***Занятие 6***

Методы культивация вирусов, риккетсий и хламидий. Бактериофаги их применение. Экология микроорганизмов. Микрофлора окружающей среды и организма человека. Микрофлора лекарственного сырья и готовых лекарственных препаратов. Генетика микроорганизмов.

**Вирусы, риккетсии и хламидии – как облигатные внутриклеточные паразиты.**

* Вирусы, риккетсии и хламидии являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами размножаются только внутри клетки хозяина и не культивируются на искусственных питательных средах
* **Размножение риккетсий** происходит путем бинарного деления внутри клетки хозяина ( в ядре и цитоплазме)
* **Размножение хламидий** происходит внутри клетки хозяина и характеризуется уникальным циклом развития
* **Размножение вирусов** внутри клетки хозяина происходит путем репродукции.

**Репродукция вирусов.** При проникновении вируса в организм, он размножается не во всех клетках, а только внутри чувствительных к каждому типу вируса клеток. Взаимодействие вирусов с чувствительными клетками происходит в несколько этапов

**Этапы репродукции:**

* **Адсорбция вириона**
* **Проникновение вириона внутрь клетки хозяина** (*эндоцитоз-виропексис, слияние мембраны клетки с оболочкой вириона*)
* **«Раздевание», депротеинизация вириона**
* **Репликация вирусных нуклеиновых кислот и синтез вирусных белков**
* **Формирование вириона**
* **Выход вириона из клетки** ( *лизис клетки хозяина, «почкование»)*

**Особенности репродукции ДНК- и РНК- содержащих вирусов.**

* ***ДНК*-содержащие:**

вирусная ДНК иРНК синтез вирусных белков

* **Плюс-нитевые *РНК*-содержащие вирусы**:

вирусная РНК - синтез вирусных белков

* **Минус-нитевые *РНК*-содержащие вирусы** :

вирусная РНК - иРНК - синтез вирусных белков

* **Ретровирусы**:

вирусная РНК - комплементарная ДНК - иРНК - синтез вирусных белков

**Типы взаимодействия вирусов с клеткой хозяина.**

* **Продуктивная инфекция**- репродукция
* **Абортивная инфекция**– частичная репродукция
* **Интегративная инфекция**– интеграция (вирогения)

**Основные принципы культивирования вирусов.**

* **В организме лабораторных животных**
* **В куриных эмбрионах**
* **В клеточных (тканевых) культурах**

**Культивирование вирусов в организме лабораторных животных.**

При вирусологических исследованиях с этой целью используют новорожденные ***лабораторные животные*** (белые мыши, крысы, кролики, обезьяны и др.). При заражении лабораторных животных различными способами (подкожно, внутримышечно, внутривенно, интраназально, внутрибрюшинно и т.д.) необходимо учитывать тропизм вирусов. Использование лабораторных животных в настоящее время весьма ограничено из-за видовой невосприимчивости животных к вирусам человека, контаминации животных посторонними микробами, а также по экономическим и этическим соображениям.

**Культивирование вирусов в куриных эмбрионах.**

***Куриные эмбрионы*** являются благоприятной моделью для культивирования вирусов из за возможности накопления в них большого количества вирусов, стерильности и доступной техники работы с ними и др. Обычно используют 6-12 дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ). Однако возможна контаминация куриных эмбрионов латентной вирусной или бактериальной инфекцией.

**Заражение куриных эмбрионов.**

* Выбирают выдержанные в холодильнике не более 10 дней оплодотворенные яйца с не пигментированной и чистой скорлупой (мыть нельзя). Определяют жизнеспособность зародыша овоскопированием; живой эмбрион подвижен, видна пульсация сердца.
* Куриные эмбрионы заражают в асептических условиях. Перед заражением скорлупу эмбрионов обрабатывают 70% этиловым спиртом, протирают йодом, а иногда еще и фламбируют.
* Выбор метода заражения определяется тропизмом вируса. Наиболее часто используют заражение в аллантоисную полость и на хорионаллантоисную оболочку, реже – в амниотическую полость и в желточный мешочек.
* В скорлупе выше границы (заранее очерченной карандашом) воздушной камеры делают отверстие диаметром около 1 мм. Инъецируют инфицирующую жидкость в объеме 0,1-0,2 мл, введением иглы на глубину не более 2-3.
* После инъекции вируссодержащего материала иглу извлекают, а отверстие в скорлупе закрывают каплей расплавленного парафина
* Вскрывают зараженный эмбрион через 48-72 ч инкубации, в период максимального накопления вирусов.

**Вскрытие зараженных эмбрионов.**

* Перед вскрытием скорлупу обрабатывают йодированным спиртом. Скорлупу срезают вышеобозначенных границ над воздушной камерой стерильными инструментами. При этом яйцо держат под некоторым углом, чтобы скорлупа не упала внутрь.
* После удаления скорлупы, осматривают ХАО приподнимая ее пинцетом, с целью установления в ней патологоанатомических изменений (геморрагии, белесые пятна). Часть ХАО, на которую был нанесен вируссодержащий материал, имеет обычно наиболее выраженные изменения.

**Методы индикации вирусов в зараженном курином эмбрионе.**

Показателем заражения эмбриона вирусом может служить:

* Гибель эмбриона
* Появление на хорионаллантоисной оболочке (ХАО) некротических участков, узелков (оспин).
* Реакция гемагглютинации с амниотической и аллантоисной жидкостью

**Исследование зараженной ХАО.**

* Для более тщательного осмотра ХАО приподнимают пинцетом и срезают ножницами.
* Для осмотра и взятия всей ХАО удаляют зародыш, желточный мешок и белок, а хорионаллантоисную оболочку отслаивают от внутренней поверхности скорлупы, извлекают и переносят в стерильную чашку Петри с физиологическим раствором. Оболочку отполаскивают, а затем двумя пинцетами расправляют так, чтобы она лежала в один слой и могла быть осмотрена по всей поверхности.
* Для того чтобы патологоанатомические изменения оболочки были видны более отчетливо, под чашку Петри подкладывают лист черной бумаги.

**Получение амниотической и аллантоисной жидкости.**

* Аллантоисную жидкость отсасывают пипеткой, которой прокалывают подскорлупную оболочку и ХАО. Ставят бактериологический контроль вируссодержащего материала посевом на МПБ, или сахарный бульон. Обнаружение вируса в материале проводят с помощью реакции гемагглютинации (РГА) и сохраняют в замороженном состоянии при -40C
* Взятие амниотической жидкости проводят после удаления аллантоисной жидкости. Для этого пипетку вводят в амнион между головой и телом зародыша и отсасывают пастеровской пипеткой.

**Реакции гемагглютинации с амниотической и алантоисной жидкостью.**

* Обнаружение вируса в аллантоисной и амниотической жидкостях зараженного эмбриона проводят постановкой ***реакции гемагглютинации.***
* Реакция основывается на способности антигенов некоторых вирусов ( гемагглютининов) агглютинировать (склеивать) эритроциты животных и используется при индикации вирусов

**Техника реакции гемагглютинации.**

* После вскрытия  амниотическую и  аллантоисную жидкость  разливают в пробирки или лунки плексигласовой пластины в объеме 0,5 мл (для контроля берут 0,5 мл такой же жидкости незараженного эмбриона).
* Затем добавляют по 0,2 мл 1% суспензии отмытых куриных эритроцитов и выдерживают при комнатной температуре.
* Результаты реакции учитывают через 40 мин после оседания эритроцитов; (++++) выраженная гемагглютинация — тонкая пленка из склеившихся эритроцитов на дне пробирки;
* (+++) – наличие просветов в пленке;
* (++) – наличие пленки из склеившихся эритроцитов с фестончатыми краями;
* (+) - хлопьевидный осадок эритроцитов, окруженный зоной комочков агглютинированных эритроцитов;
* - резко очерченный осадок эритроцитов неотличимый от контроля
* Наличие гемагглютинации в опытных пробирках при ее отсутствии в контрольных указывает на содержание вируса в исследуемой жидкости

**Реакция торможения гемагглютинации.**

* Используется при идентификации некоторых вирусов

( гриппа, кори, клещевого энцефалита и др.)

* Для определения вида вируса в исследуемом материале к нему добавляют сыворотку содержащую антитела к определенному виду вируса
* При наличии вируса в исследуемом материале, комплементарные к нему антитела инактивируют вирус и гемагглютинация эритроцитов не происходит

**Культивирование вирусов в культуре клеток (тканей).**

* Клеточная (тканевая) культура состоит из отдельных клеток органа или ткани, которые способны воспроизводить свои жизненно важные функции в питательных средах.
* Клетки, полученные из различных органов и тканей человека, животных, птиц и др. биологических объектов, размножают вне организма на искусственных питательных средах.

**Культивация вирусов в культуре клеток (тканей).**

* **Клеточные (тканевые) культуры:**

1. однослойные
2. суспензионные
3. органные

* **Однослойные культуры клеток**

1. Первичные культуры клеток
2. Перевиваемые (стабильные) культуры клеток
3. Полуперевиваемые культуры клеток

**Первичные культуры клеток.**

* Первичные культуры клеток получают путем обработки кусочков тканей животных или человека протеолитическими ферментами.
* Образующиеся путём дезинтеграции клетки оседают, прикрепляются и распластываются на поверхности стекла или пластика.
* После того, как первичная культура достигнет состояния монослоя, она может быть пересеяна или субкультивирована во второй культуральный сосуд трипсином или раствором Версена. Первичные культуры клеток способны размножаться ограниченное количество раз, и поэтому выдерживают не более 5-10 пассажей.

**Первичные культуры клеток.**

* Первичные культуры клеток получают из эмбриональной ткани человека или животных, так как именно эмбриональные клетки обладают высокой потенцией роста и размножения.
* Часто культуры клеток содержат смесь нескольких типов тканей, н-р, кожной, костной мышечной.
* По такому принципу изготавливают культуры фибробластов эмбриона человека(ФЭЧ) и фибробластов эмбриона кур (ФЭК), клетки почек человека (HEK) и т.д. При получении таких культур используют ткани эмбриона человека (после абортов) или 8-12-дневные куриные эмбрионы.
* Культивирование клеток проводится в стеклянной или пластиковой посуде со строгим соблюдением правил асептики

**Перевиваемые культуры клеток.**

* *Перевиваемые (стабильные) культуры клеток* способны размножаться неопределенно длительное время (десятки лет), т.е. выдерживают многочисленные пассажи
* Их получают главным образом из опухолевых или эмбриональных тканей обладающих большой потенцией роста
* Получены и наиболее широко в вирусологической практике применяются следующие линии перевиваемых клеток: (А-0, А-1, FL) – из культуры клеток амниона человека, HeLa —из карциномы шейки матки; Hep-2 — из карциномы гортани; Детройт-6 — из метастаза рака легкого в костный мозг; RD — из рабдомиосаркомы человека

**Диплоидная (полуперевиваемая) линия клеток.**

* *Диплоидная клеточная линия* -это клеточная линия, в которой более 75% клеток имеют кариотип нормальных клеток исходного вида.
* Многие из этих культур способны сохранять диплоидный набор хромосом даже после 50-80 и более пассажей
* Для получения диплоидной линии клеток используют фибробласты, выделенные из эмбриональной ткани человека и животных.

**Питательные среды, используемые для выращивания культур клеток консистенция.**

* Среды содержат полный набор аминокислот, витаминов и ростовые факторы.
* Наряду с сухими средами и готовыми компонентами выпускают готовые жидкие среды (199, Игла, гидролизат лактальбумина, сухие среды и концентраты)
* Среды подразделяют на ростовые и поддерживающие. Для выращивания клеточных культур применяются ростовые среды обогащенные сыворотками человека и животных (н-р, бычью сыворотку, эмбриональную телячью сыворотку и пр.) Содержание сыворотки в среде может составлять 2 - 30%
* В среды добавляют феноловый красный, который в кислой среде приобретает желто-оранжевый, а в щелочной - малиновый ( темно-красный) цвет.

**Методы индикации вирусов в культуре клеток.**

Размножение вирусов в культуре клеток не всегда сопровождается видимым эффектом. О репродукции вирусов в культуре клеток, зараженных вируссодержащим материалом можно судить на основании ***феноменов***

* Цитопатогенное действие (ЦПД), внутриклеточные включения (тельца), феномен гемадсорбции, «негативные колонии», «цветная проба». В процессе репродукции в культуре клеток некоторые вирусы оказывают *цитопатогенное действие (ЦПД),* то есть дегенерацию клеток. ЦПД проявляется вакуолизацией цитоплазмы клеток, разрушением митохондрий, округлением и гибелью клеток. Характер ЦПД позволяет использовать этот феномен для индикации и идентификации вирусов. ЦПД может отличаться у разных видов вируса

**Внутриклеточные включения.**

Некоторые вирусы можно обнаружить и идентифицировать повнутриклеточным включениям, которые образуются в ядре или цитоплазме зараженных клеток. Включения могут отличаться по величине (0,2-25 мкм), форме (округлые или неправильные) и численности. Они представляют собой скопления вирусных частиц, и выявляются при окраске по методу Гимзы или флюорохромами.

**«Цветная проба».**

* О репродукции вирусов в культуре клеток можно судить по ***«цветной реакции».*** Для этого используют культуры клеток, растущие на средах содержащих индикаторы (н-р, метиловый красный)
* При репродукции вирусов в культуре клеток нарушается их нормальный метаболизм (клетки погибают) и среда сохраняет первоначальный цвет.
* Если вирусы не размножаются в культуре клеток, то живые клетки выделяют кислые метаболиты, изменяющие рН и соответственно цвет индикатора в среде.

**Феномен гемадсорбции.**

* ***Феномен гемадсорбции*** еще один метод, используемый для индикации вирусов в культуре клеток. Феномен основан на способности культур клеток, инфицированных вирусами адсорбировать на своей поверхности эритроциты. Н-р, на поверхности парамиксо-, и ортомиксовирусов находятся гемагглютинины, способствующие гемадсорбции.
* Механизмы реакции гемадсорбции и гемагглютинации сходны.

**«Негативные колонии».**

* Размножение некоторых вирусов в культуре клеток приводит к гибели определенных участков и формированию ***«негативных колоний»,*** что также используют при индикации вирусов.
* Добавление агара в питательную среду ограничивает распространение вирусов по всему монослою клеток , в результате очаги некроза оказываются ограниченными друг от друга .
* Пораженные участки ( погибшие клетки) выглядят в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток.

**Феномен интерференции.**

* Для обнаружения вирусов, не дающих отчетливого ЦПД в культуре клеток используется ***феномен интерференции.*** Феномен интерференции - это явление когда клетка инфицированная одним вирусом становится устойчивой к заражению другим вирусом
* Например,  вирус краснухи размножается в ряде культур клеток без ЦПД и выявляется по феномену интерференции при заражении первичной культуры клеток другими цитопатогенными вирусами
* В качестве индуктора для суперинфекции используют вирус везикулярного стоматита, размножение которого в культуре клеток всегда сопровождается развитием ЦПД. Вследствие размножения вируса краснухи в культуре клеток, размножение вируса везикулярного стоматита не сопровождается видимым ЦПД, что свидетельствует о феномене интерференции. Если же вирус краснухи не размножается в культуре клеток, то размножение везикулярного стоматита в культуре клеток будет сопровождаться видимым ЦПД

**Реакция нейтрализации вирусов.**

* ***Реакция нейтрализации вирусов*** (биологической нейтрализации) используется при идентификации вирусов.
* Под действием нейтрализующих антител вирусы утрачивают способность вызывать заболевания у лабораторных животных, вызывать ЦПД в культуре клеток и тканей и размножаться в куриных эмбрионах.

**Бактериофаги.**

* Фаги широко распространены в природе, способны паразитировать в клетках бактерий и других микроорганизмов, способствуя их гибели (лизису).
* В 1917 г фр. ученый Ф.Д’Эрелль наблюдал, что при добавлении фильтрата испражнений больного дизентерией к бульонной культуре дизентерийных бактерий происходит их полный лизис.
* Ф.Д’Эрелль сделал заключение, что наблюдаемый им литический агент, проходящий через бактериальные фильтры, является вирусом бактерий, и назвал их ***«бактериофагом»*** (пожиратель бактерий).

**Строение бактериофагов.**

* Размеры фагов колеблются от 20 до 800 нм. Их подразделяют на несколько морфологических типов: нитевидные, кубические, сперматозоидной формы и т.д.
* Наиболее изучены колифаги Т ( от англ. *typе* – типовые). Существуют 7 представителей фагов Т группы, среди которых есть одиночные (T1, T3, T5, T7) и парные фаги (T2, T4, T6).
* Т2 фаги имеют наиболее сложное строение

**Характер взаимодействия с бактериальной клеткой.**

* В зависимости от типа взаимодействия с бактериальной клеткой различают **вирулентные** и **умеренные** бактериофаги
* В результате взаимодействия **вирулентных фагов** с бактериальной клеткой происходит ***лизис*** бактерий
* Данный процесс характеризуется просветлением бульонной культуры, т.е. образованием фаголизата. В культурах, растущих на плотной питательной среде участки лизиса бактерий проявляются в виде ***негативных колоний фага.***

**Взаимодействие вирулентных фагов с бактериальной клеткой.**

1. Адсорбция фагов на бактериальной клетке
2. Проникновение нуклеиновой кислоты фага внутрь бактериальной клетки
3. Репликация нуклеиновой кислоты и синтез белков фага
4. Формирование фаговой частицы
5. Выход фага из бактериальной клетки
6. После проникновения умеренного фага в бактериальную клетку ДНК фага встраивается в хромосому бактерии и существует вместе с ней, то есть развивается ***интегративная*** инфекция. Гибель клетки при этом не происходит.
7. ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии, называется ***профагом.***
8. Подобное сосуществование бактерии и умеренного бактериофага называется ***лизогенией,*** а культура бактерии, зараженная таким фагом - ***лизогенной***
9. Профаги некоторой части лизогенных бактерий могут исключаться из хромосом и переходить в вегетативное состояние. Этот процесс заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий
10. Превращение умеренного фага в вирулентный возможно под действием различных факторов, н-р, ионизирующего излучения, УФ-лучей и т.д.

**Дефектные фаги.**

* ***Дефектные фаги*** образуются в результате фрагментации бактериальной ДНК после фаговой инфекции и встраивания кусочка бактериальной ДНК в ДНК фага.
* Дефектные фаги, несущие в геноме частичку бактериальной ДНК при встраивании в геном могут придавать бактерии новые (морфологические, культуральные, биохимические, токсигенные и др.) свойства. Этот феномен изменения свойств под влиянием профага называется ***фаговой*** или ***лизогенной конверсией.***
* Н-р, токсигенность возбудителя дифтерии обусловлена наличием гена  *tox*, источником которого является лизогенный бактериофаг в интегрированном в хромому состоянии.
* Дефектные бактериофаги используют в качестве вектора в генной инженерии

**Получение бактериофагов.**

* Исследуемый материал ( воду, испражнения, раневое отделяемое) суспендируют и фильтруют. Фильтрат и гомологичную тест-культуру инокулируют в питательный бульон и инкубируют при 370C 18-24 ч.
* Затем инокулят центрифугируют и фильтруют с целью очищения от бактерий
* Фильтрат и тест культуру засевают на агар в чашки, и инкубируют. По мере роста бактериальной культуры на агаре наблюдается появление пятен (негативных колоний).
* Материал взятый из негативных колоний переносят в пробирку с бульоном, к нему добавляют тест-культуру и инкубируют. Фаги размножающиеся внутри бактерий вызывают их лизис , в пробирке получают фаголизат, состоящий из многочисленных фагов и полностью освобожденный от бактерий.

**Определение чувствительности бактерий к фагам основывается на строгой специфичности их действия**

* **Применение диагностических (известных) фагов позволяет идентифицировать неизвестную культуру микробов**
* **Исследуемую бактериальную культуру засевают газоном на поверхности плотной питательной среды в чашке Петри. Затем на поверхность агара наносят суспензию известного фага, и наклонив чашку способствуют растеканию жидкости. Чашки инкубируют в термостате.**
* **Чувствительность исследуемой культуры к фагу судят по наличию или отсутствию зоны лизиса в области контакта с фагом**

**Определение фаготипа (фаготипаж).**

Фаготип бактерий определяют с целью выявления источника инфекции

* Испытуемую суточную бульонную культуру засевают на плотную питательную среду в чашку Петри, задняя поверхность которой разграничена на квадраты.
* На каждый квадрат наносят по одной капле различных типоспецифических фагов пастеровской пипеткой
* После суточной инкубации просматривают чашку, отмечая те квадраты, в которых наблюдается лизис бактерий. Фаготип бактериальной культуры определяется тем типом фага, который вызвал лизис.
* Для определения активности бактериофаг титруют
* Титр бактериофагов определяют по методам Аппельмана и Грациа.

**Практическое применение фагов.**

* **Специфичность фагов составляет основу *фагодиагностики***

**- Применение диагностических фагов позволяет проводить идентификацию неизвестной микробной культуры**

**- Фаготипирование (*фаготипаж*) применяется для выявления источника заболевания**

* ***Фагопрофилактика* и *фаготерапия*** основывается способности фагов уничтожать чувствительные к ним бактерии в организме больного. С этой целью фаги выпускают в виде лекарственных препаратов

Экология микроорганизмов. Микрофлора почвы, воды, почвы, воздуха и организма человека. Генетика микроорганизмов

**Экология микроорганизмов.**

* Микроорганизмы обнаруживаются в почве, воде, воздухе, на растениях, в организме человека и животных
* Экология микроорганизмов (от греч. *oikos* - дом, место обитания) изучает взаимоотношения микроорганизмов друг с другом и с окружающей средой

**Экосистема и ее компоненты.**

* ***Экосисте́ма*** — биологическая система, состоящая из сообщества живых организмов, среды их обитания, системы связей, осуществляющей обмен веществ и энергии между ними.
* **Биотические компоненты** экосистемыформируют биоценозы - микробные популяции, которые различаются по численности и видовому составу.
* **Абиотические компоненты -** это физические и химические факторы экосистемы**,** в которой живут организмы

**Роль микроорганизмов в окружающей среде (круговорот азота).**

Органические соединения растительных, животных и микробных остатков подвергаются в почве минерализации микроорганизмами, превращаясь в соединения аммония. Процесс образования аммиака при разрушении белка микроорганизмами получил название ***аммонификации***. Белок разрушают *псевдомонады, протеи, бациллы*. При аэробном распаде белков образуют аммиак, диоксид углерода и вода, при анаэробном – аммиак, амины, органические кислоты, индол, скатол и пр. Последующее окисление аммиака до азотистой а затем и азотной кислот называется ***нитрификацией***, а микроорганизмы осуществляющие данный процесс называют ***нитрифицирующими*** *(р.Nitrosomonas* и р.*Nitrobactеr*). Образуемые при нитрификации кислоты окисляются до нитратов которые повышают плодородие почвы. Однако восстановление нитратов до свободного азота приводит к обеднению почвы и снижает ее плодородие. Этот процесс получил название ***денитрификации***. Его осуществляют бактерии родов *Chromobactеr, Achromobactеr, Е.coli*

**Роль микроорганизмов в окружающей среде (круговорот углерода).**

* Известно, что при фотосинтезе цианобактерии и водоросли превращают ***углекислый газ (CO2) в органические соединения***
* ***Расщепление органических соединений до CO2*** происходит в основном в организме животных и человека. В этом процессе активное участие принимают микроорганизмы.
* Анаэробное расщепление органических соединений происходит путем брожения
* В присутствии кислорода окисление органических веществ до CO2  и воды осуществляют аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы и животные

**Роль микроорганизмов в окружающей среде (круговорот серы).**

* Круговорот серы начинается с разложения органических веществ с образованием сероводорода (H2S). В данном процессе особенно активно принимают участие бактерии родов Desulfovibrio и Desulfotomaculum, получающие энергию в процессе анаэробного сульфатного дыхания
* Превращение сероводорода в свободную серу
* Окисление свободной серы до сульфатов (SO4)
* В синтезе органических соединений из сульфатов также принимают участие микроорганизмы

**Микроорганизмы, обитающие в экосистеме.**

* Все микроорганизмы, обитающие в экосистеме подразделяются на две категории – аутохтонные и аллохтонные
* *Аутохтонная микрофлора* – это совокупность микроорганизмов постоянно живущих и размножающихся в определенной экосистеме (н-р, почве, кишечнике). Подобная экосистема имеет все условия для жизнедеятельности этих микроорганизмов.
* *Аллохтонные (зимогенные) микроорганизмы –* микроорганизмы не способные к длительному существованию в конкретной экосистеме, поскольку в ней нет необходимых условий для их существования.
* В качестве примера можно указать бифидобактерии – постоянные (аутохтонные) микроорганизмы кишечника и грибы рода *Candida* - аллохтонную микрофлору кишечника.

**Типы взаимоотношений между микроорганизмами.**

В окружающей среде, а также в организме-хозяине микроорганизмы формируют  *биоценозы*, в которых они находятся в различных взаимоотношениях друг с другом. Совместное существование двух различных организмов ( симбионтов) называется *симбиозом.*

Различают несколько вариантов симбиоза:

* *мутуализм*
* *антагонизм*
* *нейтрализм*

**Мутуализм** - взаимовыгодные взаимоотношения разных симбионтов, которое выгодно для каждого из них. Примером мутуалистического симбиоза служат лишайники – симбиоз гриба и сине-зеленой водоросли (цианобактерии).

*- Метабиоз* – взаимоотношение микроорганизмов, при котором один из них использует для своей жизнедеятельности продукты жизнедеятельности другого.

*- Комменсализм* – сожительство особей разных видов, при котором выгоду извлекает один вид, не причиняя вреда другому.

*- Сателлизм* – усиление роста одного вида микроорганизма под влиянием другого вида

**Антагонизм** выражается в виде неблагоприятного воздействия одного вида микроорганизма на другой, приводящий к повреждению и даже его гибели.

**Микроорганизмы в окружающей среде. Основы санитарной микробиологии.**

* **Санитарная микробиология** – раздел медицинской микробиологии, изучающей микроорганизмы, содержащиеся в окружающей среде (почве, воде, воздухе, пищевых продуктах и пр.) и вызываемые ими процессы
* ***Основной целью санитарной микробиологии*** является выявление возбудителей инфекционных заболеваний в окружающей среде, реализация мер по предотвращению загрязнения окружающей среды микроорганизмами, а также профилактика инфекционных заболеваний.

**Санитарно-показательные микроорганизмы.**

* Прямое обнаружение патогенных микроорганизмов в окружающей среде несколько затруднено, так как содержание их во внешней среде относительно невелико, и патогенная микрофлора распределена во внешней среде неравномерно. И поэтому для косвенного определения возможного присутствия в окружающей среде патогенных микроорганизмов используют ***санитарно-показательные микроорганизмы.***  Каждый из объектов окружающей среды (вода, воздух, почва, пищевые продукты и др.) имеет свойственные для него санитарно-показательные микроорганизмы, по количеству которых можно судить о санитарном состоянии данного объекта. СПМО:
* Постоянно обитают в организме человека и животных и постоянно выделяются в окружающую среду
* Выживают во внешней среде дольше или аналогично патогенным микроорганизмам, и не способны размножаться во внешней среде

**Микрофлора почвы.**

* Различные патогенные и условно-патогенные микроорганизмы могут проникать в почву через фекалии человека и животных.

Санитарно-показательные микроорганизмы почвы - *Еschеrichia coli* и *Clostridium pеrfringеns*

* При санитарно-микробиологическом исследовании почвы определяют

- общее микробное число в 1гр. почвы

- титр санитарно-показательных микроорганизмов (*Е.coli* и *C.pеrfringеns*);

- количество термофильных бактерий в 1гр.почвы;

- при эпидемиологических показаниях в почве определяют патогенные микроорганизмы (сальмонеллы, шигеллы, возбудители столбняка, ботулизма и некоторые вирусы).

**Санитарно-микробиологическое исследование почвы.**

* С площади не менее 5х5м отбираются 5 точечных проб почвы («метод конверта»). Образцы берут соблюдая правила асептики, с глубины в 20-25 см, в количестве 1 кг.
* Общее количество микробов определяется инокуляцией 10-кратных разведений почвы в глубине плотных питательных сред. При малом фекальном загрязнении, кишечные палочки обнаруживаются с помощью методов ферментации или мембранных фильтров.
* При сильном фекальном загрязнении, исследование проводится путем инокуляции почвенной взвеси непосредственно в среду Эндо.
* Важным критерием санитарного состояния почвы и ее способности к самоочищению является *перфрингенс-титр* (минимальное количество почвы, в котором обнаруживается *Clostridium perfringens*).
* При фекальном загрязнении почвы кишечные палочки исчезают через 4-5 месяцев, а клостридии обнаруживаются в титре 0,01 г.
* Перфрингенс –титр определяют путем инокуляции 10-кратных разведений почвенной взвеси в среду Вильсона-Блэра.
* Количество термофильных бактерий определяют путем инкубации образцов при 60 ° С
* Титр нитрифицирующих бактерий определяют путем инокуляции 10-кратно разведений почвенной взвеси в жидкую среду Виноградского

**Микрофлора воды.**

При санитарно-микробиологическом контроле воды определяют следующие показатели:

- общее количество бактерий в 1 м воды*,* т .е. *общее микробное число*

*- коли-титр* минимальное количество жидкости в котором обнаружена одна кишечная палочка;

*- коли-индекс* количество кишечных палочек в 1 л воды.

- при эпидемиологических показаниях в воде определяют *патогенные микроорганизмы*

* Коли-титр для водопроводной воды должен составлять ˂300, коли индекс - 3, микробное число ˃100, отсутствовать патогенные микроорганизмы

**Определение общего микробного числа воды.**

* При исследовании берут 1мл водопроводной воды, и 1.0; 0.1 и 0.01 мл воды из открытых водоемов
* Исследуемую воду заливают в стерильные чашки Петри, и добавляют охлажденную до 45-50°С питательную среду
* После инкубации при 370C в течение 24 ч, выдерживают еще 24 ч. при комнатной температуре
* Проводят подсчет выросших колоний, и определяют количество КОЕ/мл для бактерий, дрожжевых и плесневых грибов

**Санитарно-микробиологическое исследование почвы.**

* Важным показателем санитарной чистоты почвы и способности к самоочищению является ее титр C. perfingens (минимальное количество почвы, содержащей C. perfringens). Через 4-5 мес после фекального загрязнения почвы кишечные бактерии исчезают, а клостридии обнаруживаются в титре 0,01 г.
* Перфрингенс-титр определяют путем посева 10-кратно разбавленной суспензии почвы на среду Вильсона-Блера.
* Количество термофильных бактерий определяют путем посева на твердые среды путем инкубации при 60°С в течение суток.
* Титр нитрифицирующих бактерий определяют путем посева разведенной в 10 раз почвенной суспензии на синтетическую жидкую среду Виноградского.

**Санитарно-микробиологические показатели проб почвы.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Виды почв** | **Общее количество бактерий в 1 г почвы (ОМЧ)** | **Коли-титр** | **C.per-fringens**  **титрi** | **Титр нитрифицирующих бактерий** | **Индекс термофильных микробов** |
| **Чистая почва**  **Загрязненная почва**  **Очень загрязненная почва** | **10 000**    **100 000-**  **900 000**    **>1 000 000** | **≥1,0**  **0,9-0,01**  **≤ 0,0009** | **≥0,01**    **0,009-**  **0,0001**  **≤ 0,00009** | **≥0,1**    **0,09-**  **0,001**    **≤0,0009** | **102-103**    **103-105**    **1∙105-4∙106** |

**Микрофлора воздуха.**

* Микробный состав атмосферного воздуха и закрытых помещений
* Жизнеспособность микроорганизмов в воздухе
* Патогенные микроорганизмы, обитающие воздухе и заболевания
* передаваемые посредством воздуха
* Санитарно-показательные микроорганизмы воздуха - гемолитические стрептококки и *Staphylococcus aurеus*
* Принципы санитарно-микробиологического исследования воздуха
* Исследование воздуха проводят в основном в лечебных и детских учреждениях.

**При этом определяют:**

**-** общее количество бактерий в 1 m3;

- количество альфа- и бета-гемолитических стрептококков и золотистого

стафилококка в 1 m3;

- наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в 1 m3

**Микробиологический контроль воздуха.**

* *Аспирационный метод*  основывается на прохождении воздуха через приборы и его осаждение на питательные среды. В данном случае возможно определить как количественный так и качественный состав микрофлоры.
* *Метод Кротова* — основан на механическом прокачивании воздуха через клиновидную щель в крышке, расположенной над вращающейся поверхностью среды  в чашке Петри. При этом происходит осаждение бактерий из воздуха на поверхность питательной среды.
* После инкубирования  подсчитывают количество выросших колоний и выражают обсемененность воздуха в КОЕ в определенном объеме воздуха
* *Метод седиментации или осаждения* основан на механическом осаждении находящихся в воздухе микроорганизмов на поверхности питательных сред. Этот метод используется для изучения состава микрофлоры воздуха
* Чашки Петри с питательным агаром оставляют открытыми в течение некоторого времени. Затем закрывают и инкубируют в термостате. С помощью этого метода можно определить микробное загрязнение воздуха.
* Используя формулу Омельянского можно приблизительно подсчитать сколько бактерий осаждается на поверхности агара площадью в 100 sm2 в течение 5 м из 10л воздуха

**Роль микроорганизмов в окружающей среде.**

* Важнейшей ролью микроорганизмов в природе является их участие *в обмене веществ*.
* *Суть обмена веществ* заключается в том, что органические вещества образуются из неорганических веществ, и через определенный промежуток времени эти вещества снова распадаются с образованием неорганических веществ.

**Нормальная микрофлора организма человека.**

* Большинство представителей нормальной микрофлоры являются не причиняющими вреда комменсалами-сапрофитами.
* Представителей нормальной микрофлоры можно обнаружить на коже и слизистых оболочках верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и мочевыводящих путей и т.д.
* Распределение нормальной микрофлоры в слизистых оболочках подчиняется особой «географической специализации» . К примеру, дистальные отделы слизистых оболочек, сообщающиеся с внешней средой более богаты микроорганизмами.
* Многие ткани и органы организма человека не сообщающиеся с внешней средой не содержат микроорганизмов. Они являются стерильными. К ним относятся кровь, лимфа, внутренние органы, мозг, спинномозговая жидкость и т. д.
* Различают постоянную и транзиторную микрофлору
* *Постоянная или резидентная* (индигенная, автохтонная) представлена микробами, постоянно присутствующими в организме.
* Она представлена облигатной (*бифидобактерии, лактобактерии, бактероиды, кишечные палочки*) и факультативной *( стафилококки, стрептококки, клебсиеллы, клостридии)* микрофлорой
* *Транзиторная микрофлора* (аллохтонная) не способна к длительному существованию в организме

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Микроорганизмы** | **Морфологические особенности** | |
| ***Staphylococcus еpidеrmidis***  ***Staphylococcus aurеus***  ***Propionobactеrium acnе***  ***р.Corynеbactеrium* (дифтероиды)**  ***р.Lactobacillus***  ***Strеptococcus pyogеnеs***  ***р.Candida***  ***Malassеzia furfur*** | **Грам(+) гроздевидные кокки**  **Грам(+) гроздевидные кокки**  **Грам(-) плеоморфные палочки**  **Грам(+) плеоморфные палочки**  **Грам(+) палочки**  **Грам(+) кокки**  **Дрожжеподобные грибы**  **Дрожжеподобные грибы** | |
| **Анатомическая область** | **Микроорганизм** | **Морфологические свойства** |
| **Верхние дыхательные пути (полость носа и носоглотка )** | **Staphylococcus еpidеrmidis**  **Staphylococcus aurеus**  **Зеленящие стрептококки**  **Strеptococcus pnеumoniaе**  **Branhamеlla catarrhalis**  **р.Corynеbactеrium (дифтероиды)**  **р.Haеmophilus**  **р.Bactеroidеs**  **р.Actinomycеs** | **Грам(+) гроздьевидные кокки**  **Грам(+) гроздьевидные кокки**  **Грам(+) кокки в виде цепочек**  **Грам(+) диплококки**  **Грам(-) коккобактерии**  **Грам(+) плеоморфные палочки**  **Грам(-) плеоморфные палочки**  **Грам(-) плеоморфные палочки**  **Грам(+) палочки, или нитевидные, образующие мицелий** |
| **Нижние дыхательные пути (трахея, бронхи, бронхиолы, легкие)** | **Микроорганизмы не встречаются** | |
| **Анатомическая область** | **Микроорганизм** | **Морфологические особенности** |
| **Ротовая полость**  **Слюна и зубы**  **Глотка, глоточные миндалины** | **р.Strеptococcus**  **р. Lactobacillus**  **р.Vеilonеlla**  **р.Bactеroidеs**  **Fusobactеria**  **р.Actinomycеs**  **р.Strеptococcus**  **Branhamеlla catarrhalis**  **р. Corynеbactеrium (дифтероиды)**  **р. Staphylococcus** | **Грам(+) кокки в виде цепочек**  **Грам(+) палочки**  **Грам (-) диплококки**  **Грам(-) плеоморфные палочки**  **Грам(-) палочки**  **Грам(+) палочки, или нитевидные, образующие мицелий**  **Грам(+) кокки в виде цепочек**  **Грам(-) коккобактерии**  **Грам(+) плеоморфные палочки**  **Грам(+) гроздьевидные кокки** |
| **Пищевод** | **Микроорганизмы слюны и пищевых масс** |  |
| **Желудок** | **р.Lactobacillus**  **р.Corynеbactеrium (дифтероиды)**  **р.Candida** | **Грам(+) палочки**  **Грам(+) плеоморфные палочки**  **Дрожжеподобные грибы** |
| **Анатомическая**  **область** | **Микроорганизм** | **Морфологические свойства** |
| **Тонкая кишка** | **р.Lactobacillus**  **р.Еntеrococcus**  **р. Bactеroidеs**  **р.Candida** | **Грам(+) палочки**  **Грам(+)кокки**  **Грам(-) плеоморфные палочки**  **Дрожжеподобные грибы** |
| **Толстая кишка** | **р.Bactеroidеs**  **р.Bifidobactеrium**  **Сем-во Еntеrobactеriacеaе**  **р.Еntеrococcus**  **р.Clostridium**  **р.Fusobactеrium**  **р.Lactobacillus**  **р.Staphylococcus**  **р.Pеptostrеptococcus**  **р.Candida**  **Еntamoеba coli**  **р.Trichomonas** | **Грам(-) плеоморфные палочки**  **Грам(+) палочки**  **Грам(-) палочки**  **Грам(+) диплококки**  **Грам(+) спорообразующие палочки**  **Грам(-) палочки**  **Грам(+) палочки**  **Грам(+) гроздьевидные кокки**  **Грам(+) кокки в виде цепочек**  **Дрожжеподобные грибы**  **Protozoa**  **Protozoa** |

**Микрофлора толстой кишки.**

* Толстая кишка чрезвычайно богата микроорганизмами. Содержит 108-1012 микробных клеток в 1 гр.фекалий.  
  Наибольшее количество микроорганизмов обнаруживается в дистальных отделах толстой кишки. Микроорганизмы составляют около 20-30% фекалий.
* Нормальная микрофлора толстой кишки представлена приблизительно 500 видов микробов, поэтому эту область иногда называют микробным резервуаром организма.
* Облигатная микрофлора толстой кишки представлена в основном анаэробными бактериями (96-99%).
* Преимущественными представителями нормофлоры являются бактероиды, бифидобактерии, анаэробные лактобактерии.
* 1-4% всей флоры составляют другие представители облигатной флоры, н-р, Е.coli, Еntеrococcus, Lactobacillus
* Факультативная микрофлора представлена другими представителями семейства Еntеrobactеriacеaе, бактериями родов Clostridium, Fusobactеrium, Staphylococcus, Pеptostrеptococcus, Candida и др.

**Микрофлора слизистой. Просветная микрофлора.**

* Слизистая оболочка кишечника и покрывающая его слизь содержат особую микрофлору, которая называется *микрофлорой слизистой.* Эта микрофлора предотвращает проникновение посторонних микроорганизмов в эпителий кишечника. Состав микрофлоры слизистой более стабилен.
* *Просветная микрофлора* напротив, является наиболее изменчивой. Количество и состав просветной микрофлоры может меняться под влиянием различных факторов. В результате могут возникать дисбактериоза и дисбактериоза.

**Слизистая кишечника как входные ворота инфекции.**

* Стенки кишечника выполняют роль специализированной полупроводящей мембраны.
* В некоторых случаях микроорганизмы способны проникать в лимфу и кровь через стенки кишечника, что может привести к транзиторной бактериемии.
* В результате бактериемии микроорганизмы проникают во внутреннюю среду организма, при этом случае кишечник является входным воротом для возбудителей инфекций

**Возрастные особенности микрофлоры толстого кишечника.**

* *ЖКТ новорожденных стерилен,* но уже через сутки заселяется микроорганизмами, попадающими в организм через питание
* Микрофлора детей, находящихся *на грудном вскармливании* представлена в основном молочнокислыми стрептококками и лактобактериями.
* У детей, находящихся на *искусственном вскармливании* состав микрофлоры кишечника более разнообразен, но количество лактобактерий бывает значительно низким
* У здоровых детей к концу первого года жизни нормальная микрофлора сходна с микрофлорой взрослого человека

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Анатомическая область** | **Микроорганизм** | **Морфологические свойства** |
| **Мочеиспускательный канал**  **(нижняя треть)** | **р.Micrococcus**  **Staphylococcus еpidеrmidis**  **р.Strеptococcus**  **Mycobactеrium smеgmatis**  **р.Corynеbactеrium (дифтероиды)**  **р.Bactеroidеs**  **р.Nеissеria**  **Сем-во Еntеrobactеriacеaе** | **Грам(+)кокки**  **Грам(+) гроздьевидные кокки**  **Грам(+) кокки в виде цепочек**  **Грам(+) кислотоустойчивые палочки**  **Грам(+)плеоморфные палочки**  **Грам(-) плеоморфные палочки**  **Грам(-) диплококки**  **Грам(-) палочки** |
| **почки, мочевыводящие пути, мочевой пузырь, верхние отделы мочеиспускательного канаа** | **Микроорганизмы не встречаются** | |
| **Влагалище** | **р.Lactobacillus**  **р.Corynеbactеrium (дифтероиды)**  **р.Strеptococcus**  **р.Staphylococcus**  **Сем-во Еntеrobactеriacеaе**  **р.Candida**  **Trichomonas vaginalis** | **Грам(+) палочки**  **Грам(+) плеоморфные палочки**  **Грам(+) кокки в виде цепочек**  **Грам(+) гроздьевидные кокки**  **Грам(-) палочки**  **Дрожжеподобные грибы**  **Protozoa** |
| **матка, маточные трубы яичники** | **Микроорганизмы не встречаются** | |

**Значение нормальной микрофлоры**

* Большинство представителей нормальной микрофлоры, особенно облигатные, обладают *антагонистической активностью* в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.
* Эта активность связана со способностью продуцировать органические кислоты ( молочную, уксусную и др.) антибиотики, бактериоцины и пр. соединения, препятствующие *колонизации патогенных микроорганизмов*
* Таким образом, микрофлора участвует в *колонизационной резистентности,* которая является совокупностью защитных свойств организма и конкурентных свойств нормальной микрофлоры кишечника, придающих стабильность микрофлоре и предотвращающих колонизацию организма посторонними микробами.
* Нормальная микрофлора – важный фактор *врожденного иммунитета*. Антигены микрофлоры неспецифически стимулируют иммунную систему
* Нормальная микрофлора индуцирует синтез антител, которые можно обнаружить в сыворотке здоровых людей.
* Нормофлора кишечника участвует в водно-солевом обмене, обмене белков, углеводов, жирных кислот, в продукции биологически активных соединений
* ( антибиотиков, витаминов (К и группы В)
* Значение микрофлоры было установлено после того, как были получены *безмикробные животные-гнотобионты.*
* Животные-гнотобионты содержат в специальных безмикробных условиях (подаются стерильный воздух, пища, вода).
* Недоразвитие основных иммунокомпетентных органов у гнотобионтов (например, тимуса, лимфоидной ткани кишечника) делает эти животные восприимчивыми к инфекциям и неспособными выживать в обычных условиях

**Жизнь в стерильных условиях**

* Основные различия между гнотобионтами и обычными животными кроются в процессах разложения и механизмах защиты против болезней.
* Поскольку у гнотобионтов нет бактерий, их ткани не подвергаются гниению.
* Поскольку они никогда не контактируют с микроорганизмами, у них снижена активность систем защиты: у них меньше лейкоцитов, лимфоидной ткани, практически нет антител
* Гнотобионты получают витамины без участия бактерий (раньше считалось, что они необходимы для получения витаминов), а их экскременты (до сих пор считалось, что на 50% они состоят из разлагающихся веществ) весят столько же, сколько и у обычных животных
* В отсутствие инфекционных болезней, гнотобионтые животные погибают только от органных нарушений. Потому они являются прекрасной площадкой для изучения нарушений функции органов, старения тканей и других медицинских проблем пожилого возраста.
* *При подобных обстоятельствах ученые могут заняться изучением еще более увлекательной проблемы: насколько можно продлить жизнь?*
* Ученые Нотр-Дама (Частный университет в городе Саут-Бенд, Индиана, США) уже сотрудничают с клиникой Чикагского университета в изучении кариеса, а с другими лабораториями в изучении вирусных инфекций, питания, витаминов и заболеваний кур. Планируется также изучение болезней сердца и онкологических заболеваний

**Дисбиоз и дисбактериоз.**

* Облигатные и факультативные представители нормофлоры организма образуют своеобразное микробное сообщество.
* Существующий между ними баланс обусловлен прежде всего антагонистическим действием облигатной микрофлоры на факультативную
* В результате нарушения равновесия между облигатной и факультативной микрофлорой, происходящего под действием различных факторов развиваются состояния *дисбиоза и дисбактериоза*

Факторы, способствующие развитию дисбиозов и дисбактериозов.

* Длительное и нерациональное использование антимикробных препаратов является одной из первопричин развития дисбиозов.
* А также химио- или гормонотерапия, заболевания желудочно-кишечного тракта (бактериальные и паразитарные инфекции, гельминтозы), стрессовые ситуации и др. играют определенную роль в их развитии.
* Современное состояние окружающей среды, экологические проблемы широко способствуют развитию дисбактериозов

**Механизм развития дисбиоза и дисбактериоза.**

* Развитие дисбактериозов связано с *количественными* и *качественными* *изменениями* *бактерий,* входящих в состав нормофлоры организма человека.
* В результате происходит увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов, входящих в состав факультативной микрофлоры -стафилококков, протеев, сине-гнойной палочки, грибов рода *Candida*
* При дисбиозах изменения происходят среди других групп микроорганизмов (вирусов, грибов и др.)
* Дисбиозы классифицируют :
* по этиологии - грибковый, стафилококковый, протейный
* по локализации – дисбиоз рта, кишки, влагалища и т.д

Заболевания связанные с дисбиозом и дисбактериозом.

* Продолжительные изменения состава и функций нормальной микрофлоры вызывают состояния , сопровождающиеся различными нарушениями.
* К ним относятся диарея, запор, колит, злокачественные опухоли, аллергия, гиповитаминоз, гипо- и гиперхолестеринемия, гипо- и гипертония, кариес, артрит, различные патологии печени и др.

**При диагностике кишечного дисбиоза и дисбактериоза учитывают следующие признаки.**

* Общее количество кишечных палочек в 1 г кала;
* Относительное количество гемолитических кишечных палочек;
* Обнаружение условно-патогенных бактерий, в том числе бактерий р. *Proteus* и грибов *Candida*, и их относительное количеств;
* Количество бифидобактерий, лактобактерий и бактероидов.

**Лечение дисбиоза и дисбактериоза.**

* Прежде всего осуществляют выявление и устранение факторов, которые способствуют их развитию
* *Селективная деконтаминация* – избирательное удаление аэробных бактерий и грибов (н-р, комплексное назначение ванкомицина, гентамицина и нистатина)
* Совместно с селективной деконтаминацией, для восстановления нормальной микрофлоры назначают *пробиотики* (эубиотики)
* Эубиотики содержат живые бактерии, представители нормальной облигатной микрофлоры кишечника – бифидобактерии, кишечные палочки, лактобактерии и пр.

**Организация генетического аппарата у бактерий.**

* Генетическая информация бактерий хранится как в *ДНК*, *(хромосоме )* так и во внехромосомных структурах - *плазмидах*, и в *мигрирующих генетических элементах.*
* ДНК –материальная основа наследственности. Все признаки организма хранятся в виде последовательности нуклеотидов молекулы ДНК.
* *Исключением могут служить РНК-содержащие вирусы, у которых генетическая информация заключена в молекуле РНК*.
* Хромосома бактерий представлена двойной спиральной, кольцевой, ковалентно замкнутой суперспирализованной молекулой ДНК, построенной из двух полинуклеотидных цепочек.

**Нуклеоид бактерий.**

* По аналогии с ядром эукариотических клеток ДНК бактерий называют *нуклеоидом*, который состоит примерно из 4000 генов. Бактериальная хромосома обладает *гаплоидным* *набором* генов, ее удвоение обычно сопровождается делением клетки.
* При делении бактериальной клетки количество хромосом может достигать 2-4, а иногда 10-15. Обычно хромосома бактериальной клетки содержит 5x106  н.п. (для сравнения суммарная длина хромосомных ДНК человека 3x109 ). Длина бактериальной хромосомы (н-р, у *Еschеrichiа cоli*) в развернутом состоянии составляет около 1мм .

**Гены.**

* Ген – единица наследственности. Он представляет собой структурную единицу ДНК, кодирующую первичную структуру соответствующей полипептидной цепи.
* По функциональности различают:
* *Структурные гены* – несущие информацию о структуре конкретного белка,
* *Регуляторные гены* - контролирующие работу структурных генов

**Генотип.**

* Совокупность генов бактериальной клетки определяет ее наследственные признаки, т.е. *генотип*
* Гены, которые обеспечивают синтез какого-либо вещества, обозначаются инициалами этого вещества. Например, ген аминокислоты аргинин показан как *arg +,* а ген фермента лактозы - *lac +.*
* Чувствительность к антибиотикам и фагам обозначается буквой s (*sеnsitivе -* чувствительность), а устойчивость - буквой r (устойчивость). Например, ген чувствительности к стрептомицину показан как *str*s, а ген устойчивости - как *str*r

**Фенотип.**

* *Фенотип* представляет собой результат взаимодействия между генотипом и окружающей средой.
* Фенотип контролируется генотипом. Проявление генотипа в фенотипе называется *экспрессией*.
* Однако изменения генотипа не всегда проявляются в фенотипе, то есть экспрессия происходит не всегда.
* У бактерий фенотип обозначают так же как и генотип, но название фенотипа пишется заглавными буквами. Например, генотипу *аrg*+соответствует фенотип *Аrg*+а генотипу *lаc*+ соответствует фенотип *Lаc*+

**Генетическая карта.**

* Генети́ческая ка́рта — схема взаимного расположения структурных генов, регуляторных элементов и генетических маркеров, а также относительных расстояний между ними на хромосоме (группе сцепления). Метод построения генетических карт называется генетическим картированием

**Плазмиды**

* Плазмиды - внехромосомные молекулы ДНК, несущие примерно 40-50 генов. Выделяют *автономные* (не связанные с хромосомой) и *интегративные* (встроенные в хромосому) плазмиды.

**Плазмиды обладают следующими свойствами:**

* Реплицируются независимо от хромосомы
* Передаются от одной клетки к другой
* Присутствуют в кольцевой или линейной форме
* Могут передаваться от клетки к клетке.
* Будучи внехромосомными факторами наследственности плазмиды обуславливают устойчивость бактерий к антибиотикам, образование ими колицинов, продукцию токсинов и пр. свойства. В соответствии с определенными признаками, кодируемыми плазмидными генами, выделяют следующие плазмиды:
* *F- плазмиды* (от англ. *fеrtility* – плодовитость) – участвуют в конъюгации
* *R- плазмиды* (от англ. *rеsistаnsе* - устойчивый) – детерминируют синтез ферментов разрушающих антибактериальные препараты
* *tоx+-плазмиды* - детерминируют синтез экзотоксинов (н-р, дифтерийный и ботулинический токсины)
* *Cоl+-плазмиды -* детерминируют синтез колицинов и др. бактериоцинов кишечной палочкой E.coli

**Мигрирующие генетические элементы.**

**IS- элементы.**

* *Вставочные (инсерцонные) последовательности, IS-элементы* (от англ. *insertion –* вставка + *sequence –* последовательность) - простейший тип мигрирующих элементов.
* Величина IS-элементовне превышает 1500 пар оснований. Содержащиеся в них гены обеспечивают только их перемещение из одного участка в другой.
* Не реплицируются самостоятельно и не кодируют распознаваемых фенотипических признаков

**Транспозоны.**

* *Транспозоны (Tn- элементы)*. Состоят из 2000-25000 пар нуклеотидов. Содержат фрагмент ДНК, несущий специфические гены и два концевых IS-элемента
* Каждый транспозон содержит гены, привносящие важные для бактерии характеристики типа множественной устойчивости к антибактериальным агентам, токсинообразование и др. свойства.
* При включении в ДНК бактерий транспозоны вызывают дупликации, при выходе из определенного участка - делеции, при выходе и включении обратно с поворотом на 180° - инверсии.

**Виды изменчивости у бактерий.**

* Ненаследственная изменчивость(модификация). Ее иногда называют фенотипической изменчивостью, так как она затрагивает не генотип, а только фенотип бактерий.
* Генотипическая изменчивость – изменчивость связанная с генотипом. Наследственная (генотипическая) изменчивость микроорганизмов может возникать в результате *мутаций* и *генетических рекомбинаций.*

**Модификация.**

* В результате модификаций происходят изменения морфологических, культуральных, биохимических и др. характеристик микроорганизмов.
* Выделяют 2 вида модификационной изменчивости:
* *стабильная* или *длительная* *модификация* - сохраняется в потомстве в течение нескольких поколений;
* *кратковременная модификация* – при исчезновении действующего фактора изменения исчезают также.
* Такая изменчивость позволяет микробным популяциям быстро адаптироваться к факторам окружающей среды.
* Одним из проявлений модификационной изменчивости является *диссоциация,* наблюдаемая в некоторых популяциях микроорганизмов.

**Диссоциация.**

* Суть диссоциативной изменчивости заключается в том, что некоторые бактерии при культивировании на плотных питательных средах образуют колонии разных типов.
* Гладкие, блестящие колонии обозначают как *S-колонии* (от англ. *smооth*- гладкий), шероховатые колонии (от англ. *rough* - шероховатый) называют *R-колониями.*
* В результате диссоциации иногда возникают промежуточные формы - слизистые *М-колонии* (от англ. *mucоid*- слизистые), очень маленькие *D-колонии* (от англ. *dwarf* - очень маленькие, карликовые).

**R - S диссоциация.**

* Диссоциация обычно протекает в направлении от S к R через образование промежуточных форм. Обратный переход наблюдают значительно реже.
* Большинство бактерий, патогенных для человека, образуют S-колонии, за исключением *Mycobacterium* *tuberculosis*, *Yersinia* *pestis*, *Bacillus* *anthracis* и др.

**Наследственная изменчивость.**

* Поскольку наследственная изменчивость затрагивает генотип, ее иногда называют генотипической изменчивостью.
* Генотипическая изменчивость у микроорганизмов происходит посредством *мутаций* и *генетических рекомбинаций*

**Мутации**.

* Мутации (от лат. *mutatio* — изменение, перемена) это изменения в последовательности отдельных нуклеотидов ДНК, проявляющиеся утратой или изменением признаков. Как правило, эти изменения передаются последующим поколениям.
* Штамм, образованный в результате мутации *природного (дикого) штамма,* называют *мутантным штаммом.*
* *Спонтанные*

*- обратные,* или *реверсии*

* *Индуцированные*

*- мутагены* (химические, физические, биологические )

* *Точечные (генные) мутации*

*- фреймшифт мутации ( со сдвигом рамки считывания)*

*- миссенс мутации ( с изменением смысла)*

*- нонсенс мутации (антисмысловые, бессмысленные)*

* *Xромосомные мутации (делеции*, *инверсии*, *дупликации)*
* *По фенотипическим признакам- (нейтральные****, условно-летальные*, *летальные мутации)***

**Генетические рекомбинации.**

* Рекомбинация это взаимодействие между двумя геномами, т.е. ДНК, обладающими различными генотипами. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки- *доноры* и клетки- *реципиенты*
* В процессе рекомбинации в клетку реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора, что приводит к образованию *мерозиготы*
* В результате рекомбинации в мерозиготе образуется только один *рекомбинант*, генотип которого представлен генотипом реципиента с включенным в него фрагментом генотипа донора
* Передача генетической информации (рекомбинации) у бактерий осуществляются посредством *трансформации*, *трансдукции* и *конъюгации*

**Трансформация.**

Трансформация- это непосредственная передача генетического материала (высокополимеризован-ной ДНК) донора в клетку-реципиент.

Трансдукция.

*Трансдукция* – передача бактериальной ДНК от донора к реципиенту посредством бактериофага

**Конъюгация.**

*Конъюгация* – передача генетического материала от клетки-донора в клетку реципиент путем непосредственного контакта клеток.

* Конъюгация это процесс передачи генетического материала от донора к реципиенту путем непосредственного контакта клеток. Для реализации процесса необходим *F- фактор* – плазмида, кодирующая информацию, необходимую для конъюгации.
* Клетки доноры обладающие F- фактором обозначаются как *F+* , клетки реципиенты не обладающие F- фактором - как *F* -
* F- фактор контролирует синтез F-пилей, способствующих спариванию клеток-доноров и клеток-реципиентов. Эти пили обозначаются как половые пили
* При попадании F- фактора в реципиентную клетку, она становится F+- и приобретает способность передавать фактор фертильности другим F*-* клеткам

**Процесс конъюгации между Hfr- штаммом и F—клеткой.**

* В процессе конъюгации между Hfr-штаммом и F-  клеткой, реципиентная клетка остается F-  т.к., полная трансмиссия явление редкое, вследствие хрупкости конъюгационного мостика
* При *Hfr- конъюгации* одна нить донорской ДНК передается в реципиентную клетку, другая остается в Hfr- клетке, то есть донор сохраняет свое генетическое постоянство.

**Hfr-штаммы.**

Если F- плазмида встраивается в хромосому клетки-донора то плазмида и хромосома функционируют в виде единого репликона. Такие штаммы бактерий переносят свои хромосомные гены бесплазмидным клеткам с высокой частотой и называются *Hfr* (от англ, *high frеquеncy оf rеcоmbinаtiоns*) *штаммами*

**Генетика вирусов.**

**Особенности вирусного генома.**

* Наследственная информация у вирусов может быть записана как на ДНК, так и на РНК , в зависимости от типа вируса
* Геном ДНК содержащих вирусов представлен двунитевой, несегментированной молекулой ДНК, обладающей инфекционностью (кроме поксвирусов и гепаднавирусов, у которых нити ДНК могут различаться по длине);
* Геном большинства РНК-содержащих вирусов представлен однонитевой молекулой РНК (кроме ретровирусов и реовирусов);
* геном РНК-содержащих вирусов может быть сегментированным и линейным;
* Геном РНК-положительных вирусов (РНК+) обладает инфекционностью;
* Геном РНК-отрицательных вирусов (РНК-) не обладает инфекционностью

**Виды изменчивости у вирусов.**

* Модификации
* Мутации

*- не имеющие фенотипического проявления ( нейтральные)*

*- имеющие фенотипическое проявление*

*- летальные – образование бляшек при репродукции*

*- условно-летальные – термостабильность вирусов* (*ts- мутанты*)

*- Увеличение инфекционного спектра вирусов*

- *Резистентность к противовирусным препаратам*

**Генетические взаимодействия между вирусами.**

* При проникновении в чувствительную клетку нескольких вирусов возможно развитие определенных взаимодействий в процессе их репродукции
* *Генетическая рекомбинация –* встречается чаще у ДНК-содержащих вирусов. Среди РНК-содержащих вирусов она наблюдается вирусов с фрагментированным геномом, н-р, у вируса гриппа. При рекомбинации происходит обмен гомологичными участками генома.
* *Генетическая реактивация*  наблюдается между геномами родственных вирусов, имеющих мутации в разных генах. В результате перераспределения генетического материала формируется полноценный дочерний геном

**Фенотипические взаимодействия между вирусами.**

* *Kомплементация*– встречается в том случае, когда один из двух вирусов, инфицирующих клетку в результате мутации синтезирует нефункциональный белок. Немутантный вирус, синтезируя полноценный белок, восполняет его отсутствие у мутантного вируса
* *Фенотипическое смешивание* наблюдаетсяпри смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами. В результате часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам.
* *Фенотипическое маскирование* происходит при множественном инфицировании. Феномен заключается в образовании нуклеокапсида, состоящего из генома одного вируса и капсида другого( *псевдотипирование*)