Trypanosoma* (*trypanon* – бурав, some – тело) подтипу *Mastigophora*, классу *Zoomastigophora*, отряду Kinetoplastida, семейству *Tripanosomatidae*.

Морфология. Кровяные трипаносомы представляют собой извилистые, продолговатые, ядросодержащие тела размером 15–30 мкм в длину и 2–2,5 мкм в поперечнике, покрытые пелликулой, которая, будучи приподнятой по одному краю жгутиком, образует волнообразную перепонку, именуемую ундулирующей мембраной. Жгутик начинается у заднего конца трипаносом от базального тельца, примыкающего к кинетопласту. Тканевые внутриклеточные формы трипаносом утрачивают жгутики и приобретают округлую лейшманиальную форму, крайне редко встречаемую в препаратах крови (рис. 139). По Романовскому – Гимзе цитоплазма трипаносом окрашивается в голубой цвет, ядро, кинетопласт и жгутик – в красный. Размножаются трипаносомы путем продольного деления.

Рис. 139. Трипаносомы:
1 – ундулирующая мембрана;
2 – трофонуклеус; *3* – жгутик

Клиника и эпидемиология. В настоящее время выделяют африканский и американский трипаносомозы. При том и другом заболевании развивается паразитемия, сопровождающаяся лихорадкой, поражениями периферических лимфоузлов, внутренних органов и нервной системы.

Характерным признаком африканского трипаносомоза является сонливость, ввиду чего в Западной Африке его называют гамбийской, а в Восточной – родезийской сонной болезнью.

Гамбийский вариант сонной болезни отличается длительным течением, в котором выделяется ранний период продолжительностью от 1 года до 5 лет, и поздний, длительность которого не превышает 8 мес. Для первого периода сонной болезни характерна длительная лихорадка, головные боли, эритематозные высыпания на коже, отеки на лице, увеличение периферических лимфатических узлов (особенно затылочных) и ночная бессонница. Во втором периоде появляется постоянная сонливость, развивается тремор (подергивание) рук и ног, сменяющийся парезами и параличами, нарушением психики. Родезийская форма сонной болезни протекает значительно быстрее, и больные обычно погибают в течение 6–9 мес. в результате поражения мозга и миокарда.

Американский трипаносомоз, называемый также бразильским или болезнью Шагаса – Круза, начинается с недомогания, лихорадки, озноба, головных и мышечных болей, далее поражается печень, селезенка, лимфатические узлы. Острая форма, проявляющаяся, как правило, у детей первого года жизни, продолжается около 1 мес. и заканчивается смертельным исходом от сердечно-сосудистой недостаточности. В более старшем возрасте и у взрослых американский трипаносомоз протекает в хронической форме, вызывая деструкцию внутренних органов, подчас без клинической симптоматики.

Источником гамбийской формы сонной болезни является больной человек (паразитоноситель), а родезийской формы – мелкие антилопы. Переносят гамбийскую форму мухи цеце группы *Glossina palpalis*, обитающие около водоемов, а родезийскую форму – мухи цеце группы *Glossina morsitans*, живущие в саванне. Мухи передают возбудителей со слюной при кровососании человека, что впервые выяснил Д. Брюс. Характерно, что на месте укуса мухи цеце через 5 дней возникает плотный, болезненный, иногда изъязвляющийся волдырь диаметром 10–20 мм.

Источниками болезни Шагаса в природе являются броненосцы, опоссумы, обезьяны, а в синантропных очагах – человек, собаки, кошки, свиньи и, возможно, другие домашние животные. Возбудитель переносят питающиеся кровью, летающие, с яркой окраской «поцелуйные клопы» рода *Triatoma*, которые кусают человека в лицо (чаще в губы) и одновременно выделяют с фекалиями инвазив-

ные трипаносомы. Кожный первичный аффект на месте внедрения *T. cruzi* по внешнему виду напоминает фурункул, а конъюнктивальный – воспалительный процесс конъюнктивы глаза с отеком век и увеличением затылочных и челюстных лимфатических узлов.

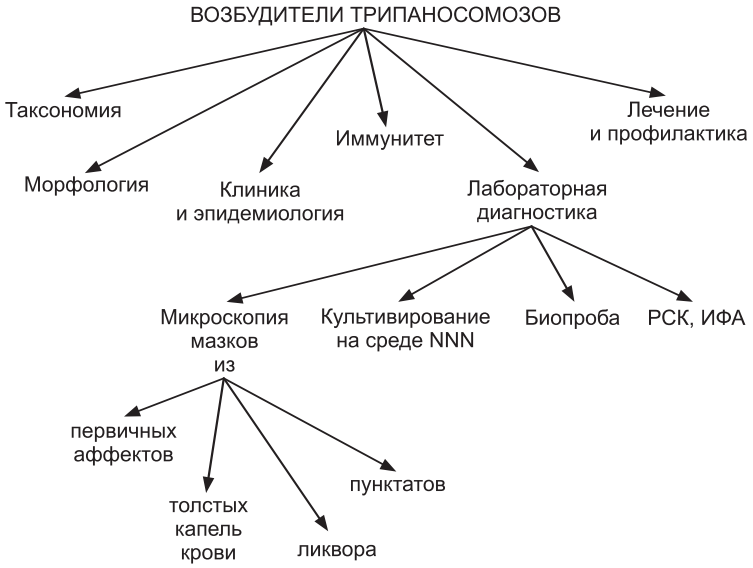
Иммунитет. В процессе развития трипаносомозов в сыворотке крови больных появляются комплементсвязывающие антитела, трипанолизины, тромбоцитобарины, обусловливающие прилипание тромбоцитов к трипаносомам. Трипаноцидного действия они, однако, не оказывают вследствие быстро возникающей у трипаносом антигенной изменчивости, что в итоге приводит к непрерывно прогрессирующему процессу без тенденции к самоизлечению.

Лабораторная диагностика. Диагноз трипаносомозов в ранних (острых) периодах болезни основан на микроскопическом исследовании мазков из первичных аффектов и толстых капель из крови. В позднем менингоэнцефалитическом периоде гамбийской формы сонной болезни мазки делают из спинномозговой жидкости и пунктатов пораженных лимфатических узлов. Возбудителей африканских трипаносомозов удается выделить путем засева патологических материалов больных на среду NNN и в цитратную человеческую кровь на растворе Рингера.

К возбудителям трипаносомозов чувствительны лабораторные животные. В частности, кровью, ликвором и пунктатом лимфоузлов больных легко заразить белых мышей, крыс и морских свинок с последующим выявлением трипаносом в мазках из крови больных животных. Наличие специфических антитрипаносомных иммуноглобулинов определяют с помощью РСК, РИФ и ИФА.

Профилактика и лечение. Специфическая профилактика трипаносомозов не разработана. В борьбе с ними используют инсектициды, которыми обрабатывают жилые помещения и хозяйственные постройки для животных, где обитают «поцелуйные клопы». С целью уменьшения числа биотопов мух цеце расчищают кустарниковые заросли. Защиту людей от нападения мух и клопов осуществляют сетками, пологами. В годы эпидемических подъемов гамбийской сонной болезни проводят массовую химиопрофилактику пентамидином, назначая его по 3–4 мг на 1 кг внутримышечно 1 раз в 6 мес. Эффективность лече-

ния трипаносомозов зависит от стадии и нозологической формы болезни. Так, в раннем периоде сонной болезни применяют сурамин (при гамбийской форме – также пентамидин), а в позднем – меларсопрол (арсобал) или другие мышьяковистые препараты, хорошо проникающие через гематоэнцефалический барьер в ткань мозга. Для лечения американского трипаносомоза рекомендуют применять 8-замещенные производные аминохинолина, в частности примаквин (примахин).



Граф 115

Возбудитель трихомоноза

Таксономия. Возбудитель трихомоноза – *Trichomonas vaginalis* (влагалищная), открытая в 1836 г. А. Донне, и родственные ей трихомонады – *T. tenax* (ротовая) и *T. hominis* (кишечная), – обитающие в полости рта и толстом отделе кишечника на положении комменсалов организма человека, относятся к подтипу *Mastigophora*, классу *Zoomastigophora*, отряду *Trichomonadida*.

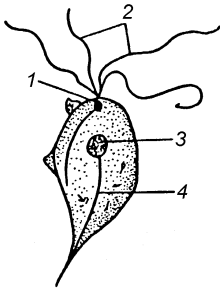


Рис.140. Трихомонады:
1 – блефаробласт; 2 – жгутики; 3 – ядро с ядрышком; 4 – аксостиль

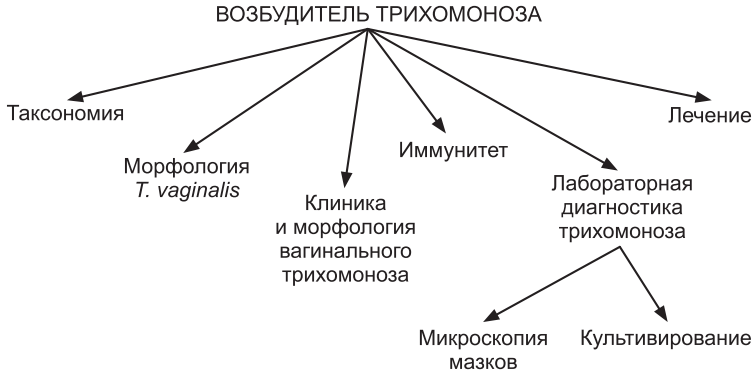
Морфология вагинальных трихомонад. *Trichomonas vaginalis* имеет овоидную форму и диаметр от 10 до 25 мкм. На ее широкой передней части имеются четыре жгутика, ядро с ядрышком и блефаробласт. Проходящий через ее тело аксостиль выходит наружу в виде острия (рис. 140).

Клиника и эпидемиология. Трихомоноз – венерическое заболевание, проявляющееся у женщин воспалительными процессами во влагалище, мочеиспускательном канале и мочевом пузыре, а у мужчин – поражением уретры, простаты, яичек. Протекает трихомоноз хронически с периодами ремиссий и обострений. У женщин преобладают зуд и чувство жжения в области наружных половых органов и промежности с пенистыми выделениями желтого цвета из влагалища, у мужчин – учащенное болезненное мочеиспускание. Источником инфекции являются больные люди и носители трихомонад. Заражение происходит половым путем, а также через предметы туалета, губки, унитазы.

Иммунитет. Естественный иммунитет к трихомонадам у людей отсутствует. В процессе болезни к ним вырабатываются агглютинины и комплементсвязывающие антитела, возникает аллергизация организма, но эти иммунологические сдвиги реинфекции не предупреждают.

Лабораторная диагностика. Диагностика трихомоноза основана на микроскопии нативных и окрашенных по Романовскому – Гимзе мазков-препаратов из содержимого влагалища, шейки матки, уретры, осадка мочи. Культивируют трихомонады при температуре 36 °С в МПБ с 0,1 % глюкозы и 10 % сыворотки лошади или человека, добавляя к нему 30 ЕД пенициллина и 200 ЕД стрептомицина на 1 мл. Они вырастают через 3–6 дней, скапливаясь на дне пробирки.

Лечение. Среди противотрихомонадных средств наибольшее распространение получили трихомонацид, метронидазол (фасижин, флагил), тинидазол, нитазол, орнидазол, сульфазин.



Граф 116

Возбудитель жиардиоза (лямблиоза)

Таксономия. Возбудитель жиардиоза (лямблиоза) впервые описал Д.Ф. Лямбль в 1859 г. Теперь его в честь А.М. Жиара называют *Giardia intestinalis* или *G. lamblia* (син. *Lamblia intestinalis*) и относят к подтипу *Mastigophora*, классу *Zoomastigophorea*, отряду *Diplomonadida*, сем. *Hexamitidae*.

Морфология. Различают две стадии развития жиардий – вегетативную и цистную. Вегетативная стадия, или трофозоит, напоминает собой тыквенное семя длиной 10–18 и шириной 8–10 мкм с двумя ядрами и присоской в виде дисковидного вдавления в широкой передней части. В ее структуре различают два плотных парабазальных тела и четыре пары жгутиков (рис. 141). Вегетативные жиардии размножаются продольным делением.

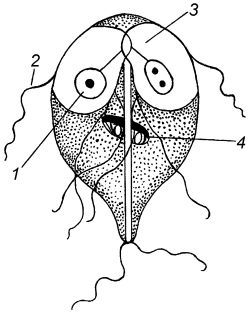


Рис.141. Жиардии (лямблии):
1 – ядро; *2* – жгутики; *3* – присасывательный диск; *4* – медиальные тела

Цисты, образующиеся из трофозоитов, представляют собой овальные образования размером 10 × 8 мкм. В инцистированном состоянии жиардии покрыты

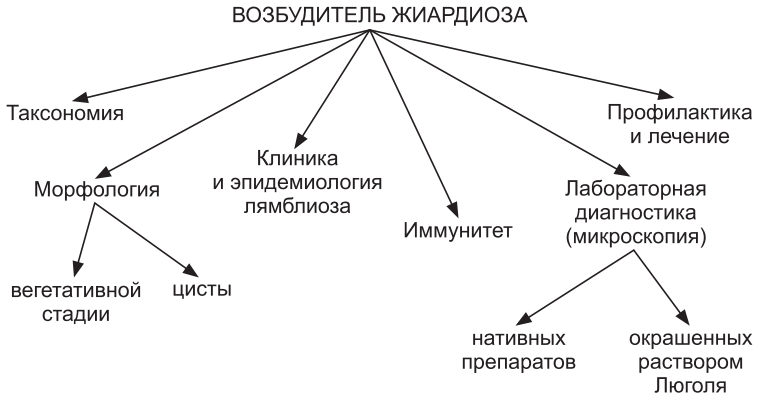
двойной оболочкой, содержат 2–4 ядра, фрагменты присасывательного диска и продольный пучок аксонем жгутиков.

Клиника и эпидемиология. Жиардиоз – кишечная инфекция, развивающаяся на фоне дисбактериозов, гастритов, холециститов и вялотекущих воспалительных процессов в кишечнике. Проявляется заболевание тошнотой, изжогой, болями в животе, метеоризмом, диареей, истощением и другими симптомами общего недомогания. Источниками инвазии являются человек, свиньи и обезьяны, выделяющие цисты жиардий с калом. Заражение ими здоровых людей происходит фекально-оральным путем.

Иммунитет. Длительное течение жиардиоза у людей объясняется иммунодефицитным состоянием организма. В процессе инвазии наблюдаются повышенная секреция IgAS в слизистой оболочке кишечника и умеренное снижение сывороточных иммуноглобулинов.

Лабораторная диагностика. Выявление жиардий не представляет затруднений. Вегетативные формы обнаруживают в нативных препаратах из дуоденального содержимого или жидких фекалий, полученных после дачи слабительного, когда эвакуация содержимого тонкой кишки совершается так быстро, что трофозоиты не успевают инцистироваться, а цисты – в мазках из оформленного кала, окрашенных раствором Люголя. При этом следует учитывать высокую зараженность жиардиями детей (60–80 %) и взрослых (15 %) без каких бы то ни было проявлений жиардиоза.

Профилактика и лечение. Снижение пораженности населения жиардиями может быть достигнуто соблюдением правил личной гигиены. К числу важных мер профилактики жиардиоза в детских учреждениях относится обезвреживание кипятком или дезинфицирующими растворами горшков, стульчаков, ручек, дверей, кранов умывальников, а также щеток, веников и ведер после уборки помещений. Больных жиардиозом и носителей не изолируют. Специфическая терапия проводится метронидазолом, энтеросептолом и другими производными оксихинолина, хлорохином, эметином, фуразолидоном, фурагином.



Граф 117

ТИП APICOMPLEXA

Плазмодии малярии

Таксономия. Плазмодии малярии относятся к одноименному роду Plasmodium, классу *Sporozoa* (*spora* – семя), отряду Coccidiida (истинные кокцидии), подотряду *Haemosporina*. У человека малярию вызывают четыре вида плазмодиев. Первый из них – *Plasmodium malariae* – был открыт в 1880 г. основателем протистологии лауреатом Нобелевской премии А. Лавераном; *P. vivax* – Дж. Грасси и Р. Фелетти (1890); *P. falciparum* – У. Уэлчем (1897); *P. ovale* – Ж. Стивенсом (1922). При этом *P. vivax* вызывает 3-дневную малярию, P. malariae – 4-дневную, *P. falciparum* – тропическую, а *P. ovale* – овале-малярию. Плазмодии отличаются не только тем, что вызывают разные формы малярии, но также вирулентностью, чувствительностью к химическим препаратам и другими биологическими особенностями, что, в частности, находит свое отражение в названиях двух разновидностей *P. vivax*: северной (*P. v. hibernans*) – с инкубационным периодом 6–13 мес. и южной (*P. v. vivax*) – с инкубацией 7–21 сут.

Цикл развития плазмодиев. Плазмодии малярии характеризуются сложным циклом развития. Один из них – шизогония (бесполый цикл) – происходит в организме человека, другой – спорогония (половое развитие) – в организме самок комаров рода *Anopheles*.

Шизогония. Бесполый цикл развития плазмодиев наступает вслед за проникновением в кровь человека спорозоитов из слюнных желез комара при укусах. При этом различают экзоэритроцитарную и эритроцитарную шизогонию.

Экзоэритроцитарная шизогония протекает в печени человека, куда с кровью заносятся спорозоиты. Здесь они внедряются в гепатоциты, округляются и превращаются в трофозоиты, а затем – в экзоэритроцитарные шизонты. Созревание шизонтов в гепатоцитах длится от 6 (*P. falciparum*) до 15 сут (*P. malariae*) и заканчивается поступлением в плазму крови 10 000 – 50 000 овальных экзоэритроцитарных мерозоитов размером 2,5 × 1,5 мкм.

Эритроцитарная фаза развития плазмодиев начинается с проникновения экзоэритроцитарных мерозоитов в эритроциты, где они увеличиваются и превращаются вначале в бесполые стадии – трофозоиты (растущие паразиты), а затем – в шизонты (делящиеся паразиты) и половые формы – гаметоциты (рис. 142).

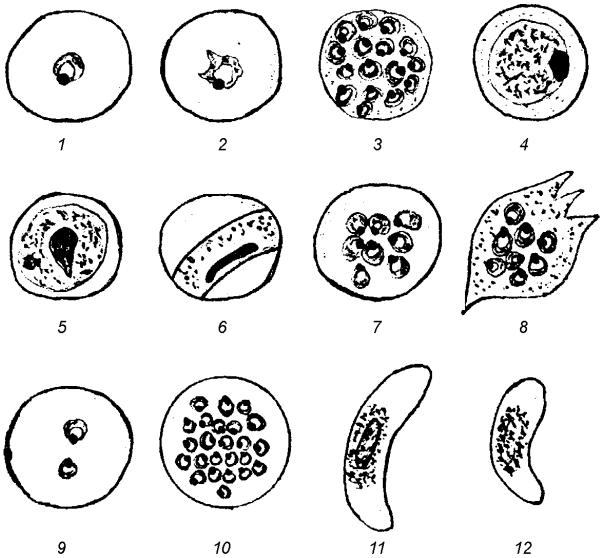


Рис. 142. Основные кровяные формы плазмодиев малярии:
1, 2, 3, 4, 5 – соответственно кольцевидные, юные трофозоиты, зрелый шизонт, женские и мужские гаметоциты *P. vivax*; *6, 7* – взрослый трофозоит и зрелый шизонт *P. malariae*; *8* – зрелый шизонт *P. ovale*; *9, 10, 11, 12* – соответственно кольцевидные трофозоиты, зрелый шизонт, женские и мужские гаметоциты *P. falciparum*

Различают кольцевидный, юный, полувзрослый и взрослый трофозоиты. Первые две формы плазмодиев имеют малые размеры (1–2 мкм), отличаются тонким слоем цитоплазмы, в виде ободка окружающий вакуоль (у юного трофозоита в ней встречаются мелкие зерна-пигменты); паразиты занимают около трети или почти половину объема эритроцита. Более зрелые трофозоиты, диаметр которых достигает 4 × 6 мкм, имеют отчетливо выраженную цитоплазму, ядро и пигмент; полувзрослый трофозоит занимает более половины, а взрослый – почти весь эритроцит. У шизонта, заполняющего эритроцит целиком, вакуоль отсутствует, ядро округлое, цитоплазма разделяется, пигмент – в виде компактной кучки. В зависимости от вида плазмодия шизонты в эритроците образуют от 8 до 24 подвижных, удлиненной формы мерозоитов размером 1,5 × 1,0 мкм. После разрыва эритроцитов они поступают в кровеносное русло и через 10–15 мин внедряются в новые красные кровяные тельца. Продолжительность шизогонии у *P. vivax*, *P. ovale* и *P. falciparum* – 2 сут, у *P. malariae* – 3 сут.

Кроме трофозоитов и шизонтов, образуются также гаметоциты. В зрелой форме они представляют собой одноядерные паразиты округлой, а у *P. falciparum* – полулунной формы без вакуолей и псевдоподий. Как и шизонты, они занимают почти весь эритроцит. Женские гаметоциты (макрогаметоциты) отличаются от мужских (микрогаметоцитов) небольшим, компактным, эксцентрично расположенным ядром (1/8–1/10 диаметра паразита). У мужских клеток – ядро большое (занимает 1/2–1/3 паразита), рыхлое, находится в центре гаметоцита. Зрелые гаметоциты *P. falciparum* сохраняются в крови несколько недель, у других видов – отмирают в течение суток.

Спорогония. Бесполый цикл развития малярийного плазмодия происходит в организме самки комара *Anopheles*, питающейся, в отличие от самца, кровью человека. Попав в ее желудок, макро- и микрогаметы сливаются в зиготу, которая, удлиняясь и приобретая подвижность, превращается в ооокинету. Проникнув через стенку желудка комара под его наружную оболочку, ооокинета округляется, вокруг нее образуется капсула, и она превращается в ооцисту, внутри которой в результате деления ядра и цитоплазмы появляется около 10 000 серповидных спорозоитов длиной 10–15 мкм и шириной 1,5 мкм. Спо-

рогония протекает при температуре 10–30 °С. Ее продолжительность у разных видов возбудителей малярии колеблется от 7 до 45 дней. Комар становится заразным после того, как спорозоиты из его гемолимфы проникают в слюнные железы.

Клиника и эпидемиология. Малярия (*mal* и *aria* – дурной воздух) – природно-эндемическая инфекция. Инкубационный период малярии зависит от вида возбудителя и в среднем колеблется от 6 до 42 дней (исключение составляет северная разновидность *P. vivax*). Малярийный приступ начинается с озноба, который продолжается от получаса до 2–3 ч и переходит в фазу жара, длящуюся от нескольких часов до 1 сут. Температура в фазе жара достигает 40–41 °С, лицо больного краснеет, появляются одышка, возбуждение, часто – рвота, резко усиливается головная боль. Заканчивается приступ снижением температуры до нормы, что сопровождается сильным потоотделением в течение 2–5 ч. Затем наступает глубокий сон. При типичной форме болезни приступы 3-дневной малярии и овале-малярии наступают через один день, при 4-дневной – через два, при тропической – ежедневно. Обычно они возникают в одно и то же время. После нескольких приступов увеличиваются селезенка и печень (нередко возникает желтуха), развивается анемия. Без всякого лечения приступы малярии после многократного повторения могут спонтанно прекращаться, за исключением тропической малярии. Полного выздоровления, однако, не наступает.

Область возможного распространения малярии лежит между 45° северной и 40° южной широты, где среднесуточная температура не ниже 16 °С. Источником инфекции являются больные малярией люди или паразитоносители, в периферической крови которых имеются половые формы плазмодиев. Заболевание переносят 25–30 видов комаров рода *Anopheles*. В летний сезон самка *Anopheles* делает несколько кладок по 100–250 яиц. Созревают яйца комаров при температуре 15 °С за одну неделю, а при 25 °С – на третий день. Этим определяется сезонность малярии: наиболее высокая инфицированность людей приходится на теплое время года, когда резко увеличивается количество комаров. В зимние месяцы паразиты погибают в организме самки комара, но сохраняются у людей, от которых по весне заражается новая генерация выплодившихся комаров.

Иммунитет. В процессе эволюции у человека сформировалась врожденная генотипическая и приобретенная устойчивость к малярии. В частности, врожденная устойчивость к *P. falciparum* определяется типом гемоглобина в эритроцитах, нарушением синтеза входящего в его состав глобина (таласемия), дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. В эндемических очагах с высокой пораженностью населения новорожденные в течение первого года не болеют малярией, так как обладают пассивным иммунитетом. На втором году жизни иммуноглобулины исчезают, и заразившиеся плазмодием дети приобретают к нему активный иммунитет, обеспечивающий крайне низкий уровень паразитемии. У взрослых иммунитет к малярии поддерживается проэпидемичиванием (повторными заражениями). Противомалярийный иммунитет у людей утрачивается спустя 1–2 года в случае переезда в свободные от малярии регионы. После перенесенной малярии возникает нестерильный, видоспецифический, нестойкий и непродолжительный иммунитет, который обеспечивается клеточными и гуморальными факторами. На ранней стадии инвазии защита организма осуществляется фагоцитами. При малярии наблюдается интенсивная продукция IgG, препятствующих прикреплению мерозоитов к эритроцитам и таким образом блокирующих эритроцитарный цикл развития паразита.

Лабораторная диагностика. Диагностика малярии основана на микроскопии крови больных. Ее берут во время или перед началом малярийного приступа. Готовят обычный мазок и толстую каплю крови, распределяя ее на предметном стекле площадью 10 × 10 мм (см. «Лабораторную диагностику рекуррансов»). Тот и другой препараты окрашивают в течение 1 ч по Романовскому – Гимзе. Микроскопию обычно начинают с толстой капли крови. Обнаружить плазмодии в ней не составляет большого труда, но в незафиксированном препарате они при окраске нередко деформируются, что затрудняет видовую идентификацию. В таких случаях обращаются к мазку, тщательно изучая в нем форму, размеры, структуру, окраску пораженных эритроцитов и расположенных в них паразитов. В частности, на разных стадиях развития плазмодии в мазке могут быть представлены молодыми формами (кольцами), трофозоитами, шизонтами и гаметоцитами.

При трех-, четырехдневной малярии и овале-малярии в эритроците находят не более одного, а при тропической – два и даже три паразита. Трофозоиты *P. vivax* имеют причудливую форму, мелкие ядра и псевдоподии, у остальных видов плазмодиев они, как правило, компактны. Шизонты *P. ovale* и *P. malariae* разделяются на 8–10 мерозоитов, *P. vivax* – на 16–24 и *P. falciparum* – на 12–24. Правда, шизонты *P. falciparum* в периферической крови встречаются крайне редко; обычно находят в ней только кольца и гаметы. Диаметр эритроцитов, пораженных *P. vivax*, увеличен, а эритроциты, содержащие *P. ovale*, приобретают удлиненную форму. При этом по Романовскому – Гимзе эритроциты окрашиваются в слабо-розовый цвет; тело плазмодия – в голубой, его ядро – в красный, глыбки пигмента – в коричневый; цитоплазма макрогаметоцитов – в ярко-голубой, а их ядра – в интенсивно-красный; цитоплазма микрогаметоцитов – в бледно-голубой, а их ядра – в розовый.

В последнее время для подтверждения диагноза малярии используют непрямую РИФ и ИФА, позволяющие обнаружить на второй неделе заболевания специфические к плазмодиям антитела. Большие надежды возлагаются на ДНК-зонды, с помощью которых можно выявить даже небольшое количество специфических нуклеотидов ДНК плазмодиев.

Профилактика и лечение. Профилактика малярии проводится в нескольких направлениях. При выезде людей в эндемичные по малярии местности им назначают регулярные приемы хингамина (делагила), а в районах с хингамин-устойчивыми штаммами плазмодиев – фансидар (комбинация сульфадоксина и периметамина). Химиопрофилактика начинается за 2–3 дня до прибытия в очаги инфекции и заканчивается месяц спустя после выезда из них. Мероприятия по предупреждению последствий завоза малярии включают лечение больных и санацию паразитоносителей как источников инфекции.

Другая группа мероприятий направлена на истребление личинок в водоемах и окрыленных комаров-переносчиков с помощью ландшафтного переустройства местности и инсектицидов. Важное значение имеют также средства механической защиты людей от комаров и использование репеллентов.

В лечении малярии используются многочисленные противомалярийные препараты, которые по механизму дей-

ствия подразделяются на гемошизонтотропные, вызывающие гибель бесполых кровяных форм плазмодиев; гистошизонтотропные, воздействующие на плазмодиев, развивающихся в гепатоцитах; гамонтотропные, оказывающие протистоцидное действие на половые формы плазмодия. В частности, гемошизонтотропными препаратами являются хлорохин, пириметамин, доксициклин, хинин, артемизинин и др. Лучшими среди гистошизонтотропных и гамонтотропных препаратов являются хлоридин, примаквин, тетрациклин, а также истинно гамонтотропный тиазиновый метаболит – прогуанил (бигумаль).

Граф 118

Возбудитель токсоплазмоза

Таксономия. Возбудитель токсоплазмоза *Toxoplasma gondii* относится к классу *Sporozoea*, отряду *Coccidiida*, подотряду *Eimeriina*. Видовое название получил от грызунов *Ctenodactyluc gundi*, из организма которых в 1908 г. был выделен Ш. Николем и Л. Мансо, а родовое – по характерной форме полумесяца (*toxon* – дуга и *plasma* – тело). Длина токсоплазм 4–7, а ширина 2–4 мкм. Окрашиваются они по Романовскому – Гимзе: цитоплазма – в голубой, а

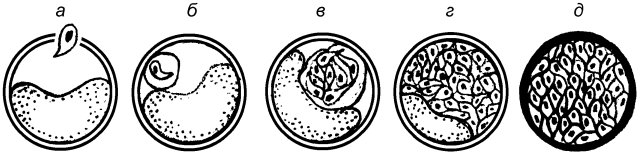


Рис. 143. Токсоплазмы:
а – T. gondii (спорозоит, цистозоит); *б* – эндозоит в паразитофорной вакуоле клетки-хозяина; *в* – псевдоциста; *г* – внутриклеточная циста; *д* – внеклеточная циста

ядро – в красный цвета. Располагаются токсоплазмы внеили внутриклеточно.

Человек, животные и птицы для токсоплазм являются промежуточными хозяевами. В их организме токсоплазмы проходят бесполое размножение (шизогония, спорогония). Накапливаясь в цитоплазме клеток человека, при острой форме токсоплазмоза они образуют простое скопление, или псевдоцисты, при разрушении которых токсоплазмы инвазируют новые клетки, и происходит повторение жизненного цикла паразита. При хроническом процессе псевдоцисты, приобретая плотную оболочку, превращаются в истинные цисты размером 100 мкм, содержащие более сотни токсоплазм-полумесяцев (рис. 143). Они сохраняются в организме инфицированных особей многие годы.

Половой цикл токсоплазм (гаметогония) протекает в организме окончательных хозяев, которыми являются кошачьи, заражающиеся при поедании мяса инфицированных животных и птиц. Проникшие в кишечник кошек паразиты в энтероцитах превращаются в трофозоиты, размножающиеся бесполым путем, а в подслизистом слое трансформируются в микро- и макрогаметы, после слияния которых образуются зиготы-ооцисты диаметром 9–14 мкм. Их окончательное дозревание происходит в окружающей среде, куда они попадают с испражнениями основных хозяев. Промежуточные хозяева заражаются зрелыми спорозоитами по форме идентичными *T. gondii*.

Клиника и эпидемиология. Различают врожденный и приобретенный токсоплазмоз. Врожденный токсоплазмоз развивается в результате внутриутробного заражения плода. Передача возбудителя происходит через плаценту от больной матери. Проявляется врожденный токсоплазмоз интоксикацией, желтушностью кожных покровов,

поражением лимфатических узлов, печени и селезенки, но часто в течение 2–7 лет протекает латентно с постепенно нарастающей умственной отсталостью и снижением остроты зрения. Приобретенный токсоплазмоз в подавляющем большинстве случаев протекает как бессимптомное носительство. Клинически выраженные его формы в зависимости от длительности течения токсоплазмоза подразделяют на острые и хронические.

При острой форме у больных развивается общая слабость, появляются боли в мышцах, снижается работоспособность. Такая форма заболевания распознается редко и обычно заканчивается выздоровлением, но если возбудитель заносится макрофагами в лимфатическую систему и поступает в кровь, то у больных с острым токсоплазмозом увеличиваются лимфатические узлы, печень и селезенка, иногда развивается миокардит, на коже появляется розеолезно-папулезная сыпь, реже поражаются легкие и почки.

При хроническом токсоплазмозе тоже возникает слабость, головная боль, миокардит, пневмония, бронхит, гастроэнтероколит, нарушение опорно-двигательного аппарата. Очень тяжело протекает он при поражении головного мозга, твердой мозговой оболочки и сетчатки глаза. Токсоплазмоз – широко распространенное зооантропонозное заболевание. В отдельных странах инфицированность им населения может составлять около 70 %. Основным источником инфекции для людей служат зараженный токсоплазмозом домашний скот и птица, мясо которых потребляется в пищу сырым, недостаточно проваренным или прожаренным.

Иммунитет. При токсоплазмозе иммунитет носит нестерильный аллергический характер. Специфические антитела к токсоплазмам в крови больных появляются к концу первой, а чаще на 2–3-й неделе заболевания, максимального титра они достигают на 2–3-й мес., а к 6–12-му мес. их содержание снижается до минимума.

Лабораторная диагностика. Исследуют разные материалы: кусочки биопсированных лимфатических узлов, кровь, пунктаты костного мозга, центрифугаты спинномозговой и плевральной жидкости, мокроту, трупный материал. Сделанные из них мазки окрашивают по Романовскому – Гимзе и обрабатывают люминесцентными сыворотками в непрямом исполнении РИФ. Параллельно патологическими материалами внутрибрюшинно и интра-

церебрально заражают белых мышей, хомяков и кроликов. В экссудате брюшной полости, мозговой ткани и различных органах токсоплазмы можно обнаружить спустя несколько дней.

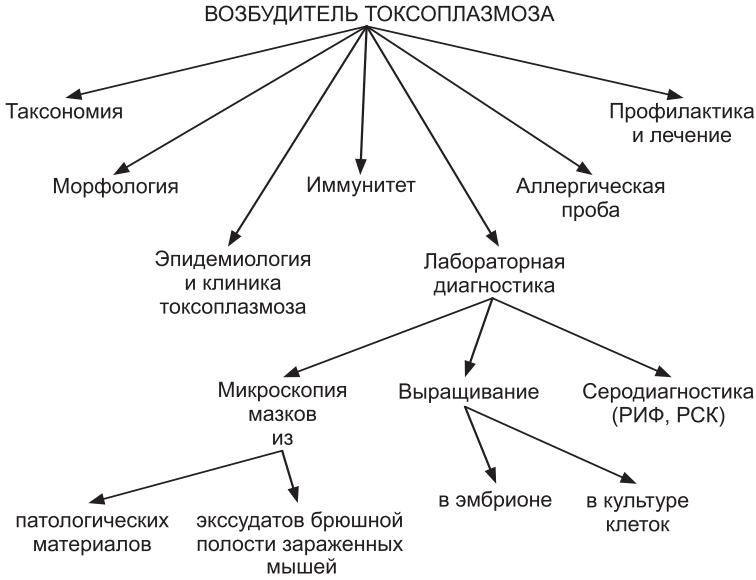
Токсоплазмы выделяют в куриных эмбрионах и культуре клеток HeLa. Их идентификация может осуществляться в пробе Сейбина – Фельдмана путем инкубации в диагностической антисыворотке, которая приводит к такой модификации клеточной стенки токсоплазм, что они утрачивают способность окрашиваться метиленовым синим.

Серодиагностика. Антитела к токсоплазмам на первой неделе заболевания выявляют в реакции непрямой иммунофлюоресценции (диагностические титры 1 : 20–1 : 40), а на второй-третьей – в РСК, РНГА и ИФА. В качестве антигена используют токсоплазмы, полученные на куриных эмбрионах или перитонеальные экссудаты зараженных животных.

Аллергическая проба. В диагностике токсоплазмоза используется внутрикожная аллергическая проба с токсоплазмином. Положительной она становится на 4–6-й неделе после инфицирования и сохраняется в течение многих лет.

Профилактика и лечение. Наибольшую опасность по токсоплазмозу для людей представляют бродячие кошки, которые подлежат истреблению. В природных очагах токсоплазмоза производят систематическую дератизацию. Заболевших домашних и сельскохозяйственных животных изолируют и лечат. Их мясо подлежит тщательной термической обработке, молоко кипятят. Трупы животных, погибших от токсоплазмоза, закапывают в специальных скотомогильниках. Тщательно обследуются работники ветеринарной службы, боен, мясокомбинатов, животноводческих ферм. Особое внимание должно быть уделено беременным женщинам. Нарастание в крови токсоплазменных антител и положительная кожная проба с токсоплазмином даже без клинических проявлений токсоплазмоза являются абсолютными показаниями к назначению им этиотропного лечения.

Токсоплазмоз лечат тиндурином, хлоридином, пириметамином, ингибирующими дигидрофолатредуктазу и синтез ДНК, сульфадиазином, сульфапиразином, сульфаленом в сочетании с хлоридином и в острой фазе болезни нередко добиваются полного излечения.



Граф 119

ТИП CILIOPHORA

Возбудитель балантидиаза

Таксономия. Кишечные балантидии *Balantidium coli* (*balantidion* – мешочек, *colum* – толстая кишка), описанные в 1857 г. Р.Н. Мальмстеном, относятся к классу *Ciliata*, подклассу *Holotricha*, отряду *Hymenostomatida* (*Holotricha*), сем. *Balantidiidae*.

Морфология. Различают вегетативную и цистную стадии балантидий (рис. 144). Вегетативные *B. coli* (трофозоиты) имеют овальную форму с несколько суженным передним концом, в котором находится воронкообразное углубление, или перистом (ротовое отверстие), и закругленным задним, снабженным малозаметным цитопигом. Тело балантидий покрыто пелликулой с ресничками; короткие соматические реснички (4–8 мкм), расположенные параллельно спиральными рядами, осуществляют движение, а длинные околоперистомные (10–12 мкм) – участву-

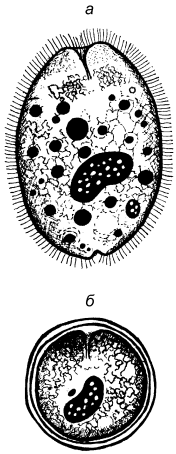


Рис.144. Балантидии: *а* – вегетативная форма; *б* – циста

ют в процессе питания. В цитоплазме различают два слоя – узкий прозрачный ободок эктоплазмы и эндоплазму с находящимися в ней двумя сократительными и множеством пищеварительных вакуолей, которые содержат бактерии, зерна крахмала, эритроциты и лейкоциты. Ядерного аппарата у интактных подвижных балантидий выявить не удается. В окрашенных препаратах он состоит из бобовидного макронуклеуса (7–10 мкм) и точечного микронуклеуса (1 мкм). Размер вегетативных форм балантидий варьирует от 50–80 мкм в длину и 35–60 мкм в ширину. Цисты балантидий круглые, содержат макро- и микронуклеус, отличаются наличием толстой двухконтурной оболочки, но в организме человека образуются редко и в очень небольших количествах.

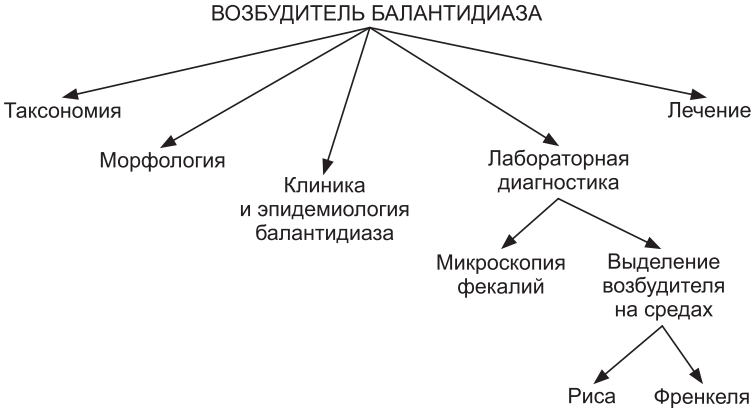
Клиника и эпидемиология. Балантидиаз – типичная кишечная инфекция, протекающая при явлениях высокой температуры и интоксикации с болью в животе, тошнотой, рвотой и частым (10–20 раз в сут) жидким стулом с примесью слизи и крови, как при бактериальной дизентерии. Не случайно балантидиаз еще недавно по этиологии называли инфузорной дизентерией. Без лечения острая форма балантидиаза через 2 мес. переходит в хроническую, для которой характерно чередование обострений длительностью от 7–10 до 20–30 дней с ремиссиями в 3–6 мес.

Источником инфекции являются свиньи, выделяющие с испражнениями цисты возбудителя, способные сохраняться во внешней среде несколько недель. Передаются они алиментарным путем, преимущественно через воду и овощи или же контактным – при уходе за свиньями.

Лабораторная диагностика. Диагноз балантидиаза подтверждается нахождением возбудителя в капле свежевыделенных фекалий под малым увеличением микроско-

па. Изредка их выделяют на питательном бульоне Риса (МПБ+изотонический раствор хлорида натрия+крахмал+лошадиная сыворотка) или синтетической среде Френкеля (дистиллированная вода+молочнокислый аммоний+аспарагиновокислый натрий+фосфат калия+хлорид натрия+лошадиная сыворотка). При дифференциации с дизентерийными амебами следует помнить, что балантидии крупнее, ядра у них бобовидные, богатые хроматином, цитоплазма содержит крупные сократительные вакуоли.

Лечение. Балантидиаз лечат метронидазолом, окситетрациклином, йодохинолом, полусинтетическими пенициллинами, аминарсоном, хиниофоном, энтеросептолом.



Граф 120

ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ МИКОЗАХ И ИХ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Патогенные грибы отличаются такой же многокомпонентной антигенной структурой, как и простейшие. Являясь сильными иммуногенами, они индуцируют образование высоких титров сывороточных и, главное, аллергических иммуноглобулинов. Большого участия в антигрибковом иммунитете они, правда, не принимают, так как не обладают высокой видоспецифичностью. То же можно сказать о комплементзависимом цитолизе грибов, несмотря на то что они, как и бактерии, активируют комплемент

по классическому пути. В общем, гуморальные реакции при микозах не только не препятствуют развитию заболевания, но даже способствуют ему вследствие развития аллергии и аутоиммунных патологических процессов. Основную роль в формировании приобретенного антигрибкового иммунитета, очевидно, играет активация ЦТЛ. Их перенос сингенным реципиентам с идентичным набором антигенов МНС вызывает в экспериментах высокую устойчивость чувствительных видов организмов к патогенным грибам. Участие Т-хелперов в антигрибковом иммунитете, по-видимому, реализуется в активации ими фагоцитарной активности макрофагов и эозинофилов.

Материалом для исследования при микозах могут служить гнойное отделяемое, мокрота, ликвор, моча, фекалии, желудочный сок, чешуйки, соскобы кожи и ногтей, пораженные волосы и биоптаты.

Диагностика микозов человека основана на использовании многих методов: 1) микроскопии материалов; 2) получении чистых культур грибков; 3) определении спектра ферментов, антигенной структуры выделенных видов грибов и динамики нарастания титра антител в сыворотке крови больных микозами; 4) их сенсибилизации к инфекционным аллергенам путем постановки аллергических реакций; 5) чувствительности к ним экспериментальных животных.

Микроскопия материалов. Мазки для выявления грибков в жидких экскретах делают из их осадков, полученных после центрифугирования. Окрашивают препараты анилиновыми красителями, по Граму и Романовскому – Гимзе. В некоторых случаях при дифференциации, например, истинных дрожжей от кандида используют метод Циля – Нельсена. К осадку иногда добавляют каплю туши, создавая фон, на котором становятся заметны капсулы (возбудитель споротрихоза), или смесь спирта с глицерином, позволяющую выявить сферулы (возбудитель кокцидиоидного микоза).

Материалы, содержащие гифомицеты, предпочтительнее микроскопировать в интактном состоянии, так как окраска мазков может деформировать тонкую структуру мицелия и находящиеся в нем споры.

Волосы и чешуйки кожи, зараженные дерматомицетами, для просветления погружают на 15–20 мин в каплю

10–30 %-ной едкой щелочи, покрывают ее покровным стеклом и изучают при малом увеличении микроскопа. Особое внимание обращают на характер поражения волос, по которому дерматомицеты разделяют на эндотриксы, локализующиеся внутри волоса (антропонозные грибки), и эндо-эктотриксы, поражающие также его поверхность (зооантропонозные).

В диагностике микозов широко используются также срезы биоптатов, гистологическое исследование которых позволяет определить реакцию тканей на внедрение грибка, например при изучении микозных гранулем. Препараты окрашивают гематоксилин-эозином или по Граму.

Культивирование. Большинство грибов непритязательны и, как правило, хорошо растут на многих питательных средах при 25–28 °С, реже – при более высокой температуре. Для получения сравнимых результатов грибы выращивают на жидких и плотных средах Сабуро; сусло-агаре; среде Чапека – Докса; сахарном агаре; картофельной среде; кровяном агаре, на котором хорошо растут возбудители субкутанных и глубоких микозов. Сахаролитическая и ассимилирующая способность грибов изучается на средах, содержащих глюкозу, мальтозу, галактозу, сахарозу, лактозу, протеолитическая – на желатинозных средах и молоке.

Прописи приготовления питательных сред

Среды Сабуро готовятся путем добавления к 1 л водопроводной воды 20 г мальтозы, 10 г пептона (при изготовлении плотной среды прибавляется 18–20 г агар-агара). Для хранения культур используется специальная среда Сабуро без углеводов (дистиллированная вода – 100 мл, агар-агар – 1,8 г, пептон – 1 г).

Сусло-агар готовится на неохмеленном пивном сусле с содержанием сахара 7–8 % по Баллингу (1 л сусла + 20 г агар-агара).

Среда Чапека – Докса – 1 л дистиллированной воды, в которой растворяется 30 г глюкозы или мальтозы, 3 г $NaNO_3$, 1 г K_2HPO_4, 0,5 г $MgSO_4$, 0,5 г KCl, 0,01 г $FeSO_4$.

Картофельная вода готовится путем кипячения 20 г очищенного и натертого картофеля в 1 л водопроводной воды, а при ее уплотнении добавляется 15–20 г агар-агара.

При изготовлении *кровяного агара* к обычному питательному агару добавляют 10% дефибринированной крови человека или животного.

Сбраживающая активность грибов изучается на *дрожжевой среде* (1 л водопроводной воды с 80 г прессованных дрожжей, 2 % сахара + индикатор), а способность ассимилировать углеводы – на *синтетической* (дистиллированная вода с прибавлением к ней $(NH_4)_2SO_4$ – 0,5%, KH_2PO_4 – 0,1 %, $MgSO_4$ – 0,05 % и сахара – 2 %).

Рост грибов на перечисленных средах начинается с 3–5-х сут и продолжается в среднем 3–4 недели (характерные колонии формируются на 18–20-й день).

Биологический эксперимент. Грибки содержат эндотоксины, действие которых, однако, не отличается строгой специфичностью, и животные реагируют на них поразному. Эффективность заражения часто зависит от способа и путей инфицирования. Биопроба проводится путем инокуляции культуры и патологического материала, предварительно обработанного в течение 1 ч антибиотиками из расчета 500 ЕД/мл. Чувствительность экспериментальных животных к разным грибам неодинакова. Так, к кандидам и геотрихам чувствительны кролики и белые мыши, к дерматомицетам – кролики, морские свинки,

Граф 121

крысы, к кокцидиоидному грибку, гистоплазмам, криптококкам – белые мыши и золотистые хомячки.

Серодиагностика. К возбудителям поверхностных микозов гуморальный иммунитет не вырабатывается. В крови больных глубокими микозами накапливается достаточно высокий титр антител, в связи с чем в их диагностике используются РСК, РА, РПГ, при которых в качестве антигена чаще всего применяют специфические аллергены.

Аллергические пробы. Аллергия при микозах человека возникает к концу второй недели болезни и позже. Для ее выявления изготовлены многие аллергены (см. «Аллергия»). Воспроизводятся аллергические пробы по типу реакции Манту. Результаты их учитывают через 24–48 ч путем измерения зон гиперемии и инфильтрации, но, к большому сожалению, они часто недостаточно специфичны.

ОСНОВНЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОЗОВ ЧЕЛОВЕКА

Паразитические грибки, патогенные для человека, вызывают многочисленные инфекционные болезни, которые можно объединить в четыре группы: кератомикозы, эпидермомикозы, субкутанные и глубокие микозы.

При кератомикозах поражается поверхностный роговой слой эпидермиса и волосы (отрубевидный лишай), при эпидермомикозах – эпидермис, волосы и ногти (эпидермофития, трихофития, микроспория), при субкутанных микозах – подкожная клетчатка, фасции, кости (хромомикоз и споротрихоз), при глубоких – внутренние органы (кокцидиоидоз, гистоплазмоз, криптококкоз, северо- и южноамериканский бластомикозы).

Облигатными (абсолютными) паразитами являются возбудители эпидермомикозов, которые называют дерматомицетами или дерматофитами, остальные паразитические грибки относятся к условно-патогенной, или факультативной группе, проявляющей патогенность лишь при снижении устойчивости макроорганизма.

Восприимчивость к микозам у людей разного возраста неодинакова. Так, дети дошкольного и школьного возраста чаще болеют дерматомикозами, а взрослые – глубокими микозами.

Возбудители кератомикозов и эпидермомикозов

Общая таксономия. Возбудители керато- и эпидермомикозов являются плеоморфными гифомицетами с септированным многоклеточным мицелием и обилием экзоспор. В частности, *Pityrosporum orbiculare* – возбудитель отрубевидного лишая – представлен короткими, неправильными, широкими гифами с наличием артро- и хламидоспор; *Epidermophyton* (эпидермофитоны) – возбудители эпидермофитии – образуют нити с короткими боковыми ветвлениями, напоминающими гребешки, среди которых обнаруживают овальные тельца, связанные в пучки («связки бананов»); *Trichophyton* (трихофитоны) – возбудители трихофитии – формируют мицелий, состоящий из округлых, многогранных полиморфных клеток со спирально скрученными на конце гифами или разветвляющийся в виде рогов северного оленя; *Microsporum* (микроспороны) – возбудители микроспории – отличаются ракетообразным мицелием и наличием веретен-макроконидий с 5–12 камерами.

Возбудитель отрубевидного лишая

Отрубевидный лишай, или *pityriasis versicolor*, вызывает грибок *Pityrosporum orbiculare* (*ovale*).

Клиника и эпидемиология. Заболевание проявляется возникновением желтовато-розовых или коричневых высыпаний вокруг устьев волосяных фолликулов на коже туловища и шеи с преимущественной локализацией на боковых поверхностях, в подмышечных и паховых областях. В начале они точечные, но затем сливаются, образуя более крупные очаги поражения с фестончатым краем. Поверхность высыпаний покрыта мелкими отрубевидными чешуйками, которые легко снимаются при поскабливании. При регрессии отрубевидного лишая на его месте остаются депигментированные пятна. Течение микоза – хроническое с обычным обострением в весенне-летний период времени. Чаще всего болеют лица с повышенной потливостью. Субъективные ощущения у них ограничиваются зудом.

Лабораторная диагностика. Диагноз подтверждается при микроскопическом обнаружении в чешуйках рогового слоя эпидермиса коротких, неправильных, широких гиф (2–3 мкм) с наличием круглых двухконтурных спор (3–8 мкм). Культуру получают на среде с плацентарной кровью, кокосовым и оливковым маслом. Она имеет дрожжевидную структуру, желтоватый или коричневый цвет. В мазке из свежевыросшей культуры обнаруживаются споры, а в пассированных штаммах – гифы, распадающиеся на споры. При смазывании участков поражения растворами йода и анилиновых красителей высыпания при отрубевидном лишае резко выделяются интенсивной окраской, а в лучах люминесцентной лампы Вуда флюоресцируют золотисто-желтым цветом.

Профилактика и лечение. Основными в борьбе с отрубевидным лишаем являются гигиенические мероприятия – регулярное мытье тела, протирание кожи одеколоном, слабым раствором уксуса, понижающими потливость. В лечении используют 3–5 %-ный салициловый спирт, 5–10 %-ную салициловую и серную мази.

Возбудители эпидермофитии

Эпидермофитию вызывают дерматомицеты двух родов – *Epidermophyton* и *Trichophyton*. Один их них – *E. floccozum* – является возбудителем паховой эпидермофитии, а другой – *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* – вызывает эпидермофитию стоп.

Клиника и эпидемиология. Паховая эпидермофития проявляется возникновением на коже розовых шелушащихся пятен размером 5–10 мм с последующим их разрастанием в кольцевидные воспалительные пятна красного или красно-коричневого цвета диаметром 8–10 см с резкими границами и отечным гиперемированным валиком, на котором появляются везикулы и пустулы. Наиболее часто поражаются паховые складки, внутренние поверхности бедер, реже – межягодичные складки, кожа подмышечных областей, складки под молочными железами.

Эпидермофития стоп проявляется в нескольких формах. Чаще всего – в виде шелушащейся, или сквамозной, формы на коже боковых, сгибательных поверхностей пальцев и межпальцевых складок стоп, реже – в интер-

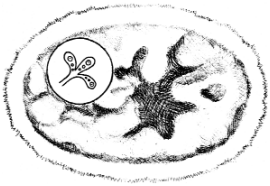


Рис.145. Колония *E. floccozum* и структурные особенности мицелия

Рис.146. Колония *T. mentagrophytes var. interdigitale* и структурные особенности мицелия

тригинозной, напоминающей межпальцевую опрелость (*intertrigo*); дигидротической, с образованием пузырьков (водяниц), эрозий и отслоений рогового слоя кожи; везикулезно-буллезной и эпидермофитии ногтей.

Источником инфекции являются больные люди. Заражение происходит через предметы индивидуального и общественного пользования – мочалки, клеенки, термометры, половицы, маты, предметы ухода за кожей, обувь, которая была в употреблении больных.

Морфолого-культуральные особенности эпидермофитонов. В чешуйках пораженной гладкой кожи и частицах ногтей эпидермофитоны имеют вид септированных нитей мицелия с располагающимися в нем артроспорами. В культурах мицелий эпидермофитонов приобретает иную форму и структуру. В частности, в мазке из складчатых, бархатистых или мучнистых желтовато-серого цвета колоний *E. floccozum* (рис. 145) на концах его мицелия появляются тупоконечные макроконидии, связанные в виде гроздей бананов, а в куполообразных с высоким белым пушком колониях *T. mentagrophytes var. interdigitale* (рис. 146) – завитки и спирали с наличием в мицелии разнообразных по форме микроконидий размером 2–3 мкм.

Лечение. При всех формах и локализациях эпидермофитии применяются растворы и примочки фунгицидных и противовоспалительных средств: 1–2 %-ный резорцин, 0,1 %-ный риванол, 0,25 %-ный нитрат серебра, 2 %-ный йод, мази, содержащие серу (2–5 %), салициловую кислоту (2–3 %), перманганат калия (1 : 6 000), гризеофульвин, тербинафин.

Возбудители трихофитии

Возбудители трихофитии (стригущего лишая) относятся к роду *Trichophyton* (*trichos* – волос, *phyton* – растение). Среди них антропонозную форму трихофитии чаще всего вызывает *T. tonsurans* и *T. violaceum*, а зооантропонозную – *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum*.

Клиника и эпидемиология. Независимо от формы поверхностная трихофития гладкой кожи проявляется образованием на ней округлых или овальных очагов поражений, окруженных бордюром из узелков, пузырьков и корочек, а трихофития волосистой части головы – появлением белесоватых чешуек с неровными расплывчатыми границами, в пределах которых происходит обламывание и поредение волос. При нагноительной зооантропонозной трихофитии на коже открытых участков тела и голове могут возникать обширные глубокие очаги нагноения, напоминающие медовые соты, из которых при надавливании выделяется светло-желтый гной.

Источником антропонозной трихофитии является больной человек, а зооантропонозной – мелкий и крупный рогатый скот. Заражение трихофитией происходит при употреблении находившихся у больных головных уборов, расчесок, заколок для волос, белья, одежды, загрязненной пораженными волосами и шерстью, чешуйками кожи и ногтей, при непосредственном контакте с больными животными.

Лабораторная диагностика. Предварительный диагноз антропонозной трихофитии основывается на одновременном обнаружении спор грибка внутри волоса и мицелия в чешуйках кожи, а зооантропонозной – спор снаружи волоса и мицелия в коже. Завершается идентификация трихофитонов после выделения чистых культур и углубленного исследования их морфологии. При этом выделяющийся из патологических материалов *T. tonsurans* на среде Сабуро формирует плотные, сухие, морщинистые с вдавленным центром, слегка припудренные, белого или кремового цвета колонии, в мазках из которых обнаруживаются тонкие нити мицелия и различные по форме микроконидии (рис. 147), а *T. mentagrophytes* – образует плоские, звездчатые, с радиальными бороздами, кремовые, с зернистой или порошковидной поверхностью и наличием

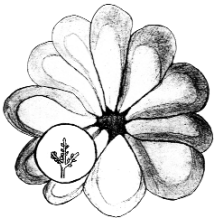


Рис.147. Колония *T. tonsurans* и структурные особенности мицелия

Рис.148. Колония *T. mentagrophytes* и структурные особенности мицелия

в них ветвистого мицелия, спиралевидных гиф, большого количества мелких круглых микро- и тупоконечных многокамерных макроконидий (рис. 148).

Лечение. Трихофитию лечат гризеофульвином, обработкой очагов 2–5 %-ным раствором йода и серносалициловой мазью.

Возбудитель фавуса

Возбудитель фавуса – *Trichophyton schoenleinii* (Шенлейна).

Клиника и эпидемиология. Фавус (*favus* – соты) – хронический микоз кожи. Различают три его формы: фавус волосистой части головы, гладкой кожи и ногтей. Типичным для каждой формы фавуса является образование так называемых скутул – светло-желтых, блюдцеобразных щитков, покрытых корочками с вдавлениями в центре, состоящих из мицелия и спор трихофитона. Находящиеся в пределах скутулы волосы при фавусе не обламываются, часто тускнеют и «седеют» или выпадают при атрофии волосяных фолликулов. Ногтевые пластинки при скутулярной форме фавуса ногтей приобретают грязноватый цвет, тускнеют и крошатся при далеко зашедшем процессе. Заражение фавусом происходит при контакте с больным или с предметами, которыми он пользовался. Болеют главным образом дети.

Изредка человек может заразиться фавусом от мышей и крыс. В этих случаях заболевание протекает остро, напоминая инфильтративно-нагноительную трихофитию.

Лабораторная диагностика основана на обнаружении: 1) в соскобах из скутул и сморчковидных сухих восковидных колониях (рис. 149) разветвленного в виде рогов оленя мицелия; 2) эндоспор, заполняющих пораженный волос.

Лечение проводят в течение 1,5–4 мес. гризеофульвином в сочетании с местной терапией, предварительно сбрив волосы при фавусе волосистой части головы.

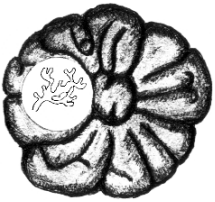


Рис.149. Колония *T. schoenleinii* и структурные особенности мицелия

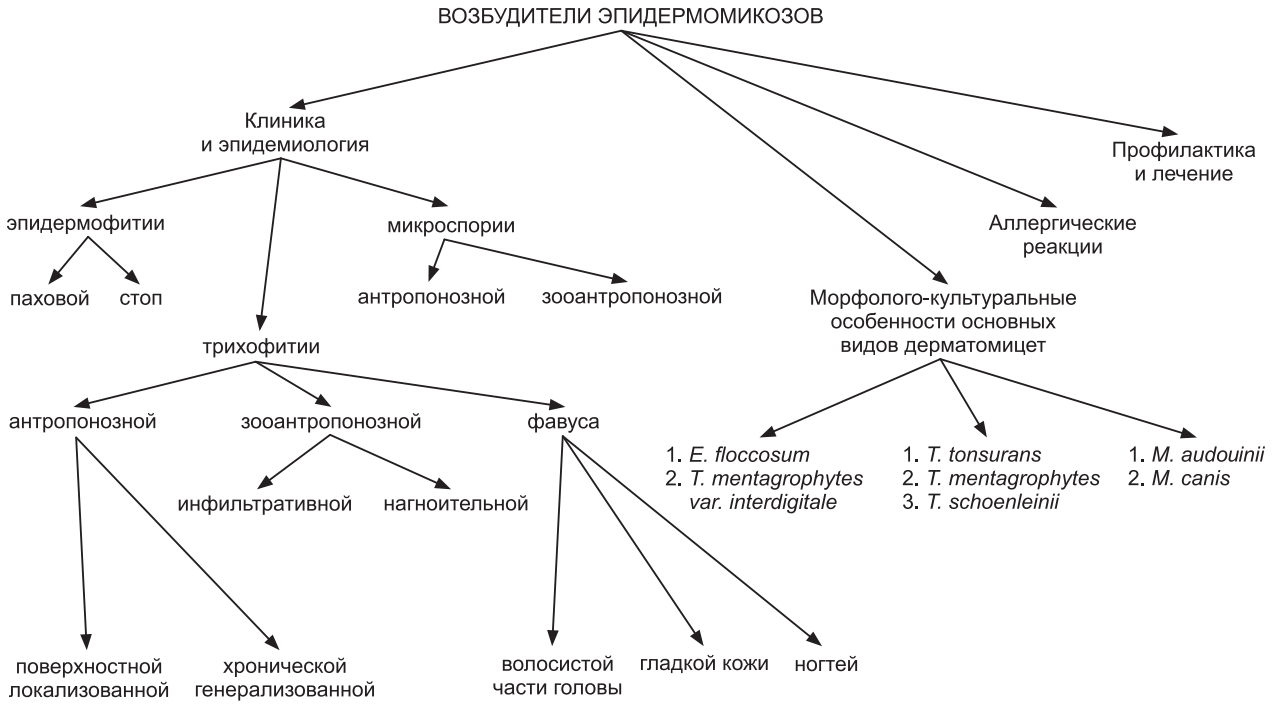
Возбудители микроспории

Среди возбудителей микроспории выделяют три группы грибков из рода *Microsporum*: антропофильные – *M. audouinii* и *M. ferrugineum*; зоофильные – преимущественно *M. canis*; геофильные – главным образом *M. gypseum*, обитающий в почве.

Клиника и эпидемиология. Микроспория – грибковое заболевание кожи и волос. Антропонозная форма распространена в странах Западной Европы и США (*M. audouinii*), Китае, Японии, Индии (*M. ferrugineum*), а зооантропонозная, вызываемая *M. canis*, – в России, Беларуси, Украине и граничащих с ними территориях. При этом на коже лица появляются розовые воспалительные пятна округлых и овальных очертаний с четкими границами и отрубевидным шелушением. В случаях микроспории волосистой части головы возникает один или несколько очагов поражения с обломанными волосами, покрытыми белым чехлом из спор, которые в лучах люминесцентной лампы Вуда дают зеленое свечение.

Источником антропонозной микроспории являются больные люди, зооантропонозной – кошки и собаки. Пути передачи микроспории такие же, как при эпидермофитии.

Лабораторная диагностика. Основана на обнаружении у больных волос, окруженных чехлом из спор, внутри которых, как и в пораженной коже, может находиться мицелий грибка. Культуру возбудителей микроспории выделяют на среде Сабуро. При микроскопическом исследовании


ВОЗБУДИТЕЛИ ЭПИДЕРМОМИКОЗОВ
Клиника и эпидемиология
Профилактика и лечение
Аллергические реакции
Морфолого-культуральные особенности основных видов дерматомицет
эпидермофитии
паховой
стоп
трихофитии
микроспории
антропонозной
зооантропонозной
антропонозной
зооантропонозной
фавуса
инфильтративной
нагноительной
поверхностной локализованной
хронической генерализованной
волосистой части головы
гладкой кожи
ногтей
1. E. floccosum
2. T. mentagrophytes var. interdigitale
1. T. tonsurans
2. T. mentagrophytes
3. T. schoenleinii
1. M. audouinii
2. M. canis

Граф 122

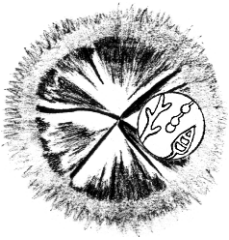


Рис.150. Колония *M. audouinii* и структурные особенности мицелия

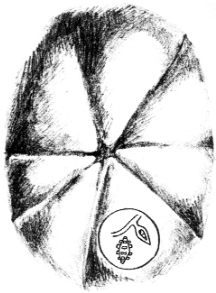


Рис.151. Колония *M. canis* и структурные особенности мицелия

в ней находят ракетообразный мицелий, веретенообразные и остроконечные многокамерные макроконидии. Чаще всего из патологических материалов выделяют пушистые, с радиальными бороздами и звездчатым краем колонии *M. audouinii* (рис. 150) или уплощенные кремового цвета – *M. canis* (рис. 151). Нередко ставят внутрикожную аллергическую пробу с микроспорином, изредка – РСК.

Профилактика и лечение. Профилактика сводится к выявлению и госпитализации больных, уничтожению бродячих собак и кошек – носителей грибка. Лечение производится салицилово-серно-дегтярными мазями, препаратами йода и гризеофульвином.

Возбудители субкутанных и глубоких микозов

При определении видовой принадлежности грибов, вызывающих субкутанные (хромомикоз, споротрихоз) и глубокие микозы (кокцидиоидоз, гистоплазмоз, крипотококкоз), надо иметь в виду, что они отличаются диморфизмом, т. е. в патологических материалах больных людей имеют тканевую, или дрожжевую форму, а в выросших на питательных средах культурах (колониях) – мицелиальную с наличием разнообразных по форме и размерам микро- и макроконидий.

Возбудитель хромомикоза

Таксономия. Возбудителями хромомикоза являются *Phialophora verrucosa*, *Hormodendrum compactum* и *H. pedrosoi*.

Клиника и эпидемиология. Хромомикоз – глубокий микоз кожи и подкожной клетчатки с образованием коричневых или красно-фиолетовых папилл и узелков. Начинается болезнь с появления эритематозно-сквамозного красновато-чешуйчатого очага на стопе или голени, реже – на кисти или предплечье. В последующем развивается одна из трех кожных форм хромомикоза – папилломатозная, бугорковая или узловатая, сопровождающиеся разрастаниями, размягчениями, изъязвлениями и образованиями черно-бурых корочек. Очаги поражения на голени могут достигать 10–18 см в диаметре или сплошь покрывать поверхность стопы от ногтей до мыщелков.

Хромомикоз эндемичен для стран с тропическим и субтропическим климатом, в частности Южной Америки, Африки, Индии, Австралии. Болеют хромомикозом только люди, но для окружающих они не опасны. Грибки сапрофитируют в почве и на растениях. Возникновению хромомикоза способствуют порезы кожи, царапины, занозы, ожоги, варикозное расширение вен нижних конечностей. Заражение возможно также через верхние дыхательные пути.

Лабораторная диагностика. Диагноз хромомикоза устанавливают при обнаружении в чешуйках, корочках, отделяемом из пораженных участков кожи округлых или овальных дрожжеподобных особей грибка с двухконтурной буроватой или желтоватой оболочкой (иногда гифы), а в колониях-бугорках мышиного цвета *P. verrucosa*, выросших при 25 °С на среде Сабуро (рис. 152), – прямого или ветвящегося септированного мицелия темно-зеленого цвета с отходящими от конидиеносцев разветвленными цепочками конидий (или фиалид – конидиеносцев с эндогенно образующимися спорами).

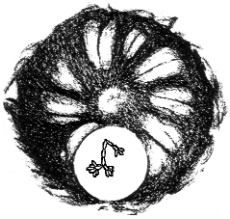


Рис.152. Колония *P. verrucosa* и структурные особенности мицелия

Лечение хромомикоза проводят спиртовым раствором йода, 10 %-ным раствором йодида натрия, амфотерицином В. Течение хромомикоза длительное, прогноз благоприятный.

Возбудитель споротрихоза

Таксономия. Споротрихоз вызывает *Sporothrix schenckii* (Шенка).

Клиника и эпидемиология. Споротрихоз – микоз кожи, подкожной клетчатки, слизистых оболочек, лимфатических узлов, реже – внутренних органов и костей. Различают поверхностный споротрихоз, локализованный подкожный, диссеминированный кожный и висцеральный. Чаще других встречается локализованный подкожный споротрихоз, при котором в подкожной клетчатке предплечья или кисти вначале возникает узелок размером 5 мм. Увеличиваясь в размерах, он спаивается с кожей, а затем вместе с ней некротизируется с образованием споротрихозного шанкра (язвы) с подрытыми краями, вокруг которого могут развиваться папилломатозные бородавчатые элементы и пустулы с признаками гнойного лимфангоита.

Резервуаром инфекции является почва и растения, а входными воротами – кожа и слизистые оболочки дыхательных путей.

Лабораторная диагностика. Основана на микроскопическом исследовании соскобов, гнойного отделяемого, мокроты, биоптатов и кожистых морщинистых, вначале белых, а затем чернеющих колоний *S. schenckii* (рис. 153), вырастающих на среде Сабуро при 24 °С. При этом в патологических материалах споротрихум Шенка имеет вид овальных и сигарообразных клеток от 2–5 до 15 мкм, а в мазках из колоний – форму септированных, ветвистых гиф с овальными, грушевидными или цилиндрическими конидиями размерами 8 × 3 мкм, гроздьями располагающимися на их концах. В диагностике висцерального споротрихоза применяют серологические реакции и ставят аллергическую пробу.

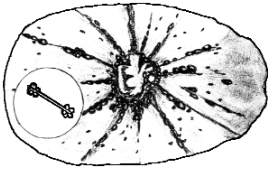
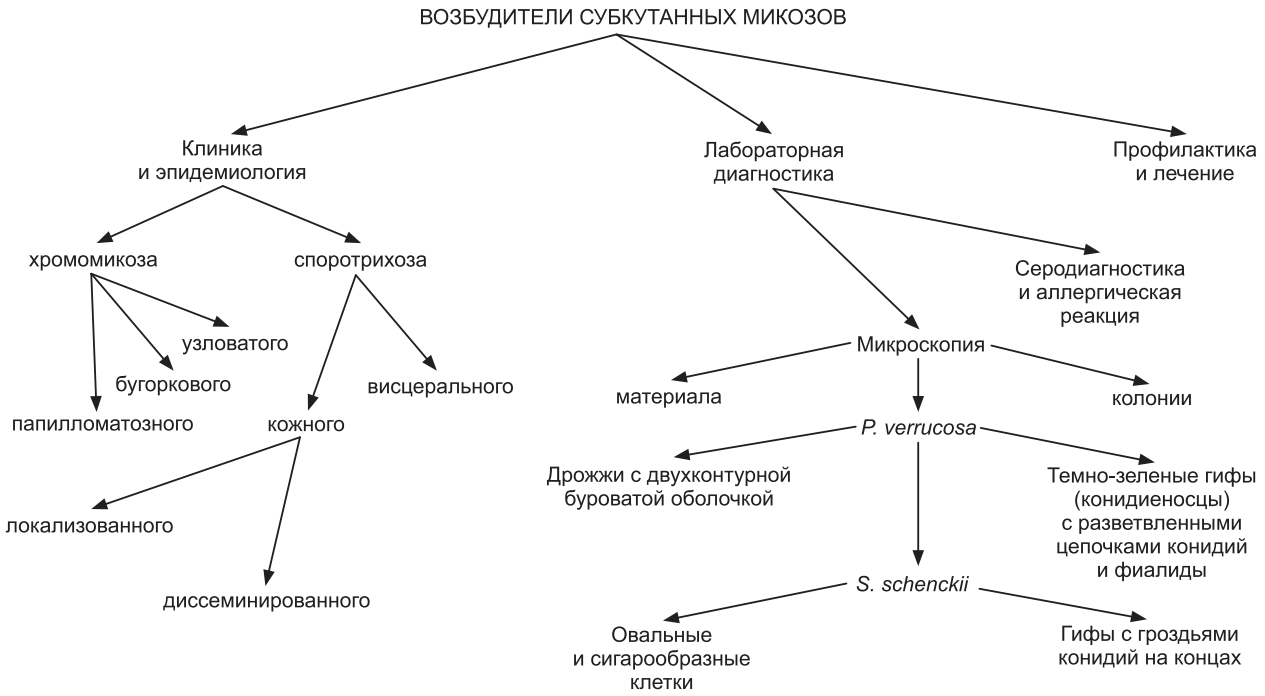


Рис.153. Колония *S. schenckii* и структурные особенности мицелия

Лечение проводят йодидом калия, назначают нистатин, леворин, амфотерицин В или производные имидазола.


ВОЗБУДИТЕЛИ СУБКУТАННЫХ МИКОЗОВ
Клиника и эпидемиология
Лабораторная диагностика
Профилактика и лечение
хромомикоза
споротрихоза
узловатого
бугоркового
папилломатозного
висцерального
кожного
локализованного
диссеминированного
Серодиагностика и аллергическая реакция
Микроскопия
материала
колонии
P. verrucosa
Дрожжи с двухконтурной буроватой оболочкой
Темно-зеленые гифы (конидиеносцы) с разветвленными цепочками конидий и фиалиды
S. schenckii
Овальные и сигарообразные клетки
Гифы с гроздьями конидий на концах

Граф 123

Возбудитель кокцидиоидоза

Таксономия. Кокцидиоидоз вызывается грибком *Coccidioides immitis*.

Клиника и эпидемиология. Кокцидиоидоз подразделяется на первичный (легочной и внелегочной формы) и вторичный (диссеминированный).

Первичный легочной формы кокцидиоидоз может протекать бессимптомно или как обычный катар дыхательных путей с кашлем и выделением мокроты, а первичный внелегочной формы – в виде глубоких кожных изъязвлений с лимфангоитом.

Вторичный диссеминированный кокцидиоидоз протекает как острое миллиарное (просовидное) поражение легких, острый или хронический менингит.

Кокцидиоидоз эндемичен для США и стран Южной Америки. Болеют им домашние и дикие животные, в том числе грызуны. Заражение происходит воздушно-пылевым путем, но споры грибка могут проникать в организм через поврежденную кожу и слизистые оболочки. Кокцидиоидоз – тупиковая инфекция. После перенесенного заболевания развивается прочный иммунитет и выраженная аллергизация организма.

Лабораторная диагностика. Диагностика кокцидиоидоза основана: 1) на обнаружении в патологическом материале сферул грибка диаметром от 10 до 120 мкм, содержащих различное количество спор размером 2–3 мкм, а в мазках из дисковидных белых или коричневых порошковатых колоний, вырастающих на среде Сабуро с декстрозой при температуре 25–30 °С (рис. 154), – септированных гиф, распадающихся на артроспоры прямоугольной или бочкообразной формы; 2) положительных результатах заражения мышей и морских свинок материалом и выделенной культурой; 3) положительной РСК и аллергической пробе с кокцидиоидином, который получают, выращивая разные штаммы грибка на жидких средах в течение нескольких месяцев при температуре 37 °С.

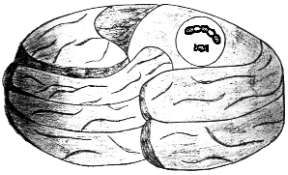


Рис.154. Колония *C. immitis* и структурные особенности мицелия

Профилактика и лечение. Профилактика кокцидиоидоза не разработана. При работе с культурой *C. immitis* должны соблюдаться такие меры предосторожности, как с возбудителями особо опасных инфекций. При лечении больных диссеминированным кокцидиоидозом наиболее эффективен амфотерицин и его производные амфоглюкамин и микогентин. Больные с первичными формами кокцидиоидоза выздоравливают, применяя симптоматическую терапию.

Возбудитель гистоплазмоза

Таксономия. Гистоплазмоз вызывают *Histoplasma capsulatum* и три его варианта: *H. duboisii* (африканский), *H. muris* (мышиный) и *H. farciminosum* (лошадиный).

Клиника и эпидемиология. Различают два основных клинических типа гистоплазмоза – острый и хронический первичный гистоплазмоз легких и вторичный диссеминированный.

Первичный гистоплазмоз легких у 80 % больных протекает бессимптомно и заканчивается образованием множественных мелких кальцинатов (обызвествленных бугорков). В легко протекающих случаях проявляется катаром верхних дыхательных путей, а в тяжелых – длительно текущей пневмонией с высокой перемежающейся лихорадкой и выделением гнойной кровянистой мокроты. Хроническая форма первичного пневмомикоза характеризуется длительным течением (1–2 и более года) с периодами обострений и ремиссий.

Эта форма болезни может переходить во вторичный диссеминированный гистоплазмоз с поражением внутренних органов, костей и костного мозга, центральной нервной системы (менингит, энцефалит), слизистых оболочек рта, глотки, гортани, кишечника и кожных покровов.

Источником инфекции являются домашние и дикие птицы, летучие мыши, выделяющие гистоплазмы с пометом. Люди и животные заражаются гистоплазмозом аэрогенным путем, вдыхая пыль, зараженную спорами возбудителя. Гистоплазмоз людей – тупиковая инфекция, широко распространенная в Северной и Южной Америке, Канаде и на Филиппинах.

Лабораторная диагностика. Диагноз гистоплазмоза ставится при микроскопическом выявлении в мазках-препаратах из мокроты, крови, пунктата грудины, гноя, лик-

вора, срезов лимфатических узлов и других биоптатов дрожжевых клеток с псевдокапсулой в виде бесцветного ободка вокруг них, а в выросших при температуре 25–30 и 37 °С на среде Сабуро пушистых белых колониях *H. capsulatum* (рис. 155) – мицелия с микроконидиями (3 мкм) и шиповидными большими макроконидиями размером 7–15 мкм. Важное значение в диагностике гистоплазмоза имеют положительные аллергическая проба, РСК и РП, в которых как антиген используется гистоплазмин.

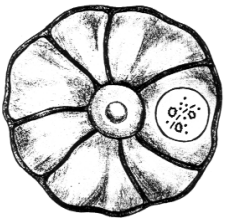


Рис.155. Колония *H. capsulatum* и структурные особенности мицелия

Лечение и профилактика. Больных гистоплазмозом лечат сульфаниламидными препаратами и полиенами, в частности, нистатином, леворином и амфотерицином В, иммуноглобулином. Специфическая профилактика не разработана. При работе в эндемических районах рекомендуется использование респираторов и противогазов.

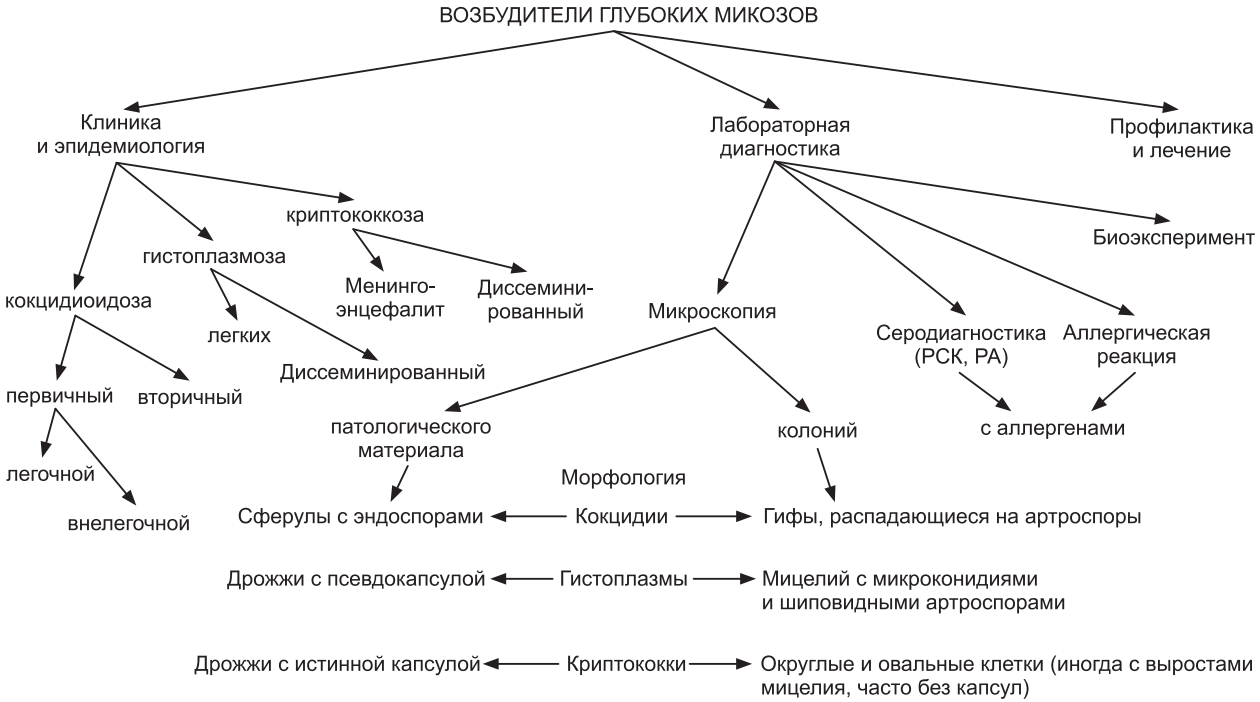
Возбудитель криптококкоза

Таксономия. Возбудителем криптококкоза является Cryptococcus neoformans.

Клиника и эпидемиология. Первично криптококкоз проявляется как менингоэнцефалит. Другие его формы – криптококкоз легких, внутренних органов, кожи и слизистых оболочек – развиваются в результате диссеминации возбудителя.

Источником криптококков являются голуби, выделяющие их с пометом. Люди заражаются преимущественно аэрогенным путем.

Лабораторная диагностика. Диагноз криптококкоза подтверждается при обнаружении в мазках из ликвора, мокроты, крови, мочи, срезах из биоптатов пораженных тканей больных округлых, почкующихся дрожжевых клеток (5–20 мкм), обрамленных светлой капсулой, а в сметанообразных, вначале белых, а позднее коричневых колониях *C. neoformans*, выросших на простом и сахарном агаре, среде Сабуро и пивном сусле при температуре 37 °С (рис. 156), – круглых или овальных капсульных клеток, иногда с короткими выростами мицелия и часто утрачива-


ВОЗБУДИТЕЛИ ГЛУБОКИХ МИКОЗОВ
Клиника и эпидемиология
Лабораторная диагностика
Профилактика и лечение
криптококкоза
гистоплазмоза
кокцидиоидоза
Менинго-энцефалит
Диссемини-рованный
легких
Диссеминированный
первичный
вторичный
легочной
внелегочной
Микроскопия
Биоэксперимент
Серодиагностика (РСК, РА)
Аллергическая реакция
с аллергенами
патологического материала
колоний
Морфология
Сферулы с эндоспорами
Кокцидии
Гифы, распадающиеся на артроспоры
Дрожжи с псевдокапсулой
Гистоплазмы
Мицелий с микроконидиями и шиповидными артроспорами
Дрожжи с истинной капсулой
Криптококки
Округлые и овальные клетки (иногда с выростами мицелия, часто без капсул)

Граф 124

ющих капсулы. При наличии специфических меченых сывороток прибегают к постановке РИФ. Используются также РА, РП, РСК и биологический эксперимент.

Лечение и профилактика. В лечении криптококкоза применяют амфотерицин В, флуцитозин, жидкость Кастеллани и растворы анилиновых красителей для орошения кожных поражений. Специфическая профилактика не разработана.

Рис.156. Колония *C. neoformans* и структурные особенности мицелия

ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ

Определение. Внутрибольничными, или госпитальными инфекциями (ВБИ), называют многочисленные по нозологическим формам инфекции, возникающие у больных после госпитализации или амбулаторного обследования и лечения в любых по профилю медицинских учреждениях. К категории внутрибольничных инфекций относятся также инфекционные болезни медицинского персонала, которые связаны с его лечебно-профилактической и диагностической деятельностью. Кратко ВБИ называют нозокомиальными (*nosokomeion* – больница) инфекциями и ятрогениями (*iatros* – врач).

Побудительные факторы возникновения ВБИ. В развитых странах ВБИ возникают у 5–10 % пациентов, нуждающихся в медицинском обследовании, госпитализации и лечении.

Нарастание этих инфекций объясняют увеличением числа лиц преклонного возраста, а также больных с хроническими болезнями и страдающих иммунодефицитами, но основными причинами возросшей численности ВБИ явились следующие факторы: никем не предвиденный отбор так называемых «госпитальных штаммов» микроорганизмов (преимущественно бактерий) с множественной лекарственной резистентностью, сформировавшейся вследствие длительного использования антибиотиков; возросшая вирулентность условно-патогенной микрофлоры; высокая частота микробоносительства у людей; скученность боль-

ных в стационарах, поликлиниках, госпитальных палатах; увеличение числа лечебных процедур, и, как следствие всего этого, – нарушение правил асептики и антисептики.

Общая характеристика ВБИ. В большинстве случаев ВБИ возникают на фоне основного соматического заболевания в отделениях хирургического или терапевтического профиля крупных многоэтажных больничных комплексов, что уже само по себе неблагоприятно для больного человека, нуждающегося в прогулках и чистоте атмосферного воздуха. ВБИ могут проявляться первично у новорожденных в роддомах. Клиническую картину госпитальных инфекций определяет возбудитель, его локализация и общее состояние заболевшего, но, как правило, они чаще всего протекают атипично, что затрудняет раннюю диагностику и требует проведения кропотливых и длительных бактериологических и вирусологических методов выделения и идентификации возбудителя болезни.

Факторы и состояния больных, предрасполагающие к развитию ВБИ. К развитию ВБИ предрасполагают инвазивные медицинские манипуляции и оперативные вмешательства, как-то эндоскопия, интубация, катетеризация вен и мочевого пузыря, хирургическое нарушение целостности иммунологических барьеров и органов иммунитета, в частности спленэктомия, приводящая к снижению синтеза IgM. Их возникновению способствуют деструктивные процессы в кроветворных органах, злокачественные опухоли, длительное лечение антибиотиками, иммунодепрессантами и цитостатиками.

Этиология и эпидемиология госпитальных инфекций. ВБИ может вызывать практически любой вид микроорганизмов – как патогенный, так и сапрофит. Источниками и резервуарами их могут быть здоровые микробоносители, предметы обихода, медицинская аппаратура и прочие объекты, с которыми контактируют пациенты. Передаются ВБИ самыми разнообразными путями, в том числе трансфузионно, трансплацентарно, или плод заражается от матери при рождении.

Основными (классическими) возбудителями внутрибольничных инфекций, наслаивающихся на соматические болезни, являются стафилококки, пневмококки, условно-патогенные грамотрицательные энтеробактерии (серрации, протеи, клебсиеллы), псевдомонады (синегнойная палочка), бактероиды, грибы рода *Candida* и респираторная группа вирусов.

У больных с врожденными и приобретенными иммунодефицитами или иммунными нарушениями спектр классических возбудителей патогенных и условно-патогенных видов микробов, вызывающих ВБИ, дополняется листериями, микобактериями туберкулеза, атипичными микобактериями, криптококками, токсоплазмами, вирусами простого герпеса и др. При этом все они на фоне иммунодефицитов проявляют более высокую степень патогенности. Так, пиогенные кокки у больных с иммунодефицитами значительно чаще вызывают септические процессы с образованием глубоких абсцессов; синегнойная палочка – диссеминированные инфекции, остеомиелит, инфекции мочевыводящих путей; серрации – бактериемию; дрожжеподобные грибы – тяжелые поражения кожи и слизистых оболочек, внутренних органов и кишечного тракта; листерии – септицемию и менингит; патогенные микобактерии – обострение туберкулеза; *Cryptococcus neoformans* – диссеминированные, часто летальные инфекции; вирусы простого герпеса – поражение легких с вирусемией и диссеминацией.

Главной особенностью ВБИ у больных с иммунодефицитами, которая отличает их от всех известных инфекционных болезней, является то, что они нередко вызываются микробами-сапрофитами, обитающими в окружающей среде, на кожных покровах и в полостях здоровых людей. Такие ВБИ называют *оппортунистическими*. В отличие от других инфекций они от человека к человеку не передаются. К типичным возбудителям оппортунистических инфекций относят прежде всего грибы родов *Candida*, *Pneumocystis carinii*, *Legionella pneumophilla* и *Aspergillus*, *Nocardia asteroides* и *Acinetobacter* (рис. 157).

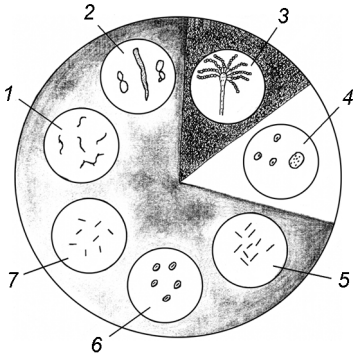


Рис.157. Возбудители основных оппортунистических инфекций:
1 – N. asteroides; 2 – C. albicans; 3 – A. fumigatus; 4 – P. carinii; 5 – L. pneumophilla; 6 – Acinetobacter; 7 – S. marcescens

Клинико-эпидемиологические особенности основных оппортунистических инфекций

Кандидоз

Клиника и эпидемиология. Кандидоз – самая распространенная оппортунистическая инфекция. Выделяют несколько ее форм: кандидоз кожных покровов, ногтевых валиков и ногтей, слизистых оболочек, хронический кожно-слизистый и диссеминированный, или висцеральный.

Кандидоз кожи проявляется эритематозными опрелостями и везикулезно-пустулезными высыпаниями с последующей некротизацией эпителия на прилегающих друг к другу поверхностях тела и в кожных складках; *кандидоз ногтевых валиков и ногтей* – мацерацией кистей и стоп, деформацией и обесцвечиванием ногтевых пластинок; *кандидоз слизистых оболочек* полости рта, или молочница у детей, – образованием беловато-желтоватых творожистых бляшек на слизистой оболочке щек и основании языка, а вульвы и вагины – творожистыми белями и зудом; *хронический кожно-слизистый кандидоз* – поражением кожи, ее придатков и слизистых оболочек; *диссеминированный кандидоз* – фунгемией (инвазией в кровоток) – образованием множественных очагов поражений почек, глаз, головного мозга и других жизненно важных органов.

Кандидоз – антропонозное и эндогенное заболевание, возникающее при дисбактериозах и иммунодефицитах, вызванных длительным применением антибиотиков широкого спектра действия и иммунодепрессантов.

Таксономия и морфолого-культуральные особенности кандид. Грибы *Candida* (*candidus* – невинный), или дрожжеподобные грибы-комменсалы организма человека, обитают в полости рта, кишечника и влагалища. Чаще всего кандидоз вызывают *C. albicans* (более чем 90 % случаев), *C. tropicalis* , *C. ksuzei*, редко – другие виды. Они отнесены к классу *Blastomycetes*, но имеют не только форму дрожжей (4–8 мкм в диаметре), размножающихся почкованием, но и нитчатую – в виде псевдомицелия (удлиненных клеток), образующегося при задержке процесса размножения кандид. Их выращивают на простых и сложных средах с pH 6,0–6,8 при температуре 25–28 °С, являющейся оптимальной для дрожжевой фазы, и 30–37 °С.

Факторы патогенности. У кандид выявлены адгезины, обусловливающие их адгезию на эпителии, фосфолипазы, кислые протеазы и олигосахариды клеточной стенки, ингибирующие Т-лимфоциты.

Лабораторная диагностика кандидозов. Диагноз кандидоза кожи и слизистых оболочек, ногтевых валиков и пластинок, легких и кишечника подтверждается при нахождении в патологических материалах больных большого количества дрожжеподобных организмов.

Приготовленные из них препараты можно изучать под микроскопом в неокрашенном и окрашенном состояниях. При микроскопии без окраски жидкие материалы исследуют в раздавленной капле в смеси спирта с глицерином (глицерина – 4 части, спирта этилового – 2, дистиллированной воды – 4 части). Для выявления оболочек и глыбок гликогена у дрожжеподобных организмов используют раствор Люголя двойной концентрации, который добавляют к ним в равном объеме. Вначале микроскопируют объективом ×8, а затем – ×40. В препаратах обнаруживают круглые или овальные почкующиеся дрожжеподобные клетки и псевдомицелий.

Для исследования препаратов в окрашенном виде на предметном стекле готовят тонкие мазки, подсушивают на воздухе, фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова. По Граму дрожжеподобные организмы окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, иногда с розовой центральной частью клетки; по Цилю – Нельсону – в синий с розовато-желтыми включениями липидов; по Романовскому – Гимзе – в розовато-фиолетовый цвет с темно-фиолетовыми включениями волютина и красным хроматиновым веществом.

Чистую культуру выделяют на агаризованной среде Сабуро, пивном сусло-агаре, морковно-картофельном отваре. К этим средам добавляют пенициллин, стрептомицин или хлортетрациклин в количестве 300–400 ЕД/мл среды для подавления роста сопутствующих бактерий. Посевы культивируют при температуре 28–37 °С . Колонии кандида имеют беловато-желтый цвет, но по мере роста и увеличения размеров приобретают перламутровый оттенок и куполообразное возвышение. Выделенные колонии для выявления псевдомицелия засевают на картофельную воду или морковно-картофельный отвар. В жидких пита-

тельных средах они образуют равномерную муть или осадок, нередко – пленку на поверхности среды. При положительном результате псевдомицелий можно обнаружить, пользуясь малым увеличением микроскопа, на 3–5-е сут культивирования.

Идентификация микробов рода *Candida* проводится по ряду морфолого-культуральных и биохимических свойств.

В целях обнаружения в крови больных специфических антител можно ставить РА, РП и РСК. В качестве антигенов для этих реакций применяют культуры дрожжеподобных грибов, их полисахаридные фракции и лизаты.

Аллергическую пробу взрослым ставят путем внутрикожного введения 0,1 мл поливалентной вакцины, содержащей 200 млн клеток кандида в 1 мл. Для детей ее разводят в 10 раз. Результаты реакции учитывают через 24–48 ч.

Лечение. Для лечения кандидоза кожи, ее придатков и слизистых оболочек используют нистатин, леворин, амфоглюкамин, а в терапии генерализованного кандидоза – амфотерицин В и глуконазол.

Пневмоцистоз

Клиника и эпидемиология. Пневмоцистозом заболевают люди с выраженными иммунодефицитами. Проявляется он в виде интерстициальной пневмонии с поражением межальвеолярных перегородок и накоплением в альвеолах пенистой массы клеточного детрита, содержащего *Pneumocystis carinii*. У детей заболевание протекает подостро или хронически, а у подростков и взрослых с иммунодефицитами начинается с внезапно возникающей лихорадки и затрудненного дыхания, к которым присоединяются тяжелый кашель с выделением мокроты. Летальность при быстротечном пневмоцистозе может составлять 100 %. Источниками инфекции являются человек, овцы, собаки, грызуны, другие животные. Передается пневмоцистоз воздушно-капельным путем или трансплацентарно.

Таксономия и морфология пневмоцист. *Pneumocystis carinii* – дрожжевой грибок класса *Blastomycetes*. Элементарной единицей *P. carinii* является спорозоит, имеющий форму округлого тельца с ядром, покрытый бесструктурной оболочкой; размеры его могут варьировать от 2 × × 1,5 мкм до 3 × 2 мкм. Проникнув в альвеолоциты, он пре-

образуется в плеоморфную промежуточную стадию трофозоита, на основе которого после нескольких циклов деления образуется циста, содержащая несколько (чаще 8) спорозоитов, имеющих диаметр около 1 мкм.

Лабораторная диагностика. Микробиологическая диагностика пневмоцистоза основана на выявлении в мокроте и отделяемом слизистой оболочки верхних дыхательных путей спорозоитов и нарастании антител к ним в сыворотке крови больных. Сделанные мазки обычно окрашивают по Романовскому – Гимзе. Из иммунологических методов, подтверждающих пневмоцистную природу пневмонии, используют РСК, но наиболее чувствительной является РИФ с антигеном, очищенным от тканевых клеток.

Лечение. Пневмоцисты резистентны к химическим препаратам. При незначительных нарушениях в иммунном статусе больного терапевтический эффект при пневмоцистозе можно ожидать от применения котримоксазола.

Аспергиллез

Клиника и эпидемиология. Различают очаговые и диссеминированные формы аспергиллеза. Наиболее тяжелой формой очагового аспергиллеза является образование в легких больного аспергилломы – шарообразной массы клеточного детрита вперемешку с мицелием гриба размером около 2 мм в диаметре. При диссеминированном аспергиллезе поражаются различные внутренние органы. Аспергиллы распространяются в них диффузно, и заболевание всегда заканчивается смертельным исходом. Природным резервуаром аспергилл является почва, но распространены они повсеместно. Заражение аспергиллезом происходит при ингаляции конидий аспергилл или они проникают в организм через поврежденную кожу. Здоровые люди абсолютно резистентны к аспергиллам.

Таксономия и морфология аспергилл. Род *Aspergillus* («лейчатый») включает около 200 видов плесневых грибов. Относится к классу *Ascomycetes*. Для человека патогенны 20 видов аспергилл, из них чаще всего аспергиллез человека вызывают три: *Aspergillus fumigatus*, формирующий на среде Сабуро сине-зеленые зернистые или пушистые колонии, окаймленные белой зоной; *A. flavus*, дающий на той же среде желтые или грязновато-желтые пушистые

колонии; *A. niger*, отличающийся постепенно чернеющими пушистыми колониями. Все они имеют многоклеточный септированный мицелий с одноклеточными булавовидными конидиеносцами, от которых в виде струек воды из лейки отходят стеригмы с четкообразными конидиями.

Лабораторная диагностика. Диагноз аспергиллеза подтверждается обнаружением в патологических материалах и биоптатах характерных для аспергилл морфоструктур и получением чистых культур, однако надо иметь в виду, что они могут быть банальными микробами, колонизирующими слизистые оболочки, или случайно попадать в материалы извне. Морфолого-культуральные исследования при аспергиллезе можно дополнять кожными аллергическими пробами, которые при иммунодефицитах становятся отрицательными, и постановкой РПГ с антигенами аспергилл.

Лечение. Аспергиллез лечится с большим трудом. Терапевтического эффекта достигают с помощью амфотерицина В, амфоглюкамина и интраконазола. Аспергилломы удаляют хирургическим путем.

Легионеллез

Клиника и эпидемиология. Легионеллез – группа инфекционных болезней, получившая широкую известность после того как Дж. Мак-Дейд и С. Шепард сумели выделить *Legionella pneumophila*, которая вызвала в 1976 г. крупную эпидемическую вспышку пневмонии, охватившую 221 участника съезда Американского Легиона в Филадельфии (34 человека умерли).

В настоящее время различают несколько форм легионеллеза: болезнь легионеров и ее внутрибольничный вариант, характеризующиеся тяжелой пневмонией с выпотеванием экссудата в плевральную полость и заканчивающиеся в 15–60 % случаев смертельным исходом; понтийскую лихорадку с высокой интоксикацией и лихорадку Форте Брэгг с экзантемными высыпаниями без пневмонии.

Резервуарами легионелл являются почва и, главное, водоемы, в которых они обитают совместно с водорослями и простейшими и где могут сохраняться около 1 года (в теплой воде – даже размножаются). Основной фактор пе-

редачи легионелл – воздух, поступающий из неисправных систем водного кондиционирования.

Таксономия. Род *Legionella* одноименного сем. *Legionellaceae* включает два вида бактерий-легионелл: *L. pneumophila* и реже встречающийся *L. micdadei*, с которым связывают вспышки внутрибольничных легионеллезов.

Морфолого-культуральные и биохимические свойства. Легионеллы – тонкие подвижные с заостренными концами палочки размером 2–3 мкм в длину и 0,3–0,4 мкм в поперечнике, хотя могут встречаться и нитчатые формы. Спор и капсул не образуют. Грамотрицательны. Обычно культивируются на угольно-дрожжевой среде с L-цистеином и пирофосфатом железа, где на 3–5-е сут при температуре около 35 °С образуют мелкие коричневатые колонии с такой же пигментацией среды вокруг них. Ферментируют крахмал, гидролизуют желатин, оксидазо- и каталазоположительные.

Антигены и факторы патогенности. По антигенной структуре различают 47 серогрупп легионелл. Как и многие другие бактерии, легионеллы – факультативные внутриклеточные паразиты. Обладают адгезинами, выделяют экзотоксин (цитотоксин и гемолизин) и образуют эндотоксин.

Лабораторная диагностика. Диагноз легионеллезных пневмоний основывается на обнаружении легионелл в мазках из плеврального пунктата больных, обработанных импрегнированным серебром. Их проще выявить методом прямой иммунофлюоресценции. Легионеллы выделяют засевом материала на угольно-дрожжевую среду или путем заражения морских свинок с последующим пассажем суспензий органов животных на куриные эмбрионы. При серотипаже используется непрямая реакция иммунофлюоресценции. В крови больных происходит постепенное нарастание антител, и к 3–5-й неделе их титр возрастает в 4 раза и более по сравнению с начальным периодом заболевания, что выявляют в РНГА, РСК или ИФА с антигеном из *L. pneumophila*.

Лечение. Ввиду того что *L. pneumophila* продуцирует β-лактамазы, вызванный ими легионеллез лечат макролидами, а нозокомиальная форма инфекции, возбудителем которой является *L. micdadei*, не образующая β-лактамазы, – пенициллинами и цефалоспоринами.

Нокардиозы

Клиника и эпидемиология. Нокардиозы – редко встречающиеся оппортунистические инфекции. Свое название получили в честь французского бактериолога Э. Нокара, выделившего в 1888 г. *Nocardia asteroides*. Этот вид нокардий при проникновении в организм через воздух вызывает хронически протекающий легочный нокардиоз, проявляющийся образованием множественных сливных абсцессов и гранулем в легких и мягких тканях грудной клетки, а при попадании в кровоток – нагноительные процессы в других органах. При занесении N. asteroides в рану возникает подкожная форма нокардиоза с образованием таких спонтанно дренирующих абсцессов и гранулем, которые наблюдаются при кожном актиномикозе. Однако чаще подкожный нокардиоз вызывают не *N. asteroides*, а *N. brasiliensis*. Нокардии выделяют из почв и разлагающихся органических остатков, иногда – из экскретов здоровых людей, хотя они не входят обычно в состав нормальной микрофлоры. От человека к человеку нокардиозы не передаются.

Таксономия и морфолого-культуральные свойства нокардий. В патологических материалах нокардии имеют дифтероидную и нитчато-ветвящуюся форму, напоминающую актиномицеты. Правда, ответвления у нокардий очень короткие. При активном делении мицелий нокардий быстро распадается на короткие палочки и кокковидные микроструктуры. Растут они в диапазоне 28–37 °С на питательном агаре и бульоне (лучше – при наличии глюкозы), а также на среде Сабуро. Через 2–3 сут нокардии образуют мелкие гладкие бактериальной формы колонии, которые к концу второй недели становятся шероховатыми с фестончатыми краями, часто покрываясь, как у актиномицетов, белесоватым воздушным мицелием. В бульоне они образует вначале тонкую бесцветную пленку, которая со временем желтеет, но возможен также придонный рост в виде зерен.

Биохимические свойства и факторы патогенности. *N. asteroides* постоянно разлагает только глюкозу; больше углеводов ферментирует *N. brasiliensis*, но активность ее гидролаз очень вариабельна. Тот и другой вид нокардий продуцирует каталазу, а в организме больных – суперок-

сиддисмутазу, защищающую их от O_2-зависимых микробоцидных веществ фагоцитов.

Лабораторная диагностика. Основана на обнаружении в мокроте грамположительных нитчатых микроструктур нокардий, а в гнойном отделяемом абсцессов – беловато-кремовых гранул с наличием в них густого сплетения нокардий. При их отсутствии производят посев патологических материалов на среды с последующей идентификацией выделенных колоний.

Лечение. Нокардии чувствительны к рифампицину. Его часто комбинируют с другими антибиотиками и сульфаниламидными препаратами.

Серрациоз

Таксономия. Бактерии рода *Serratia* получили свое название в честь известного в XVIII в. лоцмана С. Серрати. Относятся к трибе *Klebsiella*. Наиболее изученным видом является *S. marcescens*, до недавнего времени называвшаяся *Bacterium prodigiosum* (чудесной палочкой). От разных штаммов серраций выделен 21 соматический О-антиген и 25 жгутиковых Н-антигенов, которые, сочетаясь, образуют 173 серовара.

Биологические свойства. *Морфология и культуральные свойства.* По форме и размерам, другим морфологическим признакам и окраске по Граму серрации напоминают эшерихии и отличаются от них лишь тем, что чаще образуют капсулу. Растут в широком температурном диапазоне от 20 до 40 °С. На плотных средах, в увлажненных местах помещений, на предметах и тканях, залежалой аппаратуре и инструментарии, в том числе медицинского назначения, серрации формируют круглые, выпуклые, красные или беловатые колонии диаметром 1–2 мм.

Факторами патогенности серраций являются фимбрии, протеазы, гемолизин и цитотоксин, по действию аналогичный токсину, который выделяют энтероинвазивные эшерихии. Являясь условно-патогенными микробами, серрации способны вызывать нагноение ран, воспалительные процессы верхних дыхательных путей, мочеполового тракта, среднего уха, глаз и даже генерализованную инфекцию. Человек заражается через объекты окружающей среды и предметы домашней и производственной обстановки.

Лабораторная диагностика. Для выделения чистой культуры серраций гной, кал, смывы с рук людей или аппаратуры отсевают на обычные для энтеробактерий дифференциально-диагностические среды в чашках Петри, а кровь и ликвор больных – во флаконы с питательным бульоном. Культуру идентифицируют по морфолого-культуральным и биохимическим свойствам. Отличительными признаками серраций являются: ферментация глюкозы (до газа), мальтозы, маннита, сахарозы, желатина; утилизация цитрата; карбоксилирование лизина.

Профилактика и лечение. Обеззараживание предметов и инструментов от серраций достигается автоклавированием и кипячением, погружением в 0,5 %-ный раствор хлорамина или 3 %-ный раствор пероксида водорода с 0,5 % моющего средства. *S. marcescens* резистентна к большинству антибиотиков и многим антисептикам. Эффективное лечение серрациоза достигается после получения антибиотикограммы.

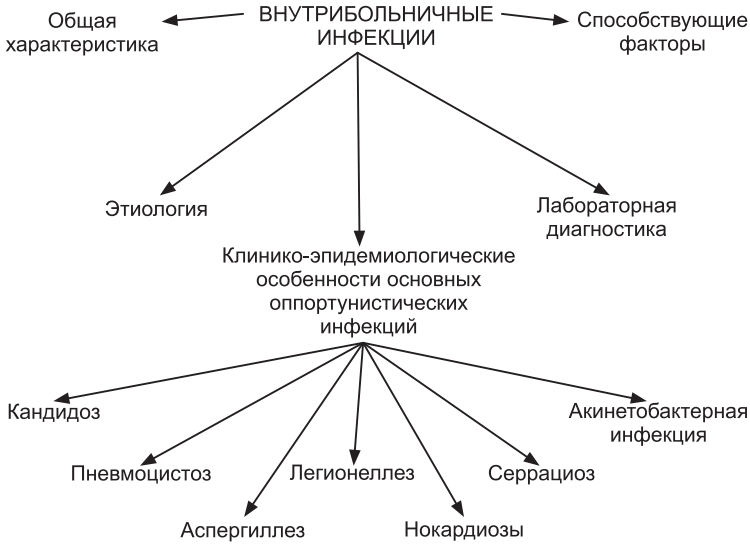
Акинетобактерная инфекция

Бактерии рода *Acinetobacter* относятся к сем. *Neisseriaceae*. Являются нормальными обитателями организма человека, выделяясь из носоглоточных смывов у 8–10 % обследованных лиц, а с кожных покровов – еще чаще (от каждого четвертого). При воспалительных процессах верхних дыхательных путей, конъюнктивы, кожи, мочеполовой системы, других органов и систем частота находок акинетобактеров в патологических материалах может возрастать до 45–50 %. Среди госпитальных инфекций, вызванных условно-патогенными бактериями, на долю акинетобактеров приходится 0,5–2,5 %. Источником акинетобактеров, кроме здоровых и больных людей, может быть и окружающая среда (теоретически – любой ее объект и продукт).

Морфология и культуральные свойства. Акинетобактеры, как это вытекает из их названия, – неподвижные (*akinesis*) бактерии, имеющие вид мелких капсулообразующих бесспоровых коккообразных грамотрицательных палочек размером 1,5×1,0 мкм. В мазках располагаются парами или небольшими беспорядочными группами. Хорошо растут на простых средах, образуя S-формы колоний, подобные тем, которые формируют энтеробактерии. На кровяном агаре через 48 ч вырастают выпуклые серовато-

белые колонии средних размеров (2–3 мм), изредка с зоной β-гемолиза вокруг. Каких-либо специфических факторов патогенности акинетобактеры не имеют. Колонизацию на тканях им обеспечивает капсула и липополисахарид клеточной стенки.

Профилактика акинетобактерных ВБИ предполагает соблюдение строгого противоэпидемического режима. Для их лечения используют различные антибиотики, которые назначают после получения результатов исследования лекарственной чувствительности акинетобактерных культур.



Граф 125

САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Санитарная микробиология изучает микробную обсемененность окружающей среды и протекающие в ней процессы самоочищения, что позволяет оценить ее гигиеническое и эпидемиологическое состояние, разработать мероприятия по оздоровлению среды и профилактике инфекционных заболеваний человека и животных.

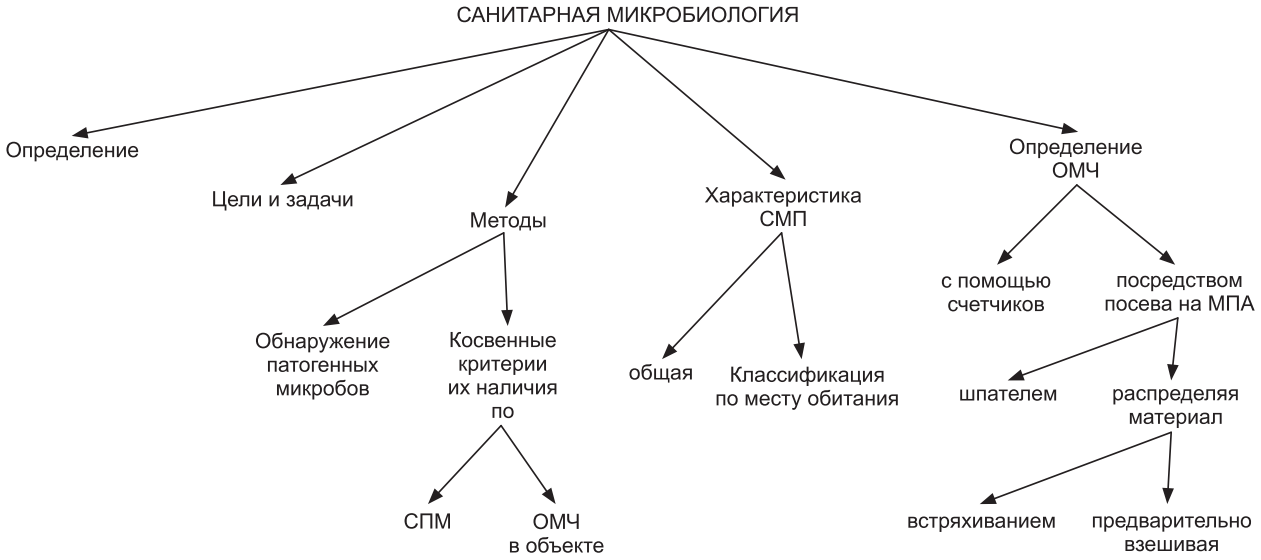
Санитарно-микробиологические исследования проводят при осуществлении санитарного надзора и по эпидемическим показаниям в очагах инфекционных болезней.

Плановые обследования проводятся с целью контроля за гигиеническим состоянием окружающей среды, персонала, связанного с заготовкой, приготовлением и реализацией продовольственных товаров, и лиц, работающих в детских и лечебно-профилактических учреждениях. Микробиологическое обследование по эпидемиологическим показаниям в очаге инфекции предполагает выявить источник и пути распространения инфекционной болезни. С этой целью наряду с материалами от больных и лиц, находящихся с ними в контакте, выборочно исследуются объекты внешней среды, которые могут являться факторами передачи заразного начала.

При каждом из этих обследований используют два метода: 1) *прямое обнаружение патогенных микробов*, что выполнить крайне трудно, так как в окружающей среде они расселены неравномерно и, главное, находятся в ничтожно малых количествах; 2) *получение косвенных доказательств* их нахождения в объектах внешней среды.

Косвенные критерии наличия патогенных микробов в объектах среды. О возможном нахождении возбудителей инфекционных болезней в объектах окружающей среды судят по двум показателям: содержанию санитарно-показательных микробов (СПМ), являющихся индикаторами биологического загрязнения окружающей среды, и общему микробному числу (ОМЧ) в различных ее объектах.

В состав *СПМ* обычно включают те микробы, которые: 1) постоянно обитают в полостях здоровых людей и теплокровных животных, а выделяясь во внешнюю среду вместе с экскретами носителей патогенных микробов и инфекционных больных, сохраняют такую же жизнеспособность в окружающей среде, как их патогенные виды-сородичи; 2) не размножаются в ней и не подвергаются видовой изменчивости; 3) в отличие от патогенных видов быстро растут на питательных средах и относительно легко *идентифицируются по минимальному числу признаков*, перечень и число которых в определенном объеме или массе объекта (например, в 1 см^3 или в 25 г) регламентируется нормативно-техническими документами.


САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ
Определение
Цели и задачи
Методы
Характеристика СМП
Определение ОМЧ
Обнаружение патогенных микробов
Косвенные критерии их наличия по
СПМ
ОМЧ в объекте
общая
Классификация по месту обитания
с помощью счетчиков
посредством посева на МПА
шпателем
распределяя материал
встряхиванием
предварительно взешивая

Граф 126

СПМ, обитающие в кишечнике человека и животных принято называть индикаторами фекального загрязнения, обитающих в верхних дыхательных путях – индикаторами орального загрязнения, а обитателей внешней среды и ее очистителей – индикаторами процессов самоочищения.

ОМЧ определяют путем прямого подсчета количества бактерий с помощью специальных камер и электронных счетчиков, а чаще – посредством посева на определенную питательную среду с последующим подсчетом выросших на ней колоний при заданном температурном режиме. При этом засев производится: 1) *шпателем*, нанося материал в количестве 0,01–0,1 мл в центр агаровой среды в чашке Петри; 2) *встряхиванием*, распределяя 0,3–0,4 мл взвеси по поверхности пластинчатого агара; 3) *взвешивая* материал в расплавленной агаровой среде перед внесением в чашку (см. «Определение ОМЧ питьевой воды»). Разведения исследуемых материалов для посева следует выбирать таким образом, чтобы количество бактериальных колоний на чашках составляло 30–300, а плесеней – не более 50.

Санитарно-микробиологическое исследование воды

В воде рек, озер, морей и океанов постоянно обитает и размножается специфическая для них, аутохтонная (водная), микрофлора. В ней доминируют одноклеточные водоросли и разнообразные аэробные виды водных бактерий практически всех таксономических групп, но чаще других – *Bacilius cereus*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, *Bacterium aquatilis communis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus candidus*, *M. roseus*, *Sarcina lutea*, *Proteus*, *Leptospira*. Среди анаэробных бактерий, которых в незагрязненных водах сравнительно мало, превалирует род *Clostridium*. Общее количество аутохтонной микрофлоры в открытых водоемах вдали от берега варьирует от десятков-сотен до нескольких тысяч особей в 1 мл, что зависит от вида водоема, степени его загрязнения, метеорологических условий, сезона, но прежде всего определяется эволюционно сложившимися взаимоотношениями микроорганизмов в водных биоценозах.

В прибрежных зонах водоемов численность и видовой состав водных микроорганизмов резко возрастает. Связано это с загрязнением их аллохтонной микрофлорой, попадающей из почвы с ливневыми, талыми и хозяйственно-фекальными сточными водами, в которых, помимо нормальной и условно-патогенной микрофлоры кишечника человека и животных, могут находиться сальмонеллы, шигеллы, холерные вибрионы, энтеровирусы и вирус гепатита А. Все эти виды сохраняются в воде от нескольких дней-недель (шигеллы) до нескольких месяцев (сальмонеллы, холерный вибрион).

Очищаются водоемы от перечисленных видов энтеропатогенных бактерий и вирусов в результате конкурентной активации аутохтонной микрофлоры. Иллюстрируя процессы самоочищения водоемов, отметим, что особенно много микроорганизмов может находиться в полисапробных, сильно загрязненных органическими веществами зонах, где резко выражены гнилостные процессы, вызванные анаэробными бактериями, актиномицетами и грибами. Число бактерий в этой зоне достигает 1 млн и более в 1 мл воды. Полисапробность сменяется мезосапробностью, т. е. умеренным загрязнением. В мезосапробной зоне дальнейший распад белков и углеводов осуществляют в основном нитрифицирующие и облигатно-аэробные бактерии. По мере уменьшения органических веществ патогенные виды микробов отмирают, а общее количество микробных особей в 1 мл воды снижается до 10 000. На завершающем этапе самоочищения водоема, который отмечается в так называемой олигосапробной зоне, содержащей небольшое количество органических веществ и 10–1000 микробных особей в 1 мл воды, патогенные энтеробактерии и вирусы полностью исчезают.

Основные виды санитарно-показательных микроорганизмов фекального загрязнения воды

Безопасность питьевой воды определяется отсутствием в ней болезнетворных микроорганизмов и ее соответствием разработанным правилам и нормативам (СанПиН 2.1.4.559-96). При этом оперируют СПМ, идентификация которых проводится по минимальному числу признаков, точнее: 1) по количеству бактерий группы кишечных па-

лочек (колиформных бактерий); 2) энтерококков; 3) спор сульфитредуцирующих клостридий; 4) колифагов; 5) цист лямблий (жиардий); 6) ОМЧ. Содержание СПМ в воде можно выражать также в титрах и индексах, понимая под *титром СПМ* наименьшее ее количество, выраженное в миллилитрах или граммах, в котором обнаруживается одна их особь, а под *индексом СПМ* – количество особей бактерий, находящихся в 1 л жидкости или в 1 кг плотного вещества. По одному показателю можно вычислить другой.

Микробиологические критерии качества питьевой воды

Бактерии группы кишечных палочек (БГКП). В состав БГКП кроме эшерихий включаются близкие им по морфолого-культуральным свойствам клебсиеллы (см. соответствующую главу «Частной микробиологии»), цитробактеры (*Citrobacter freundii*, *C. intermedius*) и энтеробактеры (*Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*), обитающие в кишечнике человека (в отличие от эшерихий они способны использовать цитрат среды Симмонса, расти на среде Мюллера с тетратионатом натрия и цианистым калием (цитробактер), в селенитовом бульоне, висмут-сульфитной среде, агаре с бриллиантовым зеленым и феноловым красным).

Дифференциация основных видов БГКП по **и**ндолообразованию, **м**етилрот и **Ф**огес-Проскауэра-реакциям, росту на **ц**итратных средах: **И** + **М** + **Ф** – **Ц** – – эшерихии; **И** – **М** + + **Ф** – **Ц** + – цитробактер, подвид клебсиелл *ozaenae*; **И** – – **М** – **Ф** + **Ц** + – энтеробактер, подвид клебсиелл *pneumoniae*; **И** – **М** + **Ф** – **Ц**– – подвид клебсиелл *rhinoscleromatis*.

Определение количества колиформных бактерий в питьевой воде методом мембранных фильтров. Для определения количества энтеробактерий в воде используются мембранные фильтры № 2, 3 из нитроцеллюлозы с диаметром пор не более 0,3 мкм или мембраны «Владипор» МФА-МА № 5, 6, 7, 8, обработанные кипячением в дистиллированной воде, где они обычно и хранятся. Фильтруя через них воду, используют аппарат Зейтца, водоструйный насос или вакуум-насос Комовского, которые присоединяют к отростку бунзеновской колбы (см. главу «Стерилизация и асептика»).

При отсутствии соответствующих указаний выбирают такой объем воды, чтобы на фильтре выросло не более 30 колоний БГКП. После завершения фильтрации установку разбирают и фламбированным пинцетом, не переворачивая, мембранный фильтр помещают на среду Эндо так, чтобы не допустить образования пузырьков воздуха между ним и питательной средой. На одной чашке Петри обычно размещают четыре фильтра. Одни среды Эндо с помещенными на их поверхности фильтрами инкубируют в термостат на 48 ч при температуре 37±1 °С, а другие – на сутки при 44±0,5 °С. Далее подсчитывают выросшие на них красные колонии БГКП, выделяя среди них по СанПиН 2.1.4.559-96 две группы: 1) *общие колиформные бактерии (ОКБ)* – грамотрицательные оксидазоотрицательные палочки, не образующие спор и ферментирующие лактозу и глюкозу до альдегида, кислоты и газа при температуре 37±1 °С в течение 24–48 ч; 2) *термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ)*, обладающие всеми признаками ОКБ в условиях выращивания при температуре 44±0,5 °С в течение 24 ч. Обнаружение в питьевой воде ОКБ указывает на ее потенциальную опасность, так как в ней могут содержаться практически все виды патогенных энтеробактерий; наличие ТКБ – на свежее фекальное загрязнение. Вывод о пригодности воды для питья в этих исследованиях делают, установив, что в 300 мл отсутствуют как ОКБ, так и ТКБ.

Для обнаружения колиформных палочек, сбраживающих глюкозу, выросшие на мембранных фильтрах красные колонии засевают в полужидкий агар с 1 % глюкозы и индикатором ВР или на 1 %-ную пептонную воду с наличием в ней 0,5 % хлористого натрия и 0,5 % глюкозы со спиртовым раствором бромтимолового синего или индикатором Андраде (в концентрированной пептонной воде количество NaCl и глюкозы увеличено в 10 раз). Положительный результат на полужидком агаре отмечают через сутки по изменению цвета среды из розового на синий (подкисление) и разрывам в столбике (образование газа), а на пептонной воде – по помутнению, образованию кислоты с газом или без него.

Энтерококки (*Streptococcus faecalis* и *S. faecium* группы Д), постоянно обитающие в кишечнике людей, – второй по значимости после БГКП критерий загрязнения воды фекалиями человека.

Биологические особенности. Морфология. Энтерококки – вариабельные по форме круглые или овальные кокки, напоминающие коккобактерии, диаметром от 0,5 до 1,5 мкм, располагающиеся неправильными цепочками и парами (в 40 %-ном желчном бульоне образуют длинные цепи). Спор и капсул не образуют, имеют жгутики. Грамположительные.

Культуральные свойства. Культивируются при температуре 35–37 °С на обычных средах, но лучше растут на сахарном МПБ и МПА с гидролизатом дрожжей. Как правило, вырастают на вторые сутки. Бульон мутят. Колонии энтерококков на МПА – круглые, с ровными краями, выпуклые, диаметром 1–2 мм.

Биохимические свойства. В отличие от других грамположительных кокков энтерококки не обладают каталазной активностью. Ферментируют глюкозу и лактозу. *S. faecalis* расщепляет глицерин в аэробных и анаэробных условиях, а *S. faecium* – только в аэробных в анаэростате.

Для дифференциации энтерококков широко используют тесты Шермена: 1) растут в температурном диапазоне 10–45 °С; 2) на щелочных средах (pH 9,6) с антибиотиками (полимиксин, пенициллин) и высокими концентрациями хлорида натрия (6,5 %), а также в обезжиренном молоке с 0,1 % метиленового синего; 3) терморезистентны (60 °С в течение 30 мин).

Как СПМ, энтерококки отличаются тем, что в окружающей среде не имеют двойников, не подвержены морфологической изменчивости и намного быстрее, чем эшерихии, в ней отмирают. Их рекомендуется определять для подтверждения фекального загрязнения поверхностных и подземных водоисточников в случае превышения нормативного значения индекса лактозоположительных кишечных палочек и низких значениях коли-индекса. При индексе энтерококков более 500 кл./л предполагается, что водоисточник загрязнен «свежепоступающими» фекалиями. Более того, по общему количеству энтерококков и эшерихий можно судить о массивности фекального загрязнения.

Идентификация. Для идентификации выделенных из окружающей среды энтерококков используют щелочно-полимиксиновую и молочно-ингибиторную среды:

1. Щелочно-полимиксиновая: МПБ + глюкоза + дрожжевой экстракт (стимулятор роста) + полимиксин (ингибитор посторонней микрофлоры) + бромтимоловый синий (индикатор). Исходный цвет среды – синий, при росте энтерококков – желтый.

2. Молочно-ингибиторная с теллуритом калия или с 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом (ТТХ): МПА + обезжиренное молоко (стимулятор) + полимиксин и генцианвиолет (ингибиторы) + теллурит калия (или ТТХ), за счет редукции которого колонии *S. faecalis* становятся черными, а колонии *S. faecium* – серыми (в случае использования ТТХ – соответственно, розового и красного цвета).

В международных стандартах к группе фекальных стрептококков относят те кокки, которые растут на средах с азидом натрия при температуре 44–45 °С в течение 45–72 ч.

Сульфитредуцирующие клостридии как СПМ фекального загрязнения воды включают в основном Clostridium perfringens (90 %) и С. sporogenes (см. «Возбудители газовой гангрены»), споры которых попадают в окружающую среду с фекалиями человека и животных.

Выявление спор сульфитредуцирующих клостридий в питьевой воде проводят, пропуская ее через те же мембранные фильтры с последующим выращиванием *С. perfringens* в анаэростате при 44±1 °С в течение 16–18 ч на среде Вильсона – Блера, где они формируют черные колонии. При этом споры сульфитредуцирующих клостридий должны отсутствовать в 20 мл питьевой воды. Обнаружение сульфитредуцирующих клостридий в ней перед ее поступлением в распределительную сеть указывает, что некоторые виды патогенных микробов могли остаться жизнеспособными после хлорирования.

Идентификация. Экспресс-метод идентификации выделенной культуры предполагает ее засев в столбик среды Вильсона – Блера (щелочной МПА+глюкоза+сульфит натрия+хлорид железа), где, при наличии С. perfringens происходит быстрое почернение колоний (2–3 ч) вследствие редукции Na_2SO_3 с образованием $FeSO_3$. Как показатель фекального загрязнения С. perfringens используется также при исследовании воды открытых водоемов. О свежем фекальном загрязнении водоемов свидетельствуют высокие значения перфрингенс-индекса и коли-индекса, о давнем – низкий перфрингенс-индекс и высокий коли-индекс.

Колифаги – вирусы, лизирующие эшерихии (см. «Фаги»). Их обнаружение в воде служит прямым показателем наличия в ней кишечных палочек и косвенным индикатором выживаемости энтеровирусов.

Определение содержания колифагов в питьевой воде. Количество колифагов в воде определяют титрационным

методом агаровых слоев по Грациа. Для этого накануне исследования в стерильные чашки Петри разливают по 25–30 мл 1,5 %-ного МПА, высушивают его в течение 1 ч под бактерицидной лампой и, закрыв крышками, оставляют до следующего дня при комнатной температуре. Перед исследованием из пробы воды объемом 1 л отбирают 10 мл, которые обеззараживают хлороформом (1–2 мл), тщательно встряхивая смесь, после чего оставляют ее на 15 мин для осаждения. Обработанную таким образом воду отсасывают над осадком хлороформа и по 1 мл наносят на поверхность питательного агара пяти чашек Петри. После этого, расплавив заготовленные впрок столбики полужидкого агара (3 мл 0,7 %-ного), остужают их до 46–48 °С и поочередно вносят в них 0,1–0,2 мл 18-часовой культуры *E. coli B* или *C*. Тщательно перемешивают, вращая пробирки между ладонями, и быстро выливают в чашки, залитые исследуемой водой, равномерно покрывая поверхность среды полужидким агаром. После его затвердевания, что происходит в течение 30 мин, чашки в перевернутом виде помещают в термостат при 37 °С. Учет результатов проводят через 18 ч. Количество бляшек колифага, образовавшихся на бактериальных газонах пяти чашек, пересчитывают на 100 мл исследуемой пробы воды. По СанПиН 2.1.4.559-96 в этом объеме питьевой воды не допускается наличие колифагов.

Те же правила и нормативы требуют отсутствия в объеме 50 дм^3 питьевой воды *цист лямблий* (жиардий), которые определяют под сухой системой светового микроскопа в капле раствора Люголя, покрытой покровным стеклом.

Определение ОМЧ в воде методом глубинного засева. Отбор проб водопроводной воды регламентирован МУК 4.2.671-97. Для их отбора используют стерильную одноразовую посуду или емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не оказывающих какого бы то ни было влияния на жизнеспособность находящихся в воде микроорганизмов. Из распределительной сети воду отбирают после предварительной стерилизации кранов обжиганием пламенем горящего тампона, смоченного спиртом, и последующего ее спуска в течение 10 мин. Для анализа во флаконы берут не менее 500 мл воды и если она хлорирована, то в них перед стерилизацией вносят 10 мг серноватисто-кислого натрия. Доставка воды проводится

в контейнерах-холодильниках, поддерживающих температуру +4–10 °С, которая позволяет хранить ее в течение 6 ч. При невозможности охладить воду исследование должно проводиться в ближайшие 2 ч после забора.

При определении ОМЧ в водопроводной воде готовят ряд пробирок, содержащих 9 мл стерильной воды, в которых делают несколько 10-кратных ее разведений. Для этого в первую пробирку вносят 1 мл исследуемой пробы воды и, тщательно перемешав ее путем продувания воздуха через пипетку, переносят 1 мл воды, разведенной 1 : 10, во вторую, а из нее – в третью пробирку и т. д., каждый раз меняя пипетку. Обычно на питательные среды засевают не менее двух разведений с таким расчетом, чтобы на чашках Петри образовалось не менее 30 и не более 300 колоний.

Каждое из них в объеме 1 мл по каплям вносят на дно чашек Петри и заливают его расплавленным и охлажденным до 45 °С питательным агаром в количестве 10–12 мл или 1 мл исследуемой воды вливают в пробирку с таким же объемом расплавленного агара и после быстрого перемешивания ее содержимого между ладонями выливают в стерильную чашку, осторожно разравнивая среду. После застывания агара чашки помещают в термостат при температуре 37 °С. Через 1 сут подсчитывают число колоний на обеих чашках, пользуясь лупой, увеличивающей в 5 раз. Результат суммируют, делят на два и выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой воды с учетом того, во сколько раз она разводилась. Например, в чашке Петри с посевом 1 мл исследуемой воды, разведенной 1 : 100, подсчитано 10 КОЕ, следовательно, в 1 мл их будет 100. СанПиН 2.1.4.559-96, однако, не допускают в питьевой воде более 50 КОЕ/ мл.

Определение патогенных энтеробактерий и энтеровирусов в воде

Выделение и идентификация сальмонелл. Из воды сальмонеллы выделяются путем накопления их на *магниевой среде* (пептонная вода с дрожжевым экстрактом как стимулятором роста, водным раствором бриллиантового зеленого и хлоридом магния, являющихся элективными факторами) и *селенитовом бульоне*, подавляющих развитие эшерихий и другой посторонней микрофлоры, кото-

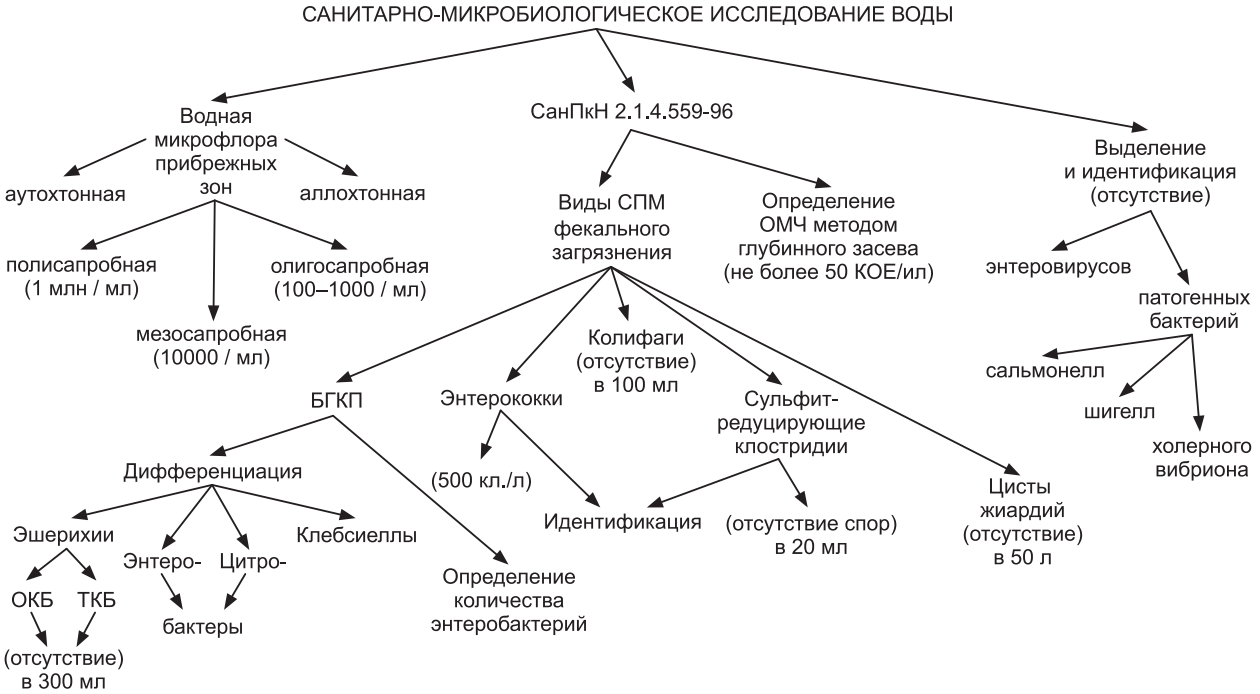
рая препятствует росту сальмонелл. *Чистые культуры получают на висмут-сульфит агаре*. Вид и серовар устанавливают в РА с использованием групповых монорецепторных О- и Н-сывороток.

Выделение и идентификация шигелл. Для первичного накопительного посева шигелл используется пептонная вода с лактозой и раствором селенистокислого натрия как ингибитора. Видовая принадлежность выделенных культур из исследуемых проб устанавливается на среде Плоскирева с желчными солями, бриллиантовым зеленым (ингибиторы) и нейтральным красным (индикатор) с последующей идентификацией по спектру ферментов и, главное, в РА с использованием видоспецифических сывороток.

Выделение и идентификация холерного вибриона. Накопление холерного вибриона производится на 1 %-ной пептонной воде. Основным в его идентификации является обнаружение в мазках из пленок-паутинок, вырастающих на ней через 5–6 ч, изогнутых в виде запятой грамотрицательных палочек, располагающихся в виде стайки рыб; быстро передвигающихся в раздавленной и висячей каплях и мгновенно обездвиживающихся при добавлении О-противохолерной сыворотки; агглютинирующихся в О-противохолерных сыворотках и лизирующихся типовыми холерными фагами С и Эль-Тор.

О возможном наличии холерных вибрионов в воде часто судят по косвенному показателю, выделяя из нее *Vibrio parahaemolyticus* на висмут-сульфитном агаре с сахарозой и феноловым красным. На этой среде не ферментирующий сахарозу парагемолитический вибрион образует бесцветные колонии, а бактерии, разлагающие ее, – темно-коричневые (БГКП не вырастают).

Выделение и идентификация энтеровирусов. Выделить энтеровирусы из открытых водоемов очень трудно вследствие низкого их содержания. В связи с этим важным этапом является предварительное концентрирование энтеровирусов на марлевом тампоне, помещенном на несколько суток в ток воды. Для его приготовления вырезают три 16-слойных марлевых квадрата размером 10 × × 10 см, сложенных накрест и прошитых капроновой леской для увеличения их поверхности. Транспортировку тампонов в лабораторию производят в стерильных стеклянных стаканах вместимостью 0,5–1 л. До обработки


САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ
Водная микрофлора прибрежных зон
аутохтонная
аллохтонная
полисапробная (1 млн / мл)
мезосапробная (10000 / мл)
олигосапробная (100–1000 / мл)
СанПкН 2.1.4.559-96
Виды СПМ фекального загрязнения
Определение ОМЧ методом глубинного засева (не более 50 КОЕ/ил)
Выделение и идентификация (отсутствие)
энтеровирусов
патогенных бактерий
сальмонелл
шигелл
холерного вибриона
БГКП
Энтерококки
Колифаги (отсутствие) в 100 мл
Сульфит-редуцирующие клостридии
Дифференциация
(500 кл./л)
Идентификация
(отсутствие спор) в 20 мл
Цисты жиардий (отсутствие) в 50 л
Эшерихии
Энтеро-
Цитро-
Клебсиеллы
ОКБ
ТКБ
бактеры
(отсутствие) в 300 мл
Определение количества энтеробактерий

Граф 127

тампоны хранят в холодильнике в замороженном состоянии при –15–20 °С. Приступив к исследованию, тампоны размораживают, и пробы воды центрифугируют при 2500 об/мин в течение 20 мин. Получив надосадочную жидкость, ее переносят в стерильные пенициллиновые флаконы и добавляют равное по объему количество этилового эфира. Тщательно смешивают и наносят 0,5 мл на монослой клеток, выросших во флаконах, или 0,2 мл – на монослой в пробирках. При этом используют первичные культуры клеток почек обезьян, фибробластов эмбриона человека, клеток почек человека, перевиваемые линии Hep-2, HeLa и другие, предварительно удалив питательную среду. Зараженные культуры клеток во флаконах и пробирках помещают на 1 ч в термостат при 37 °С. Затем пробу сливают, и монослой клеток заливают поддерживающей средой 199 без сыворотки. После этого флаконы и пробирки инкубируют в термостат. О наличии вирусов судят по цитопатическому эффекту, который проявляется округлением клеток и появлением в них гранул с последующим отторжением от поверхности стекла. Вид и серотип энтеровирусов определяют по иммунной сыворотке, обеспечивающей нормальное развитие монослоя. Для этого жидкость, полученную после дегенерации клеток вирусами, смешивают с типоспецифическими сыворотками и после 60-минутного настаивания прибавляют к свежеприготовленным культурам клеток. Смеси вируса и гетерологических сывороток через 3–6 сут вызывают такое же разрушение клеток, как суспензия одного вируса. Для идентификации типов вирусов Коксаки реакцию нейтрализации ставят на новорожденных мышах.

Санитарная микробиология почвы

В почве обитает много видов микроорганизмов, участвующих в минерализации органических соединений и образовании гумуса. Состав и общая микробная обсемененность зависят от типа, физико-химических свойств, степени окультуренности почвы, географического расположения и климатических условий. В частности, чернозем отличается самой высокой микробной обсемененностью. Благоприятствует ей хорошая аэрация, влажность, водопроницаемость, наличие большого количества органических соединений в почве и весенне-летний период времени.

Среди почвенных микробов различают патогенные для человека и санитарно-показательные микроорганизмы-сапрофиты.

В зависимости от резервуара и длительности выживания среди патогенных видов выделяют три группы: 1) микроорганизмы, для которых почва является природным резервуаром (клостридии ботулизма, возбудители глубоких микозов, аспергиллы); 2) длительно сохраняющиеся (клостридии столбняка и газовой гангрены, сибиреязвенная бацилла); 3) 2–3 мес. переживающие в ней (сальмонеллы, шигеллы, холерный вибрион и энтеровирусы).

Санитарно-показательные микроорганизмы почвы

К СПМ почвы, характеризующим ее фекальное загрязнение, относят энтерококки, сульфитредуцирующие клостридии, сапрофитическую группу почвенных бактерий, включающую БГКП, бактерии-аммонификаторы, нитрификаторы, целюллозобактерии, термофильные бактерии, свободноживущие грибы и актиномицеты. Предусматривается определение ОМЧ, общей численности сапрофитов и почвенных бацилл, энтерококкметрии, перфрингенс-титра.

Прибегая к санитарно-микробиологическому анализу загрязнения почвы, выбирают участки площадью 25 м^2. Пробы забирают стерильным инструментом с двух горизонтов – 0–5 и 5–20 см из каждого угла и центра квадрата по 200 г с таким расчетом, чтобы общая масса составила 1 кг. После тщательного перемешивания проб на анализ берут 100–200 г почвы и, поместив ее в стерильную банку, быстро доставляют в лабораторию. При невозможности проведения анализа в течение одного дня пробы хранят в холодильнике при температуре 4–5 °С, но не более 24 ч, а при исследовании на БГКП и энтерококки – не более 3 сут.

Каждый образец почвы в лаборатории просеивается через сито с диаметром ячеек 3 мм и растирается в стерильной ступке пестиком. Из пробы отбирают необходимые для исследования навески, к которым в соотношении 1 : 10 добавляют стерильную водопроводную воду и встряхивают в течение 10 мин. После отстаивания суспензии готовят ряд последовательных 10-кратных разведений, в которых определяют почвенные СПМ и уровень микробного загрязнения почвы.

Краткая характеристика СПМ почвы по МУ 1446–76

К *БГКП* почвы относят не обладающие оксидазной активностью грамотрицательные бесспоровые мелкие бактерии, сбраживающие глюкозу и лактозу с образованием кислоты и газа при 37±0,5 °С в течение 24–48 ч. О наличии клостридий перфрингенс и энтерококков в почве судят по показателям, описанным в подразделе «Микробиологические критерии качества питьевой воды».

Аммонификаторы – бактерии и грибы, разлагающие азотсодержащие органические вещества до аммиака (см. «Круговорот азота»). Выделяют их на МПБ, который разливают в пробирки или колбы. Засевают почвенной суспензией, разведенной от 1 : 100 до 1 : 1000000. Для улавливания газообразного аммиака между пробкой и стенками горлышка сосудов подвешивают красную лакмусовую бумажку. Аммонификаторы вырастают спустя 2–3 дня инкубации при 25–30 °С, вызывая посинение свисающей над питательным бульоном лакмусовой бумажки. Высокие значения численности аммонификаторов свидетельствуют о поступлении в почву большого количества белковых соединений.

Нитрификаторы – физиологическая группа бактерий, способных использовать аммонийные соли и нитриты в качестве источника азота, завершающая цикл превращения в почве азотсодержащих соединений до нитратов. Нитрифицирующие бактерии выделяют на синтетической среде Виноградского (дистиллированная вода+соли сульфата аммония, двузамещенного фосфата калия, сульфата магния+мел), засевая ее почвенными суспензиями в разведениях от 1 : 100 до 1 : 10 000. Выращивают их в термостате при 28–30 °С. В процессе развития нитрифицирующих бактерий в среде появляются азотистая и азотная кислоты. Образование окислых соединений азота проверяют на 5–7-е и на 14–15-е сут, добавляя к среде дифениламин, что в положительных случаях вызывает ее посинение. Высокие индексы нитрификаторов в почве указывают на активно идущие в ней процессы разложения органических веществ.

Целлюлозоразлагающие микроорганизмы – это группа эубактерий и актиномицетов, обеспечивающая очищение почвы от остатков растительного происхождения. Обычно эубактерии выделяют на среде Гетчинсона (дистиллирован-

ная вода – 1000,0, Na_3PO_4 – 2,5 г, KH_2PO_4 – 1 г, $MgSO_4$ – 300 мг, $CaCl_2$ и NaCl – по 100 мг, $FeCl_2$ – 10 мг), а актиномицеты – на среде Гаузе № 1 (вода – 1000,0+KNO_3 – 1 г, KH_2PO_4, $MgSO_4$, NaCl – по 0,5 г, $FeSO_4$ – 10 мг, крахмал – 20 г), засевая их почвенными суспензиями (1 : 10–1 : 10 000). Среды разливают по 2–3 мл в пробирки, куда в качестве источника углерода помещают складчатую фильтровальную бумагу или ее полоски. О наличии целлюлозоразлагающих бактерий судят по «изъеденности» фильтровальной бумаги, которая возникает спустя несколько дней.

Термофилы – разнородная группа преимущественно спорообразующих сапрофитных бактерий, размножающихся при температуре 50–70 °С. Они попадают в почву вместе с компостами и перепревшим навозом. Для их выделения навески почвы из разведений 1 : 10–1 : 100000 засевают на две-три параллельные чашки Петри с МПА. Так как выращивают их в термостате при 60 ±2 °С, то слой питательного агара следует делать более толстым, чем для культивирования мезофилов, произрастающих при 35–37 °С. Колонии термофилов на МПА подсчитывают через 24 ч с последующим перерасчетом на 1 г почвы. Свежий навоз, фекалии, сточные жидкости бедны термофилами, но богаты кишечной палочкой. Поэтому если в почве много термофилов и кишечных палочек, то очевидно, что она была удобрена компостами и навозом. Почвы с высоким содержанием кишечных палочек и бедные термофилами рассматривают как загрязненные фекалиями. Обнаружение в почве большого количества термофильных микроорганизмов свидетельствует о незавершенности процессов самоочищения.

Количественное определение загрязненности почвы

ОМЧ почвы и количество почвенных бацилл определяются путем подсчета колоний, вырастающих на МПА при 37 °С в течение 24 ч, а *численность сапрофитов* – на том же МПА, выращивая их при 28–30 °С в течение 72 ч.

При определении *перфрингенс-титра* почвенную суспензию 1 : 10 вносят в два параллельных ряда пробирок. Один из них для уничтожения вегетативных форм клостридий прогревают в течение 15 мин при температуре

80 °С. После этого интактные и прогретые разведения, в которых могли остаться споры клостридий, *ex tempore* заливают средой Вильсона – Блера. Посевы инкубируют в термостат при температуре 37 °С на 24 ч, и затем подсчитывают характерные колонии *C. perfringens*. Определяя их число, нередко используют мембранные фильтры, которые после фильтрации через них почвенных суспензий помещают на ту же среду Вильсона – Блера. Высокий перфрингенс-титр свидетельствует о давнем фекальном загрязнении почвы.

При этом ОМЧ является интегральным показателем загрязнения почвы (преимущественно фекальной микрофлорой), общая численность сапрофитов – показателем ее органического загрязнения, а общее число и процент почвенных бацилл отражает глубину минерализации (в чистых почвах число бацилл составляет 20–50 % от ОМЧ, а в загрязненных – резко снижено).

Микробиологические критерии оценки санитарного состояния почвы

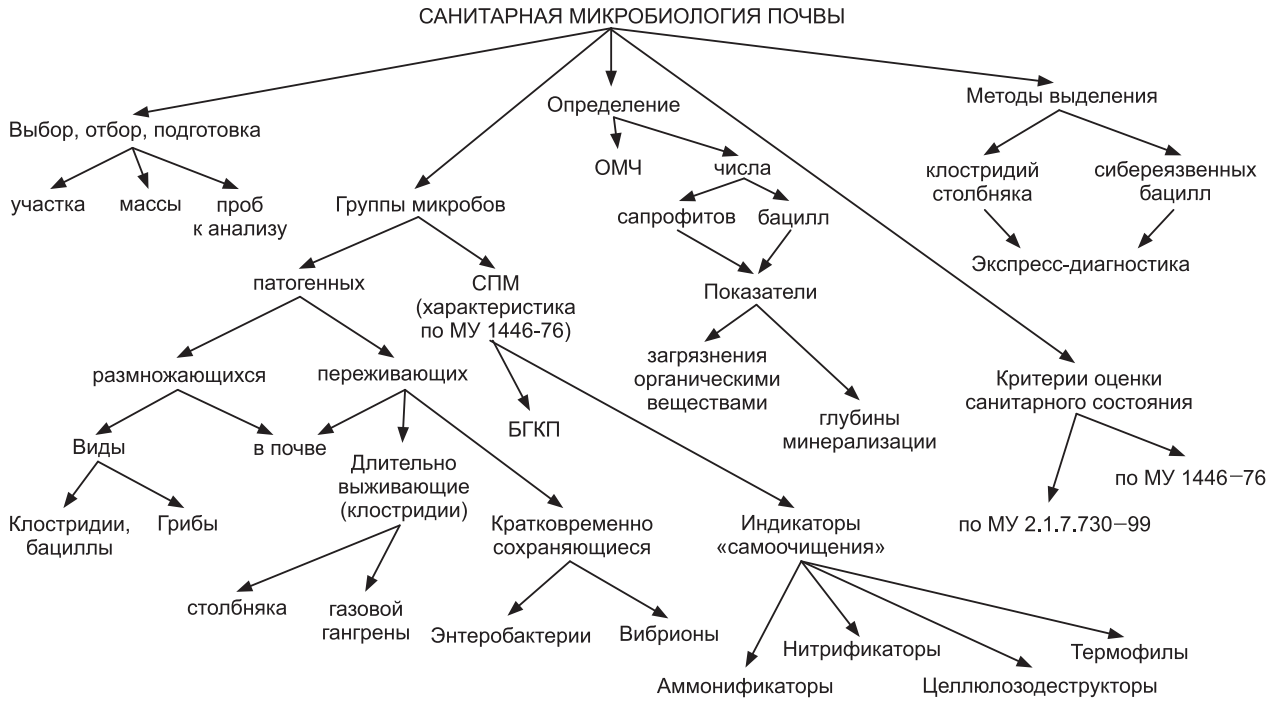
Используются в основном два критерия: косвенные показатели, характеризующие интенсивность биологической нагрузки на почву, – БГКП и энтерококки, – и прямые показатели эпидемической опасности – патогенные энтеробактерии и энтеровирусы.

По МУ 2.1.7.730-99, почву считают «*чистой*» при отсутствии патогенных микроорганизмов и значениях индексов СПМ – до 10 м. т. на 1 г. Индекс СПМ 10 клеток/г указывает на загрязнение почвы патогенными энтеробактериями, а индекс 10 КОЕ колифагов/г – энтеровирусами.

Несколько другие критерии оценки санитарного состояния почвы приведены в МУ 1446-76: «чистой» она считается при титрах БГКП, нитрификаторов и клостридий, равных соответственно 1 г, 0,1 г и 0,01 г, а загрязненной – при более низких титрах.

Определение основных видов патогенных бактерий почвы

Экспресс-метод выделения и идентификация клостридий столбняка. Для ускоренного выделения палочек столбняка почвенные навески засеваются в конденсаци-


САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ ПОЧВЫ
Выбор, отбор, подготовка
участка
массы
проб к анализу
Группы микробов
патогенных
СПМ (характеристика по МУ 1446-76)
размножающихся
переживающих
Виды
в почве
Клостридии, бациллы
Грибы
Длительно выживающие (клостридии)
столбняка
газовой гангрены
БГКП
Кратковременно сохраняющиеся
Энтеробактерии
Вибрионы
Определение
ОМЧ
числа
сапрофитов
бацилл
Показатели
загрязнения органическими веществами
глубины минерализации
Индикаторы «самоочищения»
Аммонификаторы
Нитрификаторы
Целлюлозодеструкторы
Термофилы
Методы выделения
клостридий столбняка
сибереязвенных бацилл
Экспресс-диагностика
Критерии оценки санитарного состояния
по МУ 1446–76
по МУ 2.1.7.730–99

Граф 128

онную воду скошенной сыворотки (метод Файлдса). Вырастая на ней в анаэростате, палочки-перитрихи столбняка быстро перемещаются по поверхности косяка и, обгоняя банальную микрофлору, на следующие сутки выделяются из ассоциаций в чистой культуре на верхней его трети. Далее она идентифицируется по морфолого-культуральным признакам.

Экспресс-метод выделения и идентификация сибиреязвенных бацилл. Бациллы выделяют на МПБ («комок ваты») и МПА («колонии-парики»). Идентификация бацилл и их дифференциация с почвенными антракоидами производится по морфолого-культуральным и патогенным свойствам.

Основным санитарно-показательным микроорганизмом среди антракоидов является *B. cereus*, которая, попадая в продукты, может вызывать у человека пищевые отравления. Для ее выделения используют солевой полимиксиновый агар с трифенилтетразолий хлоридом: МПА + + полимиксин + 6 %-ный NaCl (элективные факторы) + + ТТХ + раствор яичных желтков. На этой среде B. cereus, обладающая лецитовителлазой, формирует зернистые колонии рубинового цвета с неровными краями, окруженными зоной помутнения.

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

Воздух является неблагоприятной средой для всех видов микроорганизмов ввиду отсутствия питательных веществ и влаги, суточных и сезонных температурных перепадов, микробоцидного действия солнечных лучей.

Видовой состав и численность микрофлоры атмосферного воздуха. В атмосферном воздухе обнаруживаются микрококки (*Micrococcus roseus*, *M. flavus*), сарцины (*Sarcina flava*, *S. alba*, *S. rosea*) и другие пигментные бактерии, спороносные бациллы (*Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. mesentericus*), грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*. Численность их колеблется от нескольких экземпляров в 1 м^3 над поверхностью гор, морей и океанов до многих тысяч особей над крупными промышленными городами, где они, адсорбируясь на частицах пыли, дыма и

копоти, становятся хорошо защищенными от высушивания, солнечных и ультрафиолетовых лучей. Загрязнение атмосферного воздуха также зависит от региона, места, сезона года. Так, в хвойных лесах их не больше, чем в Арктике (2–3 особи на 20 $м^3$). В летнее время микробная обсемененность атмосферного воздуха в несколько раз выше, чем в зимнее. Следует подчеркнуть, что в атмосферном воздухе постоянно происходят процессы самообновления и очищения от патогенных микробов.

Видовой состав и численность микрофлоры воздуха рабочих и жилых помещений. Микрофлора воздуха помещений более разнообразна. Ее количество и видовой состав напрямую зависят от их площади и санитарно-гигиенического режима. При переуплотнении жилищ, на малых производственных площадях, в условиях плохой вентиляции и сухой уборки в воздухе рабочих и жилых помещений может накапливаться несравнимо большее количество микробов, чем в атмосфере промышленных городов, часто покрытых смогом. Микробы содержатся в воздухе помещений в трех фазах аэрозоля: 1) *капельной*, *или крупноядерной*, окруженной водносолевой оболочкой, выделяющейся при кашле и чихании из носоглотки человека; 2) *мелкоядерной*, образующейся из крупноядерной при ее подсыхании; 3) *фазы «бактериальной пыли»* (бактерии, окруженные тончайшей жидкой пленкой), оседающей на различных предметах и легко диспергируемой под воздействием самых малых токов воздуха. Диаметр частиц крупноядерной фазы составляет 0,1 мм и более, мелкоядерной – 0,05 мм и менее, а бактериально-пылевой – от 0,01 до 1 мм. Надо подчеркнуть, что при вдохе с потоком воздуха в верхние дыхательные пути человека легче всего проникают лишь те микробы, которые находятся в мелкоядерной фазе аэрозоля с диаметром частиц 5 мкм.

Помимо микрофлоры, свойственной атмосферному воздуху, в воздухе закрытых помещений всегда находятся сапрофиты и условно-патогенные микроорганизмы, обитающие в верхних дыхательных путях здорового человека и окружающих его животных. Более того, при наличии микробоносителей и больных воздух обсеменяется пиогенными стафило- и стрептококками, микобактериями туберкулеза, сальмонеллами и другими возбудителями инфекционных заболеваний.

В системе гигиенических и противоэпидемических мероприятий при текущем санитарном надзоре в 1 $м^3$ воздуха определяют ОМЧ, наличие в нем золотистого стафилококка, стрептококков, редко – микобактерий туберкулеза, грамотрицательных бактерий и грибов.

Методы определения ОМЧ в воздухе

Следует заметить, что при определении загрязненности воздуха строгого нормирования количества микробов в воздухе закрытых помещений не существует. Пробы воздуха отбирают седиментационным и аспирационным методами с помощью приборов-микробоуловителей, называемых импакторами (*impactum* – вталкивать) и импинджерами (*impinger* – сталкиваться). В импакторах происходит принудительное осаждение микроорганизмов из прокачиваемого через прибор воздуха на поверхность плотной питательной среды, в импинджерах они задерживаются жидкой питательной средой, стерильной водой или изотоническим раствором натрия хлорида, через которые под давлением просачивают воздух. Скорость отбора проб воздуха в них зависит от типа прибора и может составлять от 4–10 до 100–200 л/мин.

Седиментационный метод. Метод спонтанного осаждения микрофлоры воздуха предложил Р. Кох. Используя его для определения общего количества бактерий и грибов в воздухе закрытых помещений, готовят чашки Петри с питательным агаром и средой Сабуро. Их ставят открытыми на различной высоте от пола помещения. В среднем рекомендуется отбирать одну пробу на каждые 20 $м^2$. Срок экспозиции для седиментации бактерий зависит от предполагаемой степени микробообсемененности воздуха. Обычно чашки открывают на 10–30 мин. Посевы помещают в термостат на 24 ч при температуре 37 °С с последующим выдерживанием их на протяжении 48 ч при комнатной температуре. При спокойном состоянии воздуха на площадь 100 $см^2$ оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 0,01 $м^3$ воздуха, но обычно подсчет числа колоний в 1 $м^3$ воздуха производят, пользуясь специальной таблицей; при этом выросшее количество колоний умножают на соответствующий множитель.

Таблица 23. **Расчет числа бактерий в 1 м^3 воздуха при 10-минутной экспозиции**

№ п/п	Диаметр чашки, см	Площадь чашки, см^2	Множитель
1	8	50,0	100
2	9	63,0	80
3	10	78,5	60

Если в чашке с МПА площадью 78,5 см^2 при 10-минутной экспозиции оказалось 40 колоний, то количество микробов в 1 м^3 воздуха будет равно 2400 (40 × 60). При большей экспозиции вводят поправку, уменьшая множитель соответственно кратности увеличения экспозиции.

Аспирационный метод. Для исследования воздуха аспирационным методом применяют импакторы различной конструкции, чаще всего – отечественный импактор Кротова, с помощью которого удается улавливать бактерии, и импинджеры Дьяконова и ПОВ-1 для улавливания не только бактерий, но и вирусов.

При использовании аппарата Кротова в него помещают открытую чашку Петри с питательным агаром, закрывают крышкой и включают электромотор. Воздух поступает в чашку Петри через клиновидную щель и с силой ударяется о поверхность питательной среды. Равномерное распределение микроорганизмов на чашке обеспечивается ее вращением. Обычно пропускают 50–100 л воздуха со скоростью 25 л/мин. По истечении 2–4 мин засеянную чашку Петри снимают, закрывают и помещают в термостат. Результат учитывают через 24 ч. При наличии на чашке Петри, например, 250 колоний, при условии, что воздух пропускали в течение 2 мин со скоростью 25 л / мин, микробное число в 1 м^3 воздуха будет равным 5000 (250 × 1000 : 50).

Импинджер Дьяконова по своей конструкции похож на поглотители, используемые обычно при санитарно-химическом анализе воздуха. Он представляет собой стеклянный цилиндр с двумя трубками. Одна из трубок погружена в поглощающую жидкость, вторая, более короткая, заканчивается у пробки и не соприкасается с жидкостью. Улавливание микрофлоры осуществляется за счет дросселирования – прохождения пузырьков воздуха через слой жидкости. Скорость пробоотбора в нем невелика – от 4 до 10 л/мин.

В импинджере ПОВ-1 улавливание микроорганизмов происходит в особом пластмассовом стакане, в который вмонтирован специальный пульверизатор. В стакан наливается жидкая питательная среда как поглотитель. При отборе пробы происходит распыление жидкости внутри стакана в виде мельчайшего аэрозоля. При этом площадь контакта воздуха с жидкостью увеличивается в тысячи раз, что позволяет более эффективно улавливать микроорганизмы. Аэрозоль оседает на стенках стакана, стекает вниз и снова диспергируется. Производительность прибора – 20–25 л/мин.

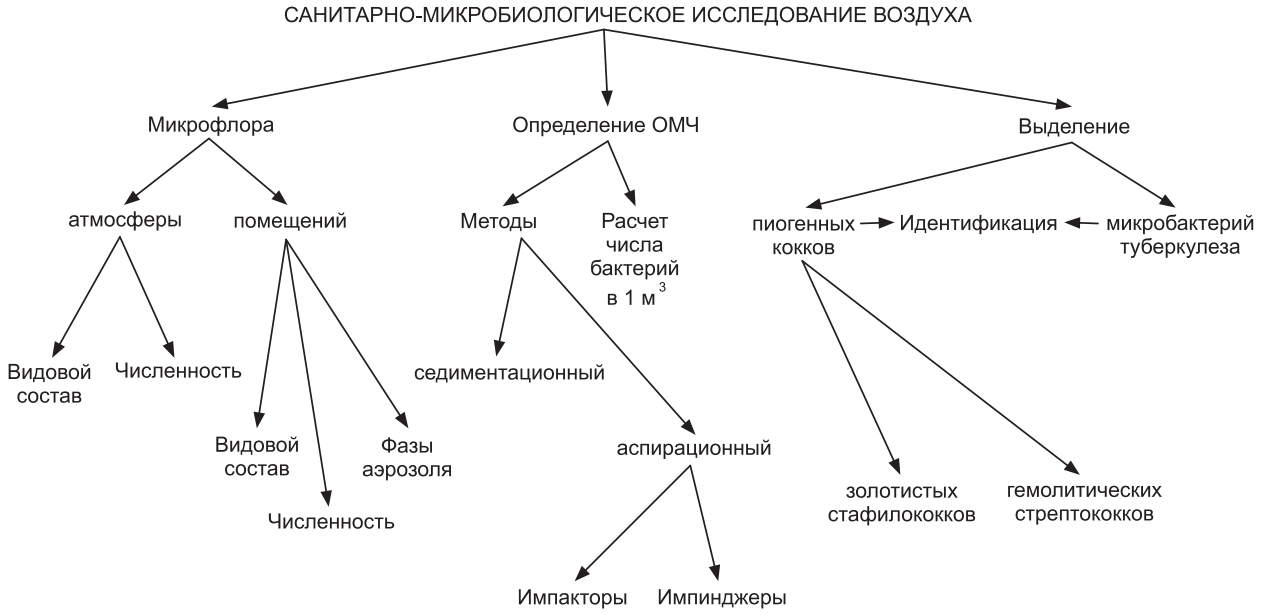
Характер микрофлоры исследуемого воздуха изучают обычным способом: приготовление мазков-препаратов из колоний, выделение чистых культур бактерий и их идентификация.

Определение основных видов патогенных бактерий воздуха

Выделение и идентификация стафило- и стрептококков. Видовую принадлежность стафилококков и стрептококков устанавливают по морфолого-культуральным свойствам.

Выделение стафилококка из воздуха производится на 3–5 %-ном кровяном, молочно-солевом и желточно-солевом агарах (100 мл 6,5–7,5 %-ного солевого агара + 10 % молока или желточной смеси в изотоническом растворе). Засеянные чашки помещают в термостат при 37 °С на 18–24 ч. Спустя сутки на плотных средах золотистые стафилококки образуют средней величины выпуклые непрозрачные колонии гомогенной или мелкозернистой структуры с зоной гемолиза вокруг – на кровяном или зоной помутнения – на желточно-солевом агаре (лецитовителлазная проба).

Для дальнейшего исследования колонии стафилококков пересевают на скошенный агар, а получив на третий день чистую культуру, исследуют плазмокоагуляционную активность, засевая ее в пробирку с цитратной плазмой. В положительных случаях через 2 ч находящаяся в термостате плазма свертывается (см. «Особенности диагностики стафилококковых инфекций»).


САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА
Микрофлора
Определение ОМЧ
Выделение
атмосферы
помещений
Методы
Расчет числа бактерий в 1 м3
пиогенных кокков
Идентификация
микробактерий туберкулеза
Видовой состав
Численность
седиментационный
Видовой состав
Фазы аэрозоля
Численность
аспирационный
золотистых стафилококков
гемолитических стрептококков
Импакторы
Импинджеры

Граф 129

Стрептококки выделяют на кровяном агаре Гарро (МПА + + 3–5 % дефибринированной кроличьей крови + 0,2 мл 0,1 %-ного раствора генцианвиолета на 100 мл среды), на котором через сутки в термостате вырастают мелкие, плоские, суховатые колонии с наличием зоны гемолиза (*S. pyogenes*), зеленой каемки метгемоглобина вокруг них (*S. viridans*) или без них (*S. anhaemolyticus*). При идентификации *S. pyogenes* используют тест чувствительности к бацитрацину, к которому β-гемолитические стрептококки обычно высокорезистентны (см. «Особенности диагностики стрептококковых инфекций»).

Выделение и идентификация микобактерий туберкулеза. Улавливание микобактерий туберкулеза из воздуха производится в импинджерах, а выделение – на среде Левенштейна – Йенсена. Идентификация основана на выявлении в мазках-препаратах из колоний-бородавок конгломератов ярко-красных бактерий, окрашенных по Цилю – Нельсену (см. «Возбудители туберкулеза»).

Микробиологические критерии качества пищевых продуктов

Пищевые продукты – основной фактор передачи возбудителей бактериальных и вирусных кишечных инфекций. Особенно опасны как факторы передачи заразного начала сырое молоко, яйца, салаты, винегреты и другие термически необрабатываемые блюда. В них хорошо размножаются сальмонеллы, шигеллы, стафилококки, стрептококки, не изменяя при этом вкусовых качеств продуктов. На их долю приходится, в частности, более половины всех случаев пищевых токсикоинфекций у людей. Не меньшее эпидемиологическое значение в передаче патогенных микробов имеет мясо животных и птиц. В мясных продуктах обычно обнаруживают энтеробактерии, фекальные энтерококки, клостридии ботулизма, *Bacillus cereus*. Инфицируется мясо прижизненно (*in vivo*) или при забое животных, разделке, транспортировке, хранении и приготовлении мясных продуктов, когда микробы попадают в них с разделочных досок и других кухонных предметов, мясорубок и рук микробоносителей. Таким же образом заражается рыба, крабы, устрицы, в которых могут

содержаться холерные и парагемолитические вибрионы. Наконец, длительно хранящиеся продукты часто обсеменяются сапрофитической гнилостной микрофлорой, вызывающей порчу продуктов. Урон, который она приносит народному хозяйству, неисчислим. По самым скромным подсчетам, он составляет более 10 % от всех непригодных к употреблению продуктов. Характер и интенсивность микробной обсемененности продукта определяется его физико-химическими свойствами. Так, обычно микробы размножаются в продуктах, богатых питательными веществами и ростовыми факторами жидкой и полужидкой консистенции, с нормальным и слабощелочным pH, сладких и полусладких напитках, фаршах и пюре. Плохо выживают – в продуктах с очень низкими и высокими значениями pH; медленно развиваются – в маринованных, засоленных, копченых, сухих и порошкообразных. Низкие и очень высокие температуры, которые используются для консервирования и стерилизации продуктов, неблагоприятно действуют на развитие микроорганизмов.

Самыми опасными инфекциями, передающимися через продукты, являются ботулизм, сибирская язва, туберкулез, ящур, а интоксикациями – плесневые микотоксины.

Санитарно-микробиологический анализ качества пищевых продуктов

Приступая к анализу пищевых продуктов, микробиолог должен знать, что помимо посторонних (неспецифических) патогенных и гнилостных микробов многие из них содержат специфическую микрофлору, придающую свойственный им аромат и вкусовые качества. Например, в приготовлении простокваши, кумыса, творога, сметаны, масла используют молочнокислый и сливочный стрептококки *Lactococcus lactis* и *Streptococcus cremoris*, в изготовлении ацидофилина – *Lactobacillus acidophilus*, для заквашивания кефира – *молочнокислые стрептококки и лактобациллы*, гидролизующие лактозу до кислоты, *молочные и дрожжеподобные грибы*, использующие ее в спиртовом брожении.

Из этого следует, что пищевые продукты – самые сложные объекты санитарно-микробиологических исследований. Они проводятся: 1) *в плановом порядке* – для опреде-

ления качества сырья, используемого в производстве продуктов питания, и контроля за соблюдением санитарно-гигиенического режима в процессе их изготовления, транспортировки, хранения и реализации; 2) *по эпидемическим показаниям* – при возникновении пищевых токсикоинфекций или вспышек инфекционных заболеваний, которые связывают с употреблением пищевых продуктов (см. «Возбудители пищевых токсикоинфекций»).

Основные группы микроорганизмов, которые определяются в пищевых продуктах для оценки их безопасности

Качество пищевых продуктов, в соответствии с действующей СанПиН 2.3.2.560-96, определяют, исследуя в них наличие трех групп микроорганизмов:

1) *санитарно-показательных*, к которым относят **ме**зофильные **а**эробные и **ф**акультативно-**а**наэробные **м**ик-роорганизмы (МАФАМ), образующие в течение 72 ч при 30 °С в глубине и на поверхности плотных питательных сред точечные колонии, и БГКП;

2) *условно-патогенных*, включающих эшерихии, золотистый стафилококк, *B. cereus* и сульфитредуцирующие клостридии, которые вызывают пищевые токсикоинфекции;

3) *микроорганизмов порчи продуктов* (дрожжи, грибы, бактерии рода *Proteus*).

Методы отбора пищевых продуктов для микробиологического анализа. Отбор проб пищевых продуктов регламентируется рядом инструктивных документов. Производится он с помощью стерильных инструментов в стерильную посуду. Объем их определяется нормативно-техническими документами на данный вид продукции. При этом если масса пробы равна массе продукта в потребительской таре, то используют всю упаковку, а если она больше, то берут несколько упаковок. При их отсутствии прибегают к точечному отбору пробы из разных частей (мест) продукта. Отбор проб от кусковой продукции массой более 1000 г ведется с помощью режущих инструментов, а если продукт жидкий или пастообразный, то используют пипетки или металлические половники, которыми его вначале перемешивают. Из емкостей, оснащен-

ных краном, пробы отбирают после предварительного его обжигания и слива 1–10 мл продукта. Сыпучие продукты перед взятием пробы тщательно перемешивают (либо ее составляют из точечных проб). Пробы замороженных продуктов укладывают в изотермическую тару или обкладывают сухим льдом (температура не должна превышать 15 °С). Скоропортящиеся продукты транспортируют при 5 °С. Микробиологические исследования должны быть начаты через 4–6 ч от момента их взятия для анализа.

При этом каждый раз в пищевом продукте (исключая молочнокислые, квас и пиво, имеющие собственную микрофлору) определяют количество МАФАМ, засевая его в питательный агар по 1 см^3 при глубинном методе или по 0,1–0,2 см^3 –при посеве шпателем на поверхность МПА. Общее количество колоний, вырастающих на чашке, должно составлять не менее 15 и не более 300, что требует ориентировочного определения уровня микробной обсемененности продукта для его разведения.

Установив количество МАФАМ в 1 г или 1 см^3 продуктов, далее в них выявляют наличие БГКП или конкретных видов микроорганизмов второй и третьей групп. В частности, *БГКП* и *сальмонеллы* определяют при оценке качества почти всех важнейших пищевых продуктов (исключение составляют чай, кофе, макаронные изделия, соленые и маринованные грибы); *золотистый стафилококк* – в мясных продуктах, молоке, рыбе, кремах, тортах; *сульфитредуцирующие клостридии* – в мясных и рыбных продуктах; *B. cereus* – в овощных изделиях, крупах и картофеле, не требующих варки; *E. coli* – в салатах, заливных и паштетах; *протей* – в меланже, яичном порошке, салатах, студнях, заливных и паштетах, отварном мясе, отварной и жареной рыбе; *плесени и дрожжи* – в сырах, закваскахъ, рыбных изделиях, сладостях, кремах, тортах, специях, пряностях, чае, кофе, майонезе, маргарине, хлебном квасе, других напитках. При этом, согласно СанПиН 2.3.2.560-96, для разных видов продуктов нормируется отсутствие: БГКП – в 0,001–1,0 г; эшерихий – в 0,1–1,0 г; золотистого стафилококка – в 0,01–1,0 г; сульфитредуцирующих клостридий – в 0,01–0,1 г; *B. cereus* – в 0,1 г, сальмонелл и иерсиний – в 25 г.

Обнаружение в пищевых продуктах *протея* свидетельствует об их загрязнении гниющими органическими ве-

ществами (*Proteus vulgaris*) или фекалиями (*P. mirabilis*). Продукты, содержащие в 1 г бактерии рода *Proteus*, выбраковываются.

При подозрении на содержание в продуктах токсинов определяют наличие в них микотоксинов и ботулотоксина плесневых грибов

Определение микотоксинов в пищевых продуктах. Микотоксины (МТ) – вторичные токсические метаболиты плесневых грибов, обладающие высокоспецифическим тропизмом к различным тканям, органам, нервной, эндокринной и иммунной системам. Отличаются они также тератогенностью и мутагенностью. Известно около 100 различных МТ. Продуцируют их более 200 видов плесневых грибов, преимущественно виды трех родов – *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Наибольшее значение в патологии человека имеют афлатоксин В1 (*A. flavus*), зеараленон (*Fusarium*) и патулин (*Penicillium*), накапливающиеся, главным образом, в продовольственном сырье и пищевых продуктах растительного происхождения, орехах и семенах масличных (афлатоксин В1), фруктах и овощах (патулин). По СанПиН 2.3.2.560-96, ПДК в них для афлотоксина В1 составляет 0,001 мг/кг, для патулина – 0,05 мг/кг, а для зеараленона – 1 мг/кг. Определение ПДК в продовольственном сырье и пищевых продуктах возможно только с использованием физико-химических методов анализа, включающих экстракцию МТ органическими растворителями с последующей идентификацией. Если для скрининга МТ можно использовать тонкослойную хроматографию, то их идентификация и количественное определение требуют применения спектрофотометрии и спектрофлюорометрии с учетом спектров адсорбции и флюоресценции МТ. Наиболее чувствительными для этих целей являются газо-жидкостная хроматография, инфракрасная спектрофотометрия, масс-спектрометрия, ядерно-магнитный резонанс, а также радио- и иммуноферментный методы.

Определение ботулотоксина в пищевых продуктах. Ботулотоксин определяют чаще всего в консервированных продуктах. При этом экстракты подозрительных продуктов, взятых из стеклянных банок и металлической тары с признаками бомбажа, смешивают с равными объемами антитоксических сывороток, выдерживают в термостате при

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ
Продукты как факторы передачи
инфекций
интоксикаций
Микрофлора
постороняя
патогенная
гнилостная
специфическая
Цели исследования
в плановом порядке
качества продуктов
соблюдения санитарно-гигиенического режима
Выявление по СанПиН 2.3.2.560-96
СПМ
МАФАМ
БГКП
видов, вызывающих токсикоинфекции
микробов порчи продуктов
по эпидемическим показателям
Методы отбора продуктов
жидких
плотных
в таре и упаковках
Обсеменение различных продуктов
конкретными видами микробов
Нормирование согласно СанПиН
Определение
микотоксинов (ПДК)
ботулотоксина
зеараленона
патулина
афлотоксина

Граф 130

30–35 °С в течение 30 мин и вводят по 1,5 мл внутрибрюшинно двум белым мышам или по 6 мл подкожно морским свинкам. Контрольных животных инфицируют интактными вытяжками. Эксперимент длится 5 дней. Опытные животные, получившие пищевые экстракты, в которых ботулотоксин нейтрализован специфической сывороткой, выживают. Мыши, зараженные нативным экстрактом, погибают при явлениях парезов мышц живота с формированием «осиной талии», а свинки – с развитием «симптома спины» (см. «Возбудитель ботулизма»).

Санитарно-микробиологическое исследование поверхностей

В распространении патогенных микроорганизмов большую роль как факторы передачи играют предметы обихода и производственной обстановки. Для выявления степени их обсемененности патогенной микрофлорой в лечебно-профилактических и учебных учреждениях, предприятиях общественного питания, пищевой, фармацевтической и микробиологической промышленности делают смывы с поверхностей предметов и их отпечатки на плотные питательные среды.

Метод смывов с предметов

Смывы с предметов позволяют определить как сам факт присутствия искомых микроорганизмов на определенной площади, так и их количество. Их берут с помощью смоченного стерильным изотоническим раствором хлорида натрия ватного тампона на деревянной ручке или марлевой салфетки размером 5 × 5 см, которую удерживают пинцетом либо корнцангом. С мелких предметов смыв делают со всей поверхности, и если они одинаковы, то одним тампоном или салфеткой с нескольких подряд. При исследовании крупных объектов площадью не менее 100–200 см^2 используют специальные жестяные или проволочные трафареты. После взятия смыва тампоны и салфетки помещают в пробирки с изотоническим раствором или питательной средой и тщательно встряхивают для десорбции микроорганизмов. Более полной десорбции дос-

тигают, встряхивая тампоны или салфетки в конических колбах со стеклянными бусами.

При выявлении колиформных бактерий тампон и смывную жидкость засевают в среду Кесслера, ингибирующую постороннюю микрофлору (1 %-ная пептонная вода с лактозой, желчью, генцианвиолетом и поплавком для улавливания газа); для выделения энтеробактерий и псевдомонад – в 0,1 %-ную пептонную воду с последующим высевом на среду Эндо; для индикации стафилококков – на желточно-солевой агар (тампон) и в 6,5 %-ный солевой бульон (смывная жидкость).

При исследовании разных поверхностей методом смывов нужно иметь в виду, что прочность сорбции микроорганизмов на них неодинакова, вследствие чего при низком уровне их микробного загрязнения велика вероятность, что бактерии не будут сняты с предметов. В этих случаях тампоны и салфетки пропитываются раствором поливинилового спирта. Количество жизнеспособных микроорганизмов в смывной жидкости определяют, засевая ее в питательный агар с последующим подсчетом выросших колоний.

Метод отпечатков поверхностей предметов на плотные среды

В санитарно-микробиологических исследованиях отпечатки поверхностей предметов чаще всего делают на мембранные фильтры и контактные чашки Петри «Бактотест».

Для производства отпечатков на мембранных фильтрах по Л.И. Адельсон вначале их кипятят и погружают в растопленные и охлажденные до 60–65 °С питательные агары, быстро перенося пинцетом на исследуемую поверхность предмета. Спустя 2–3 мин агаровый фильтр помещают отпечатком вверх на среду Эндо, желточно-солевой агар, другие среды в чашках Петри, которые инкубируют в термостат. На следующие сутки подсчитывают число выросших на них колоний. Агаровые мембранные фильтры упрощают процедуру обнаружения жизнеспособных бактерий, а главное, позволяют обнаружить их на разных по конфигурации предметах.

Контактные чашки Петри «Бактотест» представляют собой круглые пластмассовые чашечки площадью 10 см^2. При использовании их для взятия отпечатков они заранее

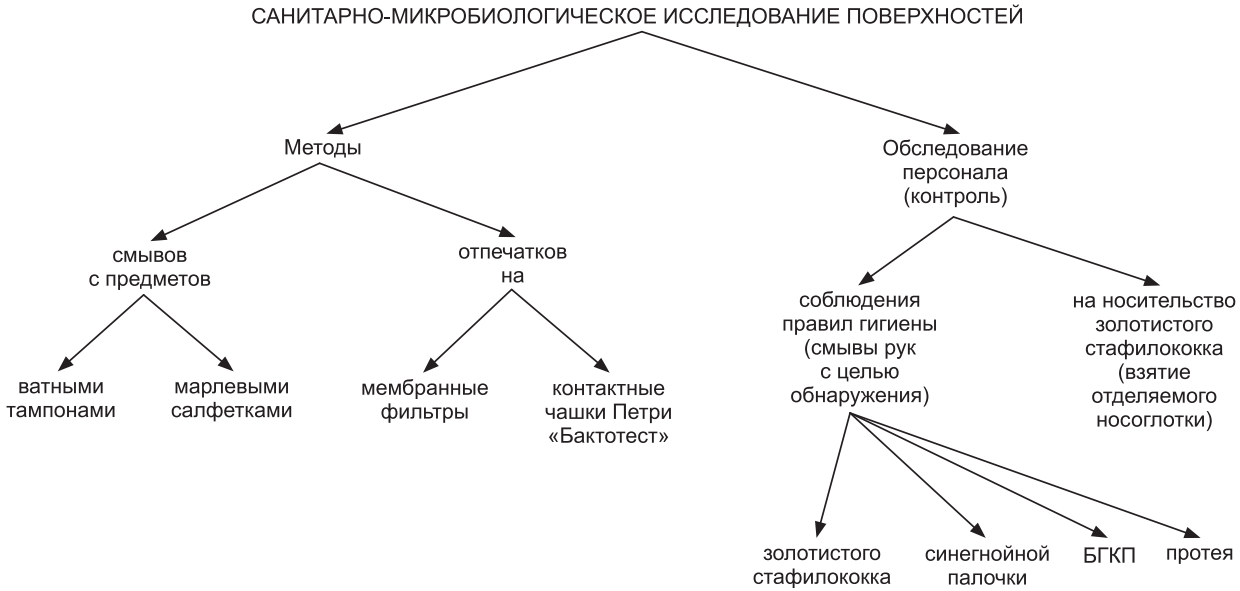
заполняются плотной питательной средой, закрываются крышками и хранятся в таком виде в течение 4 сут. При взятии ими отпечатка снимают крышку, прижимая к поверхности предмета питательную среду. Закрыв «Бактотест», его инкубируют в термостат. С поверхности крупных предметов одной контактной чашкой «Бактотест» берут 10 отпечатков, при исследовании мелких предметов – 2–3 объекта.

Обследование обслуживающего персонала при контроле соблюдения им правил общественной гигиены и на микробоносительство

Бактериологические лаборатории призваны обследовать не только объекты окружающей среды, предметы бытовой, производственной обстановки, но также персонал лечебно-профилактических учреждений, столовых, ресторанов, продовольственных магазинов и др. При этом у лиц, обслуживающих их, с целью предупреждения эпидемиологически опасных ситуаций берут смывы с рук и отделяемое верхних дыхательных путей.

Смывы с рук выполняют марлевой салфеткой, тщательно протирая ею ладони, околоногтевые и межпальцевые пространства. После забора смывов салфетки помещают в пробирки или колбы со стеклянными бусами и стерильной водой или изотоническим раствором. Отмыв их, по 0,5 мл смывной жидкости засевают в две пробирки с 5 мл жидкой питательной среды либо по 0,2 мл – на две чашки Петри с питательным агаром. При соблюдении обслуживающим персоналом гигиенических норм поведения и противоэпидемических мер в засевах не должны находиться золотистый стафилококк, синегнойная палочка, протеи и БГКП.

Отделяемое верхних дыхательных путей берется при определении носительства золотистого стафилококка. При этом исследованию подвергается слизь из передних отделов носа, зева и миндалин. Снятие ее проводят натощак или не ранее чем через 2–3 ч после еды сухим или увлажненным стерильным тампоном. Засевают слизь на желточно-солевой или молочно-солевой агары непосредственно тампоном, а при его отжатии в стерильном изотоническом растворе – шпателем, распределяя по их поверхности 0,1 мл суспензии. Массивность обсеменения носоглотки стафилококком определяют через 24 ч, подсчитывая число выросших на чашках колоний.


САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТЕЙ
Методы
Обследование персонала (контроль)
смывов с предметов
отпечатков на
соблюдения правил гигиены (смывы рук с целью обнаружения)
на носительство золотистого стафилококка (взятие отделяемого носоглотки)
ватными тампонами
марлевыми салфетками
мембранные фильтры
контактные чашки Петри «Бактотест»
золотистого стафилококка
синегнойной палочки
БГКП
протея

Граф 131

ПРИЛОЖЕНИЕ

Устройство, оснащение и правила работы в микробиологических лабораториях

По своему назначению различают бактериологические, вирусологические, иммунологические и специально предназначенные для диагностики особо опасных инфекций лаборатории. В каждой из них имеются: 1) препараторская для подготовки лабораторной посуды, приготовления питательных сред и производства других вспомогательных работ; 2) автоклавная; 3) боксы с бактерицидными лампами для взятия материала от больных или носителей и проведения микробиологических исследований; 4) виварий для содержания подопытных животных. Лаборатория оборудуется приточно-вытяжной вентиляцией и противопожарными устройствами.

Помещения лабораторий должны быть удобными для влажной уборки и дезинфекции, в частности, панели окрашиваются светлой масляной краской, полы покрываются линолеумом, а столы – специальной эмалью.

Основным оборудованием лаборатории являются микроскопы, термостаты, холодильники, аппараты для стерилизации (автоклав, сухожаровой шкаф, свертыватель), центрифуга и дистилляционный аппарат.

В вирусологических лабораториях создают боксы с предбоксниками. Кроме обычного оборудования их оснащают ультратермостатом, гомогенизатором для измельчения тканей, магнитной мешалкой, центрифугой с охлаждением для очистки и концентрации вирусов, холодильником для их хранения при температуре – 20–70 °С, аппаратом для вакуумного высушивания материалов.

Иммунологические лаборатории оснащают посудой, приборами, реактивами, диагностикумами и аллергенами для серологических реакций.

Персонал микробиологических лабораторий обеспечивают халатами, косынками и шапочками, марлевыми масками, клеенчатыми передниками, нарукавниками, резиновыми перчатками, противочумными костюмами для индивидуальной защиты. В процессе микробиологических исследований необходимо соблюдать строгий санитарно-противоэпидемический режим, исключающий внутрилабораторное заражение. При случайном попадании исследуемого материала или культуры микроорганизмов на руки, стол, халат или обувь следует немедленно провести их дезинфекцию.

После окончания работы питательные среды с посевами ставят в термостат, музейные культуры – в сейфы-холодильники. Столы протирают дезинфицирующим раствором и тщательно моют руки.

После вскрытия инфицированных животных инструменты и шприцы подвергаются стерилизации, отработанные материалы и трупы сжигают или автоклавируют.

СОДЕРЖАНИЕ

РАЗДЕЛ I. **ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ** 5

Микробиология как наука и этапы ее развития 5
Систематика и номенклатура микроорганизмов 15
Микроскопические методы исследования 20
Морфология и ультраструктура прокариот 28
Морфология и ультраструктура эукариот 48
Вирусы 55
Основы экологии микроорганизмов 72
Физиология микроорганизмов 90
Питание и размножение бактерий 136
Культивирование и репродукция вирусов 161
Фаги (бактериофаги) 170
Генетика микроорганизмов 182
Антибиотики 233
Инфекция (основные понятия) 244
Иммунитет (основы иммунологии) 259
Иммунопатология 333
Реакции иммунитета и их практическое использование 378
Экологическая иммунология 407

РАЗДЕЛ II. **МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ** 414

Возбудители бактериальных инфекций 414
Общая характеристика патогенных риккетсий и риккетсиозов 582
Патогенные хламидии 592
L-трансформанты и микоплазмы 599
Лабораторная диагностика вирусных инфекций человека и животных 606
Возбудители вирусных инфекций 619
Антропонозы 619
Зооантропонозы 662
Экология вирусов 697
Иммунные реакции при протозойных инвазиях и их лабораторная диагностика 702
Иммунные реакции при микозах и их лабораторная диагностика 731
Основные возбудители микозов человека 735
Внутрибольничные инфекции 751
Санитарная микробиология 763
Санитарно-микробиологическое исследование воды 766
Санитарная микробиология почвы 776
Санитарно-микробиологическое исследование воздуха . . . 782
Микробиологические критерии качества пищевых продуктов 788
Санитарно-микробиологическое исследование поверхностей 794

Приложение 798

Учебное издание

Павлович Сергей Александрович

МИКРОБИОЛОГИЯ С ВИРУСОЛОГИЕЙ И ИММУНОЛОГИЕЙ

Учебное пособие

3-е издание, исправленное

Редактор *А.В. Новикова*
Художественный редактор *В.А. Ярошевич*
Технический редактор *Н.А. Лебедевич*
Корректоры *Т.К. Хваль*, *В.П. Шкредова*, *Е.В. Савицкая*
Компьютерная верстка *Н.В. Шабуни*, *М.В. Бригер*

Подписано в печать 08.02.2013. Формат 84×108/32. Бумага офсетная. Гарнитура "Школьная". Офсетная печать. Усл. печ. л. 42. Уч. изд. л. 45,03.
Тираж 1500 экз. Заказ 67.

Республиканское унитарное предприятие «Издательство "Вышэйшая школа"».
ЛИ № 02330/0131768 от 06.03.2006. 220048, Минск, проспект Победителей, 11.
e-mail: market@vshph.com http://vshph.com

Открытое акционерное общество «Полиграфкомбинат им. Я.Коласа».
ЛП № 02330/0150496 от 11.03.2009. Ул. Корженевского, 20, 220024, Минск.