**Лекция 5**

**Экология микроорганизмов. Микрофлора биосферы. Нормальная микрофлора организма человека. Влияние факторов внешней среды (физических, химических и биологических) на микроорганизмы. Фаги. Генетика микроорганизмов, виды генетической изменчивости. Биотехнология и генная инженерия.**

**Экология** (от греч. *oikos —* дом, место обитания) микроорганизмов изучает взаимоотношения микроорганизмов друг с другом и с окружающей средой. Микроорганизмы обнаруживаются в почве, воде, воздухе, на растениях, в организме человека и животных и даже в космосе. Они — составная часть ***биоценоза***, т.е. совокупности животных, растений и микроорганизмов, заселяющих ***биотоп*** *—* участок суши или водоема с однородными условиями жизни. Сообщество микроорганизмов, обитающих на определенных участках среды, называется ***микробиоценозом****.*

**Распространение микробов в окружающей среде**

Микроорганизмы окружающей среды участвуют в процессах круговорота веществ в природе, уничтожают остатки погибших животных и растений, повышают плодородие почвы, поддерживают устойчивое равновесие в биосфере. В качестве нормальной микрофлоры они выполняют ряд полезных функций для организма человека.

**Микрофлора почвы**

Почва заселена разнообразными микроорганизмами, которые принимают участие в процессах почвообразования и самоочищения почвы, кругооборота в природе азота, углерода и других элементов. В почве обитают бактерии, грибы, лишайники (симбиоз грибов с цианобактериями) и простейшие. Численность бактерий в почве достигает 10 млрд клеток в 1 г. На поверхности почвы микроорганизмов относительно мало, так как на них губительно действуют УФ-лучи, высушивание и другие факторы. Наибольшее число микроорганизмов содержится в верхнем слое почвы толщиной до 10 см. По мере углубления количество микроорганизмов уменьшается, и на глубине 3–4 м они практически отсутствуют. Состав микрофлоры почвы зависит от ее типа и состояния, видов растительности, температуры, влажности и т.д. Большинство почвенных микроорганизмов развиваются при нейтральном рН, высокой относительной влажности, температуре от 25 до 45 С.

В почве живут **азотфиксирующие бактерии**, способные усваивать молекулярный азот (*Azotobacter*, *Azomonas*, *Mycobacterium* и др.). Азотфиксирующие разновидности цианобактерий, или сине-зеленых водорослей, применяют для повышения плодородия рисовых полей. Почва служит местом обитания спорообразующих палочек родов *Bacillus* и *Closlridium.* Непатогенные бациллы (*Вас.* *megaterium*, *Вас. subtilis* и др.) наряду с псевдомонадами, протеем и некоторыми другими бактериями являются **аммонифицирующими**, составляя группу гнилостных бактерий, осуществляющих минерализацию органических веществ. Патогенные спорообразующие палочки (возбудители сибирской язвы, ботулизма, столбняка, газовой гангрены) способны длительно сохраняться, а некоторые даже размножаться в почве (*Clostridium botulinum*). Кишечные бактерии (сем. *Enterobacteriaceae*) *—* кишечная палочка, возбудители брюшного тифа, сальмонеллезов, дизентерии — могут попадать в почву с фекалиями. Однако здесь отсутствуют условия для их размножения, и они постепенно отмирают. В чистых почвах кишечная палочка и протей встречаются редко. Обнаружение бактерий группы кишечной палочки (колиформных бактерий) в значительных количествах служит показателем загрязнения почвы фекалиями человека и животных и свидетельствует об ее санитарно-эпидемиологическом неблагополучии из-за возможности передачи возбудителей кишечных инфекций. Многочисленные грибы почвы участвуют в почвообразовательных процессах, превращениях соединений азота, выделяют биологически активные вещества, в том числе антибиотики и токсины. Токсинообразующие грибы, попадая в продукты питания человека, вызывают интоксикации — микотоксикозы. Количество простейших в почве колеблется от 500 до 500 000 на 1 г почвы. Питаясь бактериями и органическими остатками, простейшие вызывают изменения в составе органических веществ почвы.

**Микрофлора воды**

Микрофлора воды отражает микробный пейзаж почвы. В воде формируются биоценозы с преобладанием микроорганизмов, адаптировавшихся к условиям местонахождения. Вода пресных водоемов содержит различные бактерии: палочковидные (псевдомонады, аэромонады и др.), кокковидные (микрококки), извитыеи нитевидные (актиномицеты). Загрязнение воды органическими веществами сопровождается увеличением числа анаэробных и аэробных бактерий, а также грибов. Особенно много анаэробов в иле, на дне водоемов. Микрофлора воды выполняет роль активного фактора в процессе самоочищения ее от органических отходов, которые утилизируются микроорганизмами. Вместе с загрязненными ливневыми, талыми и сточными водами в озера и реки попадают представители нормальной микрофлоры человека и животных (индикаторы фекального загрязнения — кишечная палочка, цитробактер, энтеробактер, энтерококки, клостридии) и возбудители кишечных инфекций (брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, лептоспироза, энтеровирусных инфекций и др.). Таким образом, вода является фактором передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний. Некоторые возбудители могут даже размножаться в воде (холерный вибрион, легионеллы).

В микрофлоре воды океанов и морей также представлены различные микроорганизмы, в том числе архебактерии, светящиеся и галофильные (солелюбивые), например галофильные вибрионы, поражающие моллюсков и некоторые виды рыб, при употреблении которых в пищу развивается пищевая токсикоинфекция. Вода артезианских скважин практически не содержит микроорганизмов, так как последние обычно задерживаются верхними слоями почвы.

**Микрофлора воздуха**

Микрофлора воздуха взаимосвязана с микрофлорой почвы, воды, человека и животных. С воздухом разносятся кокковидные и палочковидные бактерии, бациллы, клостридии, актиномицеты, грибы и вирусы. Солнечные лучи и другие факторы способствуют гибели микрофлоры воздуха. Большее количество микроорганизмов присутствует в воздухе крупных городов, меньшее — в воздухе сельской местности. Особенно мало микроорганизмов в воздухе над лесами, горами и морями. Состав и численность микроорганизмов воздуха закрытых помещений зависят от условий уборки помещения, уровня освещенности, количества людей в помещении, частоты проветривания и др. С целью снижения микробной обсемененности воздуха проводят влажную

уборку и обработку помещений лампами УФ-излучения, аэрозольную дезинфекцию в сочетании с вентиляцией и очисткой (фильтрацией) поступающего воздуха (например, в микробиологических лабораториях и операционных блоках).

**Микрофлора продуктов питания**

Пищевые продукты могут обсеменяться различными микроорганизмами. В случае продуктов животного происхождения различают **первичное** (прижизненное) загрязнение собственной микрофлорой, присущей животному, и **вторичное**, возникающее в результате попадания микроорганизмов при забое животных, доении коров, отлове рыбы, при переработке и хранении продуктов. Прижизненное обсеменение органов и тканей животного собственной микрофлорой и патогенными микроорганизмами происходит при заболевании животного, при травмах или неблагоприятных условиях их содержания, что способствует нарушению защитных барьеров организма и транслокации (пе- реносу) микроорганизмов в обычно стерильные ткани и органы. В результате на свежезабитых тушах животных выявляются стафилококки, энтерококки, кишечные палочки, протей, клостридии, сальмонеллы и др. Таким образом происходит обсеменение мяса сальмонеллами и клостридиями и другими бактериями; попадание при маститах в молоко стафилококков и стрептококков. В случае вторичного обсеменения микроорганизмами пищевых продуктов источником загрязнения являются объекты окружающей среды (почва, вода, транспорт и т.д.), а также люди — больные и бактерионосители. При низкой температуре хранения мяса и мясных продуктов даже в замороженном мясе могут преобладать микробы, способные к размножению в психрофильных условиях (псевдомонады, протей, аспергиллы, пенициллы и др.). Микробы, обитающие в мясе, вызывают его ослизнение (протей и др.); в нем развиваются процессы брожения и гниения, вызванные клостридиями, протеем, псевдомонадам и грибами. Пищевые продукты, загрязненные микроорганизмами, могут обусловливать самые разнообразные пищевые токсикоинфекции и интоксикации, а также такие инфекционные болезни, как сибирская язва, бруцеллез, туберкулез и др. Мясные блюда (студни, салаты из мяса, блюда из мясного фарша) могут стать причиной заболеваний, связанных с размножившимися в них сальмонеллами, шигеллами, диареягенными кишечными палочками, протеем, энтеротоксигенными штаммами стафилококков, энтерококками, *Closlridium perfringens* и *Bacillus cereus.* Молоко и молочные продукты могут быть фактором передачи возбудителей бруцеллеза, туберкулеза и шигеллеза. Возможно также развитие пищевых отравлений в результате размножения в молочных продуктах сальмонелл, шигелл и стафилококков. Яйца, яичный порошок и меланж при эндогенном первичном инфицировании сальмонеллами яиц, особенно утиных, являются причиной сальмонеллезной токсикоинфекции. Рыба и рыбные продукты чаще оказываются загрязненными бактериями *Closlridium botulinum* и *Vibrio parahaemolylicus —* возбудителями пищевых токсикоинфекций. Эти заболевания наблюдаются и при употреблении рыбных продуктов, загрязненных большим количеством сальмонелл, протея, *Bacillus cereus*, *Closlridium perfringens.* Овощи и фрукты, как правило, загрязняются и обсеменяются шигеллами, диарее генными кишечными палочками, протеем, энтеропатогенными штаммами стафилококков. Соленые огурцы могут быть причиной токсикоинфекции, вызванной *V. parahаemolyticus.* Злаковые культуры, орехи в условиях повышенной влажности могут загрязняться грибами (аспергиллами, пенициллами, фузариум и др.), что служит причиной развития пищевых микотоксикозов.

**Роль микробов в круговороте веществ в природе**

Органические соединения растительного и животного происхождения минерализуются микроорганизмами до углерода, азота, серы, фосфора, железа и других элементов.

**Круговорот углерода*.*** Активное участие в круговороте углерода принимают растения, водоросли и цианобактерии, фиксирующие СО2 в процессе фотосинтеза, а также микроорганизмы, разлагающие органические вещества отмерших растений и животных с выделением СО2. При аэробном разложении органических веществ образуются СО2 и вода, а при анаэробном брожении — кислоты, спирты, СО2. Так, при спиртовом брожении микроорганизмы (дрожжи и др.) расщепляют углеводы до этилового спирта и диоксида углерода. Молочнокислое брожение, вызываемое молочнокислыми бактериями, характеризуется выделением молочной, уксусной кислот и диоксида углерода. Процессы пропионовокислого (вызываемого пропионибактериями), маслянокислого, ацетонобутилового (вызываемых клостридиями) и других видов брожения сопровождаются образованием различных кислот и диоксида углерода.

**Круговорот азота.** Атмосферный азот связывают клубеньковые бактерии и свободноживущие микроорганизмы почвы. 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, или минерализации азота. Белок разрушают псевдомонады, протей, бациллы и клостридии. При аэробном распаде белков образуются аммиак, сульфаты, диоксид углерода и вода, при анаэробном — аммиак, амины, диоксид углерода, органические кислоты, индол, скатол, сероводород. Разложение мочевины, выделяющейся с мочой, осуществляют уробактерии, расщепляющие ее до аммиака, диоксида углерода и воды. Образующиеся аммонийные соли в результате ферментации бактериями органических соединений могут использоваться высшими зелеными растениями. Но наиболее усвояемыми для растений являются нитраты — азотнокислые соли. Эти соли образуются при распадеорганических веществ в процессе окисления аммиака до азотистой, а затем азотной кислоты. Данный процесс называется *нитрификацией*, а микроорганизмы, его вызывающие, — *нитрифицирующими.* Нитрифицирующие бактерии выделил и описал русский ученый С.Н. Виноградский (1890–1892). Нитрификация проходит в две фазы: первую фазу осуществляют бактерии рода *Nitrosomonas* и др., при этом аммиак окисляется до азотистой кислоты, образуются нитриты; во второй фазе участвуют бактерии рода *Nitrobacter* и др., при этом азотистая кислота окисляется до азотной и превращается в нитраты. Нитраты повышают плодородие почвы, однако существует и обратный процесс: нитраты могут восстанавливаться в результате процесса *денитрификации* до выделения свободного азота, что обедняет его запас в виде солей в почве, приводя к снижению ее плодородия.

**Микрофлора организма человека**

Человек заселен (колонизирован) примерно 1000 видами микробов, составляющими его нормальную микрофлору, в виде сообщества (микробиоценоза) массой около 2 кг, содержащего 1014 особей (наше тело содержит только ~1013 клеток!), причем преобладают облигатные анаэробы. Микробы находятся в состоянии равновесия (**эубиоза**) друг с другом и организмом человека. Большинство из них являются **комменсалами**, не причиняющими вреда человеку. Организм человека проявляет **пероральную (оральную, региональную) толерантность** к собственной нормальной микрофлоре. Эта толерантность обусловлена блокадой активации сигнальных рецепторов (TLR и др.) к компонентам микрофлоры человека и активностью регуляторных T-лимфоцитов (TReg). Срыв оральной толерантности влечет развитие патологии (хронического гастрита, болезни Крона, неспецифического язвенного колита и др.). Микрофлора колонизирует поверхность тела и полости, сообщающиеся с окружающей средой. В норме микробы отсутствуют в легких, матке и внутренних органах. Различают постоянную и транзиторную микрофлору. **Постоянная микрофлора** (резидентная, индигенная, или автохтонная) представлена микробами, постоянно присутствующими в организме. **Транзиторная микрофлора** (непостоянная, или аллохтонная) не способна к длительному существованию в организме. Постоянную микрофлору можно разделить на облигатную и факультативную. **Облигатная** **микрофлора** (бифидобактерии, лактобактерии, бактероиды, кишечные палочки и др.) является основой микробиоценоза, а **факультативная микрофлора** (стафилококки, стрептококки, клебсиеллы, клостридии, некоторые грибы и др.) включает меньшую часть микробиоценоза. Представители нормальной микрофлоры слизистых оболочек заключены в высокогидратированный экзополисахаридно-муциновый матрикс, образуя **биологическую пленку**, устойчивую к различным воздействиям. Плотностьпопуляции микробов и их взаимоотношения определяются понятием Quorum Sensing (QS), или ≪ощущение кворума≫ (чувство локтя).

**Кожа.** На коже и в ее более глубоких слоях (волосяных мешочках, протоках сальных и потовых желез) анаэробов в 2–10 раз больше, чем аэробов. Кожу колонизируют\* грамположительные бактерии (пропионибактерии, коринеформные бактерии, эпидермальные стафилококки и другие коагулазоотрицательные стафилококки, микрококки, стрептококки, пептострептококки, *Dermabacter hominis*), а также некоторые грамотрицательные бактерии (рода *Acinetobacter* и др.) и дрожжеподобные грибы рода *Malassezia.* Реже встречается транзиторная микрофлора: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* и др*.* При ослаблении организма на коже возрастает количество бактерий, появляются вирусы простого герпеса, папилломавирусы и грибы.

**Конъюнктивы** содержат небольшое количество коринеформных бактерий и стафилококков из-за действия лизоцима и других бактерицидных факторов слезной жидкости.

**Верхние дыхательные пути** содержат бактероиды, коринеформные бактерии, гемофильные палочки, лактобактерии, стафилококки, стрептококки, нейссерии, пептококки, пептострептококки и др. Трахея, бронхи и альвеолы обычно стерильны.

**Рот.** Ассоцианты нормальной микрофлоры и продукты их жизнедеятельности образуют зубной налет (бляшки). В 1 мл слюны обитает до 108 бактерий, чему способствуют остатки пищи во рту, благоприятная температура (37 С) и щелочная реакция среды. Анаэробов больше, чем аэробов, в 10 и более раз. Преобладают бактерии: бактероиды, превотеллы, порфиромонады, бифидобактерии, эубактерии, фузобактерии, лактобактерии, актиномицеты, гемофильные палочки, лептотрихии, нейссерии, стрептококки, стафилококки, пептококки, пептострептококки, вейлонеллы, спирохеты и др. Обнаруживаются также грибы рода *Candida* и простейшие (*Entamaeba gingivalis*, *Trichomonas tenax*). Бактерии имеют определенное топографическое распространение, в том числе и в зубной бляшке. В развитии зубной бляшки сначала участвуют стрептококки (*S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis* и *S. sanguinis*), связывающиеся со слюнными рецепторами (муцин, пролин-богатый протеин, 􀁄-амилаза, слюнной агглютинин) на пелликуле, покрывающей зубную поверхность. Позднее связываются и коагрегируют другие бактерии (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella denticola*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola*, *Capnocytophaga spp.*, *Actinomyces spp.*, *Aggregatibacter* *actinomycetemcomitans* и др.)*.* Актиномицеты присутствует в больших количествах на языке, десневых карманах, в зубной бляшке и слюне. Состав микрофлоры рта регулируется механическим действием слюны и языка; микробы смываются слюной со слизистой оболочки и зубов. Антимикробные пептиды и антитела (секреторный IgA) подавляют адгезию посторонних микробов к эпителиоцитам. С другой стороны, бактерии образуют полисахариды: *S. sanguinis* и *S. mutans* преобразуют сахарозу во внеклеточный полисахарид (глюканы, декстраны), участвующий в адгезии к поверхности зубов. Колонизации постоянной частью микрофлоры способствует фибронектин, покрывающий эпителиоциты и обладающий сродством к грамположительным бактериям.

**Пищевод** практически не содержит микроорганизмы.

В **желудке** имеются лактобациллы, дрожжи, единичные кокки и грамотрицательные бактерии. Концентрация бактерий меньше 103 клеток на 1 мл, так как желудочный сок имеет низкое значение рН, неблагоприятное для многих микробов. Желудок в норме это своеобразная стерилизационная камера (соляная кислота, пепсиноген — предшественник пепсина и др.), подавляющая патогенные микробы. При гастритах, язвенной болезни желудка обнаруживаются изогнутые бактерии рода *Helicobacter*, которые являются этиологическими факторами многих патологических процессов (гастрит, язвы, опухоли).

**Тонкая кишка** содержит 104–107 микробов на 1 мл содержимого. Здесь обнаруживаются бифидобактерии, лактобактерии, клостридии, эубактерии, энтерококки, анаэробные кокки, порфиромонады, превотеллы.

**Толстая кишка** содержит больше бактерий (1010–1012 на 1 г фекалий), чем тонкая кишка*.* Около 95% всех видов микробов составляют анаэробные бактерии. Основными представителями микрофлоры толстой кишки являются:

 анаэробные грамположительные палочки (бифидобактерии, лактобацил-

лы, эубактерии);

грамположительные спорообразующие анаэробные палочки (*Clostridium perfringens* и др.); энтерококки;

 анаэробные грамположительные (руминококки, пептострептококки, пептококки, гемеллы) и грамотрицательные (аккермансии) кокки;

анаэробные грамотрицательные палочки (бактероиды, превотеллы, порфиромонады);

факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки (кишечные палочки и сходные с ними бактерии семейства *Enterobacteriaceae* — цитробактер, энтеробактер, клебсиеллы, протей и др.);

метанококки и другие метанопродуцирующие археи (архебактерии);

на эпителии успешно растут спирохеты.

В меньших количествах обнаруживаются фузобактерии, порфиромонады, пропионибактерии, вейлонеллы, стафилококки, синегнойная палочка и грибы рода *Candida* (*C. glabrata*, *С. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*). Количество простейших (*Blastocystis hominis*, *Chilomastix mesnili*, *Endolimax* *nana*, *coli*, *hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Enteromonas hominis*, *Iodamoeba butschlii*,

*Retortamonas intestinalis* и *Trichomonas hominis*) колеблется в норме, в зависимости от диеты и действия факторов окружающей среды. Рост посторонней микрофлоры задерживается в результате антагонистических свойств нормальной микрофлоры и блокирующего действия секреторного IgA и антимикробных пептидов. У младенцев угнетающим действием также обладает лактоферрин, поступающий с грудным молоком матери. Специализированные эпителиальные клетки (бокаловидные клетки) выделяют **муцин,** собирающийся в гельподобном слое, который простирается вплоть до 150 мкм от поверхности кишечной эпителиальной клетки. Формируются два структурно четких слоя муцина: **внутренний слой муцина** формирует защищенную зону в апикальной поверхности эпителиоцита, тогда как **внешний** **слой муцина** содержит большие количества бактерий. Внутренний слой стойкий к бактериальному проникновению, ограничивает прямой контакт бактерий с эпителиоцитами

**Микрофлора ЖКТ новорожденных.** ЖКТ новорожденного стерилен, но уже через сутки он заселяется микроорганизмами, попадающими в организм ребенка от матери, медицинского персонала и окружающей среды. Через 48 ч после рождения общее количество бактерий достигает 109 клеток и более в 1 г фекалий: происходит заселение кишечника лактобактериями, энтеробактериями, стафилококками, энтерококками, вслед за которыми появляются анаэробы (бифидобактерии и бактероиды). На 9–10-е сутки жизни в кишечнике начинают преобладать бифидобактерии, составляющие впоследствии основу микробного пейзажа. Микрофлора детей первого года жизни содержит (наряду с бифидобактериями, энтерококками, непатогенными эшерихиями и некоторыми другими, вместе формирующими состояние эубиоза) и бактерии, которые могут нарушить это состояние и привести к развитию эндогенной инфекции. Такими группами бактерий являются коагулазопозитивные стафилококки, лецитиназопозитивные клостридии, грибы рода *Candida*, цитратассимилирующие энтеробактерии и эшерихии с низкой биохимической активностью, а также со способностью к продукции гемолизинов. К концу первого года жизни происходит частичная или полная элиминация этих бактерий.

**Мочеполовой тракт.** Почки, мочеточники, мочевой пузырь, матка, простата обычно стерильны. Микрофлора наружных гениталий представлена эпидермальными стафилококками, коринеформными бактериями, зеленящими стрептококками, сапрофитическими микобактериями (*Mycobacterium smegmatis*), кандидами и энтеробактериями. На слизистой оболочке передней уретры встречаются в норме стафилококки, непатогенные нейссерии, коринеформные бактерии, сапрофитные трепонемы и др.

**Влагалище** включает лактобактерии, бифидобактерии, бактероиды, пропионибактерии, порфириномонады, превотеллы, пептострептококки, коринеформные бактерии и др. Преобладают анаэробы: соотношение анаэробы/

аэробы составляет 10:1. В репродуктивный период жизни преобладают грамположительные бактерии, а в период менопаузы она заменяется грамотрицательными бактериями. Примерно у 5–60% здоровых женщин выявляются*Gardnerella vaginalis*; у 15–30% — *Mycoplasma hominis*; у 5% — бактерии рода *Mobiluncus*. Состав микрофлоры зависит от многих факторов: менструального цикла, беременности и др. В клетках влагалищного эпителия накапливается гликоген (способствуют эндогенные эстрогены), расщепляемый лактобактериями с образованием молочной кислоты. Образующиеся органические кислоты подкисляют среду до рН 4–4,6. Подкисление лактобактериями вагинального секрета, продукция ими перекиси водорода и бактериоцинов ведет к подавлению роста посторонней микрофлоры.

**Значение микрофлоры организма человека**

Нормальная микрофлора — важный ***фактор врожденного иммунитета****.* Она обладает антагонистическими свойствами против патогенной и гнилостной микрофлоры, так как продуцирует молочную, уксусную кислоты, антибиотики, микробный лизоцим, бактериоцины; конкурирует с посторонней микрофлорой

за счет более высокого биологического потенциала.

**Антигены микрофлоры стимулируют иммунную систему. Естественным**

**стимулятором является *мурамилдипептид)***, образующийся из пептидогликана бактерий под влиянием лизоцима и других антимикробных пептидов кишечника. Компоненты микробов (например, лактобактерий), взаимодействуя с макрофагами барьерных тканей, индуцируют продукцию IL-12, который способствует дифференцировке TH0 в TH1 и подавляет продукцию IgE. Бактериальные короткоцепочечные жирные кислоты усиливают местный иммунитет и синтез нейромедиаторов. Животные гнотобионты, живущие в среде, свободной от микроорганизмов, отличаются слаборазвитой лимфоидной тканью и повышенной чувствительностью к инфекциям. Микрофлора участвует в **колонизационной резистентности**, которая является совокупностью защитных факторов организма и конкурентных, антагонистических и других свойств нормальной микрофлоры (в основном анаэробов) кишечника, придающих стабильность микрофлоре и предотвращающих колонизацию организма посторонними микробами. При снижении колонизационной резистентности увеличивается количество и спектр аэробных условно-патогенных микробов. Их транслокация через слизистые оболочки может привести к развитию эндогенного гнойно-воспалительного процесса. Для нормализации колонизационной резистентности проводят **селективную деконтаминацию** — избирательное удаление из пищеварительного тракта аэробных бактерий и грибов. Ее осуществляют путем приема внутрь малоадсорбируемых химиопрепаратов, подавляющих аэробную часть микрофлоры и не влияющих на анаэробы, например комплексное назначение ванкомицина, гентамицина и нистатина. Нормальная микрофлора участвует в водно-солевом обмене, регуляции газового состава и перистальтики кишечника, обмене белков, углеводов, жирныхкислот, холестерина, нуклеиновых кислот, а также в продукции биологически активных соединений: антибиотиков, витаминов (K, группы В и др.), токсинов и др. Нормальная микрофлора участвует в переваривании и детоксикации экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов, что сравнимо с функцией печени; недавно описанные виды родов *Bacteroides*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, а так-же *Bifidobacterium adolescentis* расщепляют целлюлозу и другие полисахариды, поддерживая высокие плотности бактерий в толстой кишке. Нормальная микрофлора участвует в рециркуляции стероидных гормонов и желчных солей в результате экскреции метаболитов из печени в кишечник и последующего возврата в нее. Она выполняет морфокинетическую роль в развитии различных органов и систем организма, участвует в физиологическом воспалении слизистой оболочки и смене эпителия, а также тепловом обеспечении организма. Нормальная микрофлора выполняет антимутагенную функцию, разрушая канцерогенные вещества в кишечнике. В то же время некоторые бактерии могут продуцировать сильные мутагены. Ферменты бактерий кишечника преобразуют искусственный подсластитель цикломат в активный канцероген (циклогек- самин) для мочевого пузыря. Экзополисахариды (гликокаликс) микробов, входящие в состав биологической пленки, защищают их от разнообразных физико-химических воздействий. Слизистая оболочка кишечника также находится под защитой биологической пленки. При снижении сопротивляемости организма микробы-комменсалы вызывают гнойно-воспалительные процессы (аутоинфекция, или эндогенная инфекция). Оказываясь при транслокации в непривычных местах обитания, они могут вызывать различные нарушения.

В результате действия микробных декарбоксилаз и ЛПС высвобождается дополнительное количество гистамина, что может вызывать аллергические состояния. Нормальная микрофлора — хранилище и источник хромосомных и плазмидных генов, в частности генов лекарственной устойчивости к антибиотикам. Отдельных представителей нормальной микрофлоры используют в качестве *санитарно-показательных микроорганизмов*, свидетельствующих о загрязнении окружающей среды (воды, почвы, воздуха, продуктов питания и др.) выделениями человека и, следовательно, об их эпидемиологичекой опасности.

**Дисбактериоз и дисбиоз**

**Дисбактериоз и дисбиоз** — состояния, развивающиеся в результате утраты нормальных функций микрофлоры*.* Эти нарушения определяются как клинико лабораторный синдром. Они происходят под влиянием внешних факторов, стрессовых воздействий, бесконтрольного применения антимикробных препаратов, лучевой терапии и химиотерапии, нерационального питания, оперативных вмешательств и т.д. При ***дисбактериозе*** происходят количественные и качественные изменения бактерий, входящих в состав нормальной микрофлоры. При ***дисбиозе*** изменения происходят и среди других групп микроорганизмов (вирусов, грибов и др.). Дисбиозы классифицируют по этиологии (грибковый, стафилококковый, протейный и др.) и по локализации (дисбиоз рта, кишки, влагалища и т.д.). Различают дисбиоз тонкой (синдром избыточного роста бактерий — СИБР, Bacterial overgrowth syndrome) и толстой кишки. Изменения нормальной микрофлоры сопровождаются различными нарушениями: развитием инфекций, диареи, запора, синдрома мальабсорбции, гастрита, колита, язвенной болезни, злокачественных новообразований, аллергии, мочекаменной болезни, гипо- и гиперхолестеринемии, гипо- и гипертензии, кариеса, артрита, поражений печени и др. Диагностика нарушений микробиоценоза проводится с помощью бактериологического метода, ПЦР-диагностики, хроматомасс-спектрометрии и исследования метаболитов. Перспективен метод газожидкостной хроматографии, основанный на определении короткоцепочечных жирных кислот — метаболитов, в основном анаэробов.

Определение видового и количественного состава представителей микробиоценоза некоторого биотопа (кишки, рта, влагалища, кожи и т.д.) проводится путем высева из разведений исследуемого материала или путем отпечатков, смыва на соответствующие питательные среды (среда Блаурокка — для бифидобактерий; среда МРС-2 — для лактобактерий; анаэробный кровяной агар —для бактероидов; среда Левина или Эндо — для энтеробактерий; желчно- кровя- ной агар — для энтерококков; кровяной агар — для стрептококков и гемофилов;

мясопептонный агар с фурагином — для синегнойной палочки, среда Сабуро —

для грибов и др.). Возможно определение в исследуемом материале микробных метаболитов —маркеров дисбиоза (жирных кислот, гидроксижирных кислот, жирнокислотных альдегидов, ферментов и др.). Например, обнаружение в фекалиях 􀁅-аспартил-глицина и 􀁅-аспартил-лизина свидетельствует о нарушении кишечного микробиоценоза, так как в норме эти дипептиды метаболизируются кишечной анаэробной микрофлорой.

Для восстановления нормальной микрофлоры проводят селективную деконтаминацию и назначают *per os* различные препараты:

􀁸 **пребиотики** — вещества немикробного происхождения или компоненты микробов, стимулирующие рост нормальной микрофлоры человека;обычно основой пребиотика служат низкомолекулярные углеводы (олигосахариды, фруктоолигосахариды), содержащиеся в грудном молоке и в некоторых пищевых продуктах; **пробиотики** (эубиотики) — препараты, содержащие живые бактерии, представителей нормальной микрофлоры кишечника, оказывающие нормализи-

рующее действие на организм человека и его микрофлору: бифидобактерии

(бифидумбактерин), кишечные палочки (колибактерин), лактобактерии (лактобактерин) и др. Другая группа пробиотиков — самоэлиминирующиеся антагонистические микроорганизмы, в норме не обитающие в организме человека (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Saccharomyces boulardii*);

􀁸 **синбиотики** — комбинированные препараты, состоящие из пробиотиков и пребиотиков;

􀁸 **энтеросорбенты** — препараты, удаляющие из кишечника токсичные метаболиты и условно-патогенные бактерии (активированный уголь, энтеросгель и др.).

**Влияние факторов окружающей среды на микробы**

Физические, химические и биологические факторы окружающей среды оказывают различное воздействие на микроорганизмы: бактерицидное — приводящее к гибели клетки; бактериостатическое — подавляющее размножение микроорганизмов; мутагенное — изменяющее наследственные свойства микробов.

**Влияние температуры*.*** Представители различных групп микроорганизмов

развиваются в определенных диапазонах температур. Бактерии, растущие при низкой температуре, называют психрофилами; при средней (около 37 С) — мезофилами; при высокой — термофилами.

***Психрофилы*** растут при температуре от –10 до 40 С; температурный оптимум колеблется от 15 до 40 С, приближаясь к температурному оптимуму мезофильных бактерий. К психрофилам относится большая группа сапрофитов —обитателей почвы, морей, пресных водоемов и сточных вод (железобактерии, псевдомонады, светящиеся бактерии, бациллы). Некоторые психрофилы могут

вызывать порчу продуктов питания на холоде. Способностью расти при низких температурах обладают и некоторые патогенные бактерии (возбудитель псевдотуберкулеза размножается при температуре 4 С, а возбудитель чумы — в диапазоне от 0 до 40 С при оптимуме роста 25 С). В зависимсти от температуры культивирования свойства бактерий меняются. Так, *Serratia marcescens* образует при температуре 20–25 С большее количество красного пигмента (продигиозана), чем при температуре 37С. Возбудитель чумы, выращенный при 25 С, вирулентнее, чем при 37 С. Синтез полисахаридов, в том числе капсульных, активизируется при более низких температурах культивирования.

***Мезофилы*** растут в диапазоне температур от 10 до 47 С, оптимум роста около 37 С. Они включают в себя основную группу патогенных и условно-патогенных бактерий. ***Термофилы*** существуют при более высоких температурах (от 40 до 90 С). На дне океана в горячих сульфидных водах живут бактерии, развивающиеся при температуре 250–300 С и давлении 265 атм. Термофилы обитают в горячих источниках, участвуют в процессах самонагревания навоза, зерна, сена. Наличие большого количества термофилов в почве свидетельствует о ее загрязненности навозом и компостом. Поскольку навоз наиболее богат термофилами, их рассматривают как показатель загрязненности почвы. Температурный фактор учитывается при осуществлении стерилизации. Вегетативные формы бактерий погибают при температуре 60 С в течение 20–30 мин, споры — в автоклаве при 120 С в условиях пара под давлением. Микроорганизмы хорошо переносят действие низких температур. Поэтому их можно долго хранить в замороженном состоянии, в том числе при температуре жидкого азота (–173 С).

**Высушивание.** Обезвоживание вызывает нарушение функций большинства микроорганизмов. Наиболее чувствительны к высушиванию возбудители гонореи, менингита, холеры, брюшного тифа, дизентерии и другие патогенные микроорганизмы. Более устойчивы микроорганизмы, защищенные слизью мокроты. Так, бактерии туберкулеза в мокроте выдерживают высушивание до 90 дней. Устойчивы к высушиванию некоторые капсуло- и слизеобразующие бактерии. Особой устойчивостью обладают споры бактерий. Например, споры возбудителя сибирской язвы могут сохраняться в почве столетиями. Для продления жизнеспособности при консервировании микроорганизмов используют ***лиофилизацию*** — высушивание под вакуумом из замороженного состояния. Лиофилизированные культуры микроорганизмов и иммунобиологические препараты длительно (в течение нескольких лет) сохраняются, не изменяя своих первоначальных свойств.

**Действие излучения.** Ионизирующее излучение применяют для стерилизации одноразовой пластиковой микробиологической посуды, питательных сред, перевязочных материалов, лекарственных препаратов и др. Однако имеются бактерии, устойчивые к действию ионизирующего излучения, например *Micrococcus radiodurans* был выделен из ядерного реактора. Неионизирующее излучение — ультрафиолетовые и инфракрасные лучи солнечного света, а также ионизирующее излучение — 􀁊-излучение радиоактивных веществ и электроны высоких энергий губительно действуют на микроорганизмы уже через короткий промежуток времени. Ультрафиолетовые (УФ) лучи, достигающие поверхности земли, имеют длину волны 290 нм. УФ-лучи применяют для обеззараживания воздуха и различных предметов в больницах, родильных домах, микробиологических лабораториях. С этой целью используют бактерицидные лампы ультрафиолетового излучения с длиной волны 200–400 нм.

**Химические вещества** могут оказывать различное действие на микроорганизмы: служить источниками питания; не оказывать какого-либо влияния; тимулировать или подавлять рост, вызывать гибель. Антимикробные химические вещества используются в качестве антисептических и дезинфицирующих средств, так как обладают бактерицидным, вирулицидным, фунгицидным действием и т.д. Химические вещества, используемые для дезинфекции, относятся к различным группам, среди которых наиболее широко представлены хлор-, йод- и бромсодержащие соединения и окислители.

**Влияние биологических факторов.** Микроорганизмы находятся в различных взаимоотношениях друг с другом. Совместное существование двух различных организмов называется *симбиозом* (от греч. *simbiosis —* совместная жизнь). Различают несколько вариантов полезных взаимоотношений: метабиоз, мутуализм, комменсализм, сателлизм.

***Метабиоз*** *—* взаимоотношение микроорганизмов, при котором один из них использует для своей жизнедеятельности продукты жизнедеятельности другого. Метабиоз характерен для почвенных нитрифицирующих бактерий, использующих для своего метаболизма аммиак — продукт жизнедеятельности аммонифицирующих почвенных бактерий.

***Мутуализм*** *—* взаимовыгодные взаимоотношения разных орга низмов. При мером мутуалистического симбиоза служат лишайники — симбиоз гриба и сине-зеленой водоросли. Получая от клеток водоросли органические вещества, гриб, в свою очередь, поставляет им минеральные соли и защищает от высыхания.

***Комменсализм*** (от лат. *commensalis* — сотрапезник) — сожительство особей разных видов, при котором выгоду из симбиоза извлекает один вид, не причиняя другому вреда. Комменсалами являются бактерии — представители нормальной микрофлоры человека.

***Сателлизм*** *—* усиление роста одного вида микроорганизма под влиянием другого вида. Например, колонии дрожжей или сарцин, выделяя в питательную среду метаболиты, стимулируют рост вокруг них колоний других микроорганизмов. При совместном росте нескольких видов микроорганизмов могут активизироваться их физиологические функции и свойства, что приводит к более быстрому воздействию на субстрат.

***Антагонистические взаимоотношения***, или ***антагонистический симбиоз***, выражаются в виде неблагоприятного воздействия одного вида микроорганизма на другой, приводящего к повреждению и даже гибели последнего.Микроорганизмы-антагонисты распространены в почве, воде и в организме человека и животных. Хорошо известна антагонистическая активность против посторонней и гнилостной микрофлоры представителей нормальной микрофлоры толстого кишечника человека — бифидобактерий, лактобактерий, кишечнойпалочки и др.Механизм антагонистических взаимоотношений разнообразен. Распро страненной формой антагонизма является образование ***антибиотиков*** — специфических продуктов обмена микроорганизмов, подавляющих развитие микроорганизмов других видов. Существуют и другие проявления антагонизма, напримербольшая скорость размножения, продукция ***бактериоцинов***, в частности ***колицинов***, продукция органических кислот и других продуктов, изменяющих рНсреды.

Антагонизм может развиваться в форме ***конкуренции*** в основном за источники питания: интенсивно развиваясь и истощая питательную среду, микроорганизм-антагонист подавляет рост других микроорганизмов. При ***хищничестве*** микроорганизм, например амеба кишечника, захватывает и переваривает бактерии кишечника. Наконец, такая форма антагонизма, когда микроорганизм использует другой организм как источник питания, называется ***паразитизмом***. Примером паразитизма является взаимоотношение бактериофага и бактерии, а также взаимоотношение бделловибрионов (маленькие бактерии, паразиты обычных грамотрицательных бактерий).

**Уничтожение микробов в окружающей среде**

Посторонние микробы, содержащиеся на различных предметах и в материалах, уничтожают с помощью стерилизации и дезинфекции.

**Стерилизация**

**Стерилизация** (от лат. *sterilis* — бесплодный) — полное уничтожение микробов или полное их удаление (элиминация) из объекта. Различают тепловую, химическую, лучевую стерилизацию и стерилизацию фильтрованием.

**Тепловая стерилизация** основана воздействием высокой температуры и пара споры погибают уже при 121 C в течение 15–20 мин (они могут выдерживать температуру 100 C до 5 ч). Гипертермофильные формы архебактерий размножаются при температуре 100 C и выше, поэтому они могут выдерживать автоклавирование при 121 C в течение одного часа. Эти экстремальные жизненные формы, наряду с прионами, не поддаются стандартной стерилизации. Для инактивации прионов требуется иной режим, например автоклавирование при 121 C в течение 4 ч или при 134 C в течение 30 минут. В паровом стерилизаторе стерилизуют перевязочный материал, металлические инструменты, питательные среды, растворы, инфекционный материал, белье и т.д.

**Дробная стерилизация** (тиндализация) проводится нагреванием объектов при 70–80 C в течение 30–60 мин для уничтожения вегетативных форм микробов. Процедуру повторяют три дня подряд, причем после каждого прогревания объект выдерживают в термостате для прорастания спор. Метод применяют для обработки материалов, не выдерживающих температуру выше 100 C, например питательных сред с углеводами.

**Химическая стерилизация** основана на использовании токсичных газов: оксида этилена, смеси ОБ (смеси оксида этилена и бромистого метила) и формальдегида. Эти вещества являются алкилирующими агентами, инактивирующими активные группы в ферментах, других белках, а также нуклеиновые кислоты, что приводит к гибели микроорганизмов. Стерилизация осуществляется паром при температуре от 20 до 60 C в специальных камерах. Газ обладает высокой проницаемостью. В больницах используют формальдегид, в промышленных условиях оксид этилена и смесь ОБ. Химическую стерилизацию используют для объектов, которые могут быть повреждены нагреванием (например, оптические приборы, электронная аппаратура, предметы из нетермостойких полимеров, питательные среды с белком и т.п.). Для стерилизации изделий из термолабильных материалов, снабженных оптическими устройствами, например эндоскопов, применяют обезвреживание с помощью химических растворов (стериллянтов). Простерилизованныйи отмытый от стерилизующего раствора объеквысушивают и помещают в стерильную емкость, соблюдая асептические условия. Стерилизованные объекты хранят не более 3 суток. Формальдегид (HCHO) — основной альдегид, используемый в специальной аппаратуре для стерилизации. Другой альдегид — глютаральдегид. Их используют также как основу фиксаторов и консервантов.

**Лучевая стерилизация** позволяет обрабатывать сразу большое количество предметов (например, одноразовых шприцев, инструментов, систем для переливания крови и т.д.). Она основана на использовании γ-излучения (источник — радиоактивные изотопы) или ускоренных электронов. Гибель микробов под действием γ-лучей и ускоренных электронов происходит в результате повреждения нуклеиновых кислот.

**Стерилизация фильтрованием** осуществляется с помощью различных фильтров (нитроцеллюлозных, керамических, асбестовых, стеклянных). Она позволяет освободить жидкости (питательные среды, сыворотку крови, лекарства) от микробов. Лучшими из всех известных типов являются мембранные фильтры.

В настоящее время все более широкое применение находят современные методы стерилизации, созданные на основе новых технологий, с использованием ионизированной плазмы, озона и др.

**Контроль стерилизации** проводится:

􀁸 микробиологическим методом путем посева части объекта стерилизации на среды для аэробных и анаэробных бактерий, а также грибов (в повседневной практике не производится);

􀁸 по изменению окраски химических индикаторов (либо индикаторных бумажек, либо порошков, жидкостей — бензойной кислоты, мочевины, запаянных в ампулы), которые помещают на поверхности и в глубине стерилизуемого объекта;

􀁸 с помощью биотестов, например из термоустойчивых штаммов спорообразующих бацилл (*Вас. stearothermophilus*, *Вас. licheniformis*), помещаемых внутрь стерилизуемых предметов;

􀁸 путем технического контроля аппаратуры соответствующей службой.

**Дезинфекция**

**Дезинфекция** (от франц. приставки *des* и позднелат. *infectio* — заражение) — уничтожение и удаление возбудителей инфекции (патогенов) из объектов окружающей среды. При дезинфекции погибает большая часть микробов (в том числе все патогенные), но споры бактерий и некоторые резистентные микробы могут остаться в жизнеспособном состоянии. Различают *профилактическую дезинфек- цию* в эпидемическом очаге для предупреждения распространения различных болезней; *текущую дезинфекцию* при возникновении эпидемического очага; *заключительную дезинфекцию* (после окончания эпидемиологической вспышки). Существуют три основных метода дезинфекции: тепловой, химическийи УФ-облучение, выбор которых зависит от дезинфицируемого материала.

**Тепловая дезинфекция.** Эффективно действие горячей воды и насыщенного пара. Примером тепловой дезинфекции служит применение автоматических моечных машин (промывание в холодной, а затем в теплой воде с детергентом, с последующим отмыванием и дезинфекцией в дистиллированной воде при 90 C). Обычная стирка белья, приготовление пищи и кипячение питьевой воды — примеры использования дезинфекции в быту. Температура 100 С убивает вегетативные формы бактерий и вирусы в течение 5 мин. Уничтожению спор способствует добавление в воду 2% натрия гидрокарбоната (NaHCO3). Для дезинфекции применяют также сухое тепло, например ***прокаливание***. Разновидностью тепловой дезинфекции является ***пастеризация*** — метод, созданный Л. Пастером и используемый для обработки в основном молока, а также соков, вина и пива:

􀁸 низкотемпературная пастеризация: 61,5 C, 30 мин; 71 C, 15 с;

􀁸 высокотемпературная пастеризация: кратковременная (секунды) при 80–

85 C;

􀁸 ультравысокотемпературная пастеризация: при 130–150 C в течение нескольких секунд.

**Ультрафиолетовое облучение (УФ-лучи с длиной волны 250–280 нм)** осуществляется с помощью специальных бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха, различных поверхностей в операционных, перевязочных, микробиологических лабораториях, предприятиях пищевой промышленности и т.д. УФ-лучи разрушают ДНК микробов в результате образования тиминовых димеров. Химическая дезинфекция проводится с помощью различных дезинфицирующих веществ, которые растворяют липиды мембран (детергенты) или разрушают белки и нуклеиновые кислоты (денатураты, оксиданты) микробов. Химической дезинфекции подвергаются поверхность операционного стола, стены процедурного кабинета, кожа, отработанный патологический материал, вода (хлорирование воды), некоторые инструменты, которые невозможно обработать теплом. Дезинфекцию стремятся проводить в герметичных условиях. Наиболее распространенные дезинфицирующие средства: хлорсодержащие, фенольные, четвертичные аммониевые и перекисные соединения. К неорганическим хлорсодержащим соединениям относят хлорную известь, белильную известь, гипохлорид кальция, гипохлорит натрия. В группу органических хлорсодержащих соединений входят хлорамин Б, дезам, дихлор-1, сульфохлорантин, хлорцин, хлордезин. Фенольными соединениями являются лизол и хлор-нафтол, гексахлорофен и др. Перспективную группу дезинфицирующих соединений составляют поверхностно-активные вещества, относящиеся к четвертичным аммониевым соединениям и амфолитам, обладающие бактерицидными, моющими свойствами и низкой токсичностью (ниртан, амфолан и др.). К перекисным соединениям относят пергидроль (30% водный раствор перекиси водорода) и дезоксон-1. Для дезинфекции применяются также детергенты (хлоргексидин и др.), кислоты (например, 40% раствор уксусной кислоты для противогрибкового обеззараживания обуви), альдегиды (формальдегид, глютаральдегид и др.). Для дезинфекции помещений, а также оборудования и аппаратуры используют газовую смесь из оксида этилена с метилбромидом. Перечисленные химические вещества можно разделить по механизму действия на следующие основные группы:

1) деструктивный механизм с литическим или денатурирующим эффектом;

2) окислительный механизм (перекись водорода, перманганат калия, галогены);

3) мембраноатакующий механизм (например, детергенты, нарушающие проницаемость мембран);

4) антиферментный механизм (например, соли тяжелых металлов, 8-оксихинолины и др.).

**Асептика и антисептика**

**Асептика** — предотвращение контаминации (загрязнения) объектов или ран микробами. Основоположником асептики является Д. Листер (1867). Асептика направлена на предупреждение попадания возбудителя инфекции в рану, органы больного при операциях, лечебных и диагностических процедурах. Методы асептики находят также применение на микробиологических производствах, на предприятиях пищевой промышленности и др. Асептика предусматривает меры защиты от микробов путем сохранения стерильности перевязочного материала, операционного белья, перчаток, инструментов, материала для обработки раны, а также дезинфекцию рук врача, операционного поля, аппаратуры, операционной и других помещений, применение масок и специальной одежды. К системе асептических мероприятий относится также планировка лечебных учреждений операционных (≪боксирование≫, вентиляция, кондиционирование воздуха и т.п.).

**Антисептика** — мероприятия, направленные на уничтожение микробов в патологическом очаге, ране или в другом объекте. Антисептика включает различные методы или комплекс этих методов: механические (удаление инфици-

рованных некротизированных тканей, инородных тел и т.д.); физические (дренирование ран, введение тампонов, наложение гигроскопических повязок);

биологические (применение ферментов для лизиса нежизнеспособных клеток, бактериофагов и антибиотиков); химические, основанные на применении антимикробных веществ — антисептиков, которые резко снижают численность микробов в ране, на поверхности организма. По химическому составу различают следующие **антисептики**:

*галогены* — препараты йода (спиртовой раствор йода, раствор Люголя, йодоформ, йодинол, йодопирин), хлора (хлорамины, хлориты);

*окислители* (перекись водорода, калия перманганат, обладающие, как и галогены, окислительными свойствами);

*кислоты и их соли* (уксусная, борная, салициловая, тетраборат натрия), щелочи (аммиак и его соли, бура);

*спирты* (70–80 этанол и др.);

*альдегиды* (формальдегид, гексаметилен-тетрамин, пропиолактон);

*детергенты* (декамин, хлоргексидин. этоний и др.);

*производные 8-оксихинолина* (хинозол, интестопан, нитроксолин), 4-хинолона

(оксолиновая кислота), хиноксалина (хиноксидин, диоксидин);

*производные*

*нитрофурана* (фурацилин, фурагин, фуразолидон);

*производные фенолов* (резорцин, трикрезол, фенил-резорцин, фенилсалицилат), дегги (деготь березовый, ихтиол и др.);

*красители* (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий, этакридина лактат); *соединения тяжелых металлов* (дихлорид и оксицианид ртути, нитрат серебра, колларгол, протаргол, сульфат цинка, сульфат меди, окись цинка).

Для предотвращения роста микроорганизмов в лекарственных средствах применяют консерванты: *альдегиды* (формальдегид, ронгалит); *гуанидина производные* (хлоргексидина диацетат, хлоргексидина дигидрохлорид); *кислоты* *неорганические и их соли* (борная кислота, натрия метабисульфат); *кислоты органические и их натриевые соли* (бензойная кислота, дегидроацетовая кислота); *ртути органические соединения* (мертиолят/тимеросал, фенилртуть азотнокислая, фенилртуть борнокислая, фенилртуть уксуснокислая).

**Санитарная микробиология**

**Санитарная микробиология** — раздел медицинской микробиологии, изучающий микроорганизмы, содержащиеся в окружающей среде и способные оказывать неблагоприятное воздействие на состояние здоровья человека. Она разрабатывает микробиологические показатели гигиенического нормирования, методы контроля за эффективностью обеззараживания объектов окружающей среды, а также выявляет в объектах окружающей среды патогенные, условно-патогенные и санитарно-показательные микроорганизмы.

Обнаружение ***патогенных микроорганизмов*** позволяет дать оценку эпидемиологической ситуации и принять соответствующие меры по борьбе и профилактике инфекционных заболеваний.

***Условно-патогенные микроорганизмы*** способны вызывать гнойно-воспалительные процессы в ослабленном организме. Кроме того, они могут попадать в продукты питания, быстро размножаться с накоплением большого количествамикробных клеток и их токсинов, вызывая у людей пищевые отравления микробной этиологии.

***Санитарно-показательные микроорганизмы*** используют в основном для косвенного определения возможного присутствия в объектах окружающей среды патогенных микроорганизмов. Их наличие свидетельствует о загрязнении объекта выделениями человека и животных, так как они постоянно обитают в тех же органах, что и возбудители заболеваний, и имеют общий путь выделения в окружающую среду. Например, возбудители кишечных инфекций имеют общий путь выделения (с фекалиями) с такими санитарно-показательными бактериями, как бактерии группы кишечной палочки (БГКП) — колиформные палочки (в эту группу, кроме кишечной палочки, входят сходные по свойствам бактерии родов *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*), энтерококки, клостридии перфрингенс. Возбудители воздушно-капельных инфекций имеют общий путь выделения с бактериями (кокками), постоянно обитающими на слизистой оболочке верхних дыхательных путей, выделяющимися в окружающую среду (при кашле, чиханье, разговоре), поэтому в качестве санитарно-показательных бактерий для воздуха закрытых помещений предложены золотистые стафилококки и гемолитические стрептококки.

Санитарно-показательные микроорганизмы должны отвечать следующим основным требованиям:

􀁸 обитают только в организме людей или животных и постоянно обнаруживаются в их выделениях;

􀁸 не должны размножаться или обитать в почве и воде;

􀁸 сроки их выживания и устойчивость к различным факторам после выделения из организма в окружающую среду равны или превышают таковые у патогенных микробов;

􀁸 их свойства типичны и легко выявляемые для их дифференциации;

􀁸 методы их обнаружения и идентификации просты, методически и экономически доступны;

􀁸 встречаются в окружающей среде в значительно больших количествах,

чем патогенные микроорганизмы;

􀁸 в окружающей среде не должно быть близкосходных обитателей — микроорганизмов.

Кроме выявления патогенных, условно-патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов, в практике санитарно-микробиологических исследований используется определение общего ***микробного числа***, т.е. общего количества микроорганизмов в определенном объеме или массе исследуемого материала (вода, почва, продукты питания, лекарственная форма и др.). В частности, определяют МАФАМ — мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы, выросшие в виде видимых колоний на плотной питательной среде после инкубации при 37 С в течение 24 ч.

**Микробиологический контроль почвы, воды предметов обихода**

Загрязненность почвы, воды, воздуха и других объектов определяется по общей микробной обсемененности и обнаружению *санитарно-показательных микроорганизмов —* индикаторов наличия выделений человека или животных. В воде регистрируют кишечную палочку, БГКП (колиформные палочки), энтерококк, стафилококки; в почве — кишечную палочку, БГКП (колиформные палочки), клостридии перфрингенс, термофилы; на предметах обихода — БГКП (коли-формные палочки), золотистый стафилококк, энтерококк. На основании количественного выявления санитарно-показательных бактерий вычисляются их *индекс* (число бактерий в 1 л воды), *перфрингенс-титр*, *титр энтерококка* и т.д. Так, например, титр энтерококка воды — это наименьшее количество воды, в котором определяется энтерококк. Важным санитарно-показательным индикатором фекального загрязнения воды является определение ***общих колиформных бактерий* (*колиформных палочек*)**, к которым относят грамотрицательные, оксидазаотрицательные палочки, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 С в течение 24–48 ч. Вместо последнего термина предлагалось использовать термин ≪бактерии семейства *Enterobacteriaceae*≫, так как все бактерии этого семейства имеют индикаторное значение. К бактериям семейства *Enterobacteriaceae* относятся грамотрицательные, оксидазаотрицательные палочки, растущие на лактозосодержащих средах типа среды Эндо и ферментирующие глюкозу до кислоты и газа при температуре 37 С в течение 24 ч. При бактериальном загрязнении воды свыше допустимых норм следует провести дополнительное исследование на наличие бактерий — показателей свежего фекального загрязнения. К таким бактериям относят ***термотолерантные*** ***колиформные бактерии*** (***фекальные кишечные палочки*)**, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре 44 􀁱С в течение 24 ч и не растущие на цитратной среде. Общие колиформные бактерии и термотолерантные колиформные бактерии определяют с помощью мембранных фильтров или титрационным методом. О свежем фекальном загрязнении свидетельствует также выявление ***энтерококка***. На давнее фекальное загрязнение указывают отсутствие колиформных бактерий и наличие определенного количества ***клостридий перфрингенс***, т.е. наиболее устойчивых спорообразующих бактерий. В соответствии с нормативными документами регламентируются следующие нормативы микробиологических показателей питьевой воды при централизованном водоснабжении:

1) ***общее микробное число питьевой воды*** не должно превышать 50 колониеобразующих единиц в 1 мл исследуемой воды;

2) ***общие колиформные бактерии*** должны отсутствовать в 100 мл исследуемой воды;

3) ***термотолерантные колиформные бактерии*** должны отсутствовать в 100 мл исследуемой воды;

4) ***колифаги*** не должны определяться в 100 мл исследуемой воды (учет по бляшкообразующим единицам);

5) ***споры сульфитредуцирующих клостридий*** не должны определяться в 20 мл исследуемой воды;

6) ***цисты лямблий*** не должны определяться в 50 мл исследуемой воды.

Кроме того, загрязненность воды оценивается по обнаружению патогенных микробов с фекально-оральным механизмом передачи (энтеровирусы, энтеробактерии, холерные вибрионы и др.). Возможно определение возбудителей сибирской язвы, ботулизма, а также легионелл и др.

**Оценка фекального загрязнения почвы** и его давности проводится по индексу колиформных бактерий (количество в 1 г почвы), перфрингенс-титру (наименьшее количество почвы, в котором обнаруживается *Clostridium perfringens*), а иногда и по титру энтерококков. Параллельно определяется микробное число почвы. Загрязненность почвы навозом и компостом оценивается по титру термофилов — бактерий, вырастающих на мясопептонном агаре при 60 С в течение 24 ч.

Существуют следующие ***критерии оценки степени загрязнения почвы***:

1) ***титр БГКП*** и ***перфрингенс-титр*** для сильнозагрязненных почв — 0,009

и ниже, 0,00009 и ниже соответственно; для чистых почв — коли-титр 1,0 и выше, перфрингенс-титр — 0,01 и выше.

2) ***количество термофилов*** (на 1 г почвы; культивирование при температуре 60 􀁱С): в чистых почвах — 100–1000, в загрязненных — 1000–10 000, а в сильнозагрязненных — 100 000–400 000 колониеобразующих единиц (КОЕ).

**Оценка объектов общественного питания, аптек, лечебных и детских учреждений** осуществляется исследованием смывов или отпечатков с рук персонала, посуды, поверхности столов, оборудования и др. Смыв высевают на

различные питательные среды для определения микробной обсемененности, наличия БГКП, патогенных энтеробактерий, золотистого стафилококка, энтерококка, грибов рода *Candida.* Метод отпечатков заключается в контакте поверхности питательной среды с исследуемой поверхностью. Для этого применяют специальные контактные чашки Петри ≪Бактотест≫ и др. Отдельно можно проводить исследование на энтеровирусы.

**Микробиологический контроль воздуха**

Микробиологический контроль воздуха осуществляется с помощью методов естественной или принудительной седиментации микробов. Естественна седиментация (по методу Коха) проводится в течение 5–10 мин путем осаждения микробов на поверхность твердой питательной среды в чашке Петри. Принудительная седиментация микробов осуществляется посевом проб воздуха на питательные среды с помощью специальных приборов (импакторов, импинджеров, фильтров). *Импакторы —* приборы для принудительного осаждения микробов из воздуха на поверхность питательной среды (прибор Кротова, пробоотборник аэрозоля бактериологический и др.). *Импинджеры —* приборы, с помощью которых воздух проходит через жидкую питательную среду или изотонический раствор хлорида натрия. Санитарно-гигиеническое состояние воздуха определяется по следующим микробиологическим показателям.

1. **Общее количество микроорганизмов** в 1 м3 воздуха (так называемое общее микробное число, или обсемененность воздуха) — количество колоний микроорганизмов, выросших при посеве воздуха на питательном агаре в чашке

Петри в течение 24 ч при 37 􀁱С, выраженное в КОЕ.

2. **Индекс санитарно-показательных микробов —** количество золотистого стафилококка и гемолитических стрептококков в 1 м3 воздуха. Эти бактерии являются представителями микрофлоры верхних дыхательных путей и имеют общий путь выделения с патогенными микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем. Появление в воздухе спорообразующих бактерий — показатель загрязненности воздуха микроорганизмами почвы, а появление грамотрицательных бактерий — показатель возможного антисанитарного состояния. Для оценки воздуха лечебных учреждений можно использовать данные из нормативных документов

**Микробиологический контроль продуктов питания**

Санитарно-микробиологическое исследование продуктов питания проводится в плановом порядке и по эпидемиологическим показаниям. В ***плановом поряд-*** ***ке*** оцениваются следующие показатели:

1) **общее микробное число (обсеменение)** — определяют МАФАМ — мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы, выросшие в виде видимых колоний на плотной питательной среде после инкубации при 37 С в течение 24 ч;

2) **обнаружение санитарно-показательных бактерий** в продуктах питания — *кишечной палочки*, *колиформных бактерий*, *энтерококка*, *золотистого стафилококка*, *протея*, *клостридий* (*сульфит-восстановителей*);

3) **обнаружение сальмонелл**, например при исследовании продуктов из мяса (наряду с другими показателями).

По ***эпидемиологическим показаниям*** продукты исследуют на наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов — возбудителей пищевых отравлений микробной этиологии.

***Общую микробную обсемененность*** не определяют в кисломолочных продуктах — твороге, сметане, кефире и др., содержащих специфическую микрофлору (молочнокислые стрептококки, лактобактерии и др.). В этих продуктах исследуют ***молочнокислую микрофлору*** бактериоскопическим изучением мазков из них, окрашенных метиленовым синим. Отсутствие характерной молочнокислой микрофлоры и наличие посторонней микрофлоры (плесневые грибы, дрожжи и др.) указывает на неудовлетворительное приготовление, нарушение технологии или неправильное хранение продуктов. Исключение составляют кефир, кумыс, в которых при микроскопическом исследовании обязательно выявляются в поле зрения 2–5 дрожжевых клеток, поскольку эти продукты есть результат комбинированного брожения — молочнокислого и спиртового. Консервированные продукты питания не должны содержать кишечную палочку, протей и патогенные микробы. При исследовании таких пищевых продуктов, как консервы овощные, рыбные, мясные, предусмотрено обнаружение:

1) аэробных микроорганизмов;

2) анаэробных микроорганизмов;

3) ботулинических экзотоксинов.

**Бактериофаги**

**Бактериофаги** (от греч. *phagos —* пожирающий — и бактерия), или фаги, — вирусы бактерий, специфически проникающие в бактерии и паразитирующие в них вплоть до гибели (лизиса) бактериальной клетки. Впервые явление самопроизвольного лизиса сибиреязвенных бактерий наблюдал в 1898 г. один из основоположенников отечественной микробиологии Н.Ф. Гамалея. В 1915 г. английский бактериолог Ф. Туорт описал способность фильтрата стафилококков растворять свежую культуру этих же бактерий. Однако лишь французский ученый Ф. Д’Эрелль (1917 г.) правильно оценил это явление, выделяя фильтрующийся литический агент из испражнений больных дизентерией. Добавление литического агента (фильтрата испражнений) к мутной бульонной культуре дизентерийных бактерий приводило к полному просветлению среды. Аналогичный эффект Ф. Д’Эрелль наблюдал и на плотных питательных средах, засеянных смесью литического агента с соответствующими бактериями. На фоне сплошного бактериального роста появлялись стерильные пятна круглой или неправильной формы — участки лизиса бактерий, названные ≪негативными колониями≫, или ≪бляшками≫. Ф. Д’Эрелль сделал заключение, что открытый им литический агент является вирусом бактерий, и назвал его ≪бактериофагом≫ — пожирателем бактерий. Бактериофаги широко распространены: они выявлены у большинства бактерий, а также у других микроорганизмов, например у грибов. Поэтому бактериофаги в широком смысле слова часто называют просто ***фагами***.

Бактериофаги принято обозначать буквами латинского, греческого или русского алфавита, часто с цифровым индексом, перед которыми стоит название вида бактерий (например, фаги *E. coli* T2). Для обозначения группы родственных фагов используют родовые и видовые названия микробов, из которых выделены соответствующие фаги: колифаги, стафилофаги, актинофаги, микофаги и т.д. Строение бактериофагов изучают с помощью электронной микроскопии образцов, контрастированных напылением металлов или фосфорно-вольфрамовой кислотой. В зависимости от формы и структурной организации фаги подразделяют на несколько морфологических типов: нитевидные; мелкие кубические (некоторые из них имеют аналоги отростков); фаги сперматозоидной формы, т.е. с кубической головкой и хвостовым отростком, имеющие сокращающийся или несокращающийся чехол отростка. Размеры фагов колеблются от 20 до 800 нм (нитевидный тип). Наиболее изучены крупные бактериофаги, имеющие форму сперматозоида и сокращающийся чехол отростка, например колифаги Т2, Т4, Т6. Они состоят из головки икосаэдрического типа размером 65–100 нм и хвостового отростка длиной более 100 нм. Хвостовой отросток имеет внутри полый цилиндрический стержень, сообщающийся с головкой, а снаружи — чехол, способный к сокращению, наподобие мышцы. Чехол присоединен к воротничку, окружающему стержень около головки. На дистальном конце отростка имеется шестиугольная базальная пластинка с шипами, от которых отходят нитевидные структуры *—* ***фибриллы*** (нити). Бактериофаги содержат или ДНК, или РНК. Нуклеиновые кислоты фагов могут быть двунитевыми, однонитевыми, линейными, кольцевыми. Большинство фагов содержит двунитевую ДНК, замкнутую в кольцо. У фагов, имеющих форму сперматозоида, одна молекула двунитевой суперспирализованной ДНК находится внутри головки и защищена капсидом. Капсид состоит из белковых молекул — идентичных полипептидных субъединиц, уложенных по икосаэдрическому (кубическому) типу симметрии. В состав головки также входит полипептид, состоящий из аспарагиновой, глутаминовой кислот и лизина. У некоторых фагов внутри головки находится внутренний гистоноподобный белок, обеспечивающий суперспирализацию ДНК. Сокращающийся чехол хвостового отростка образован также белковыми субъединицами, уложенными по спиральному типу симметрии, содержащими АТФ и ионы Са2+. У некоторых фагов (например, Т2) в дистальной части отростка содержится фермент лизоцим. **Антигенные свойства.** Бактериофаги содержат группоспецифические и типоспецифические антигены, обладают иммуногенными свойствами. По типоспецифическим антигенам фаги делят на серотипы.

**Резистентность.** По сравнению с вирусами человека бактериофаги более устойчивы к факторам окружающей среды. Инактивируются под действием температуры 65–70 􀁱С, УФ-облучения в высоких дозах, ионизирующей радиации, формалина и кислот. Длительно сохраняются при низкой температуре

и высушивании.

**Взаимодействие фагов с бактериальной клеткой.** Бактериофаги инфицируют строго определенные бактерии, взаимодействуя со специфическими рецепторами клетки. По специфичности взаимодействия различают следующие бактериофаги: ***поливалентные***, взаимодействующие с родственными видами бактерий; ***моновалентные***, взаимодействующие с бактериями определенного вида; ***типовые***, взаимодействующие с отдельными типами (вариантами) бактерий данного вида. Взаимодействие фагов с бактериями может протекать, как и у других вирусов, по продуктивному, абортивному и интегративному типам. При ***продуктивном*** типе взаимодействия образуется фаговое потомство, бактерии лизируются;

при ***абортивном*** типе — фаговое потомство не образуется и бактерии сохраняют свою жизнедеятельность; при ***интегративном*** типе — геном фага встраивается в хромосому бактерии и сосуществует с ней. В зависимости от типа взаимодействия различают вирулентные и умеренные бактериофаги.

**Вирулентные бактериофаги** взаимодействуют с бактерией по продуктивному типу. Для внедрения в бактерию они адсорбируются на специфических рецепторах клетки, в том числе на липополисахариде, липопротеине, тейхоевых кислотах, протеинах или даже на пилях. Проникнув в бактерию, они репродуцируются с образованием 200–300 новых фаговых частиц и вызывают лизис бактерий. Фаги, имеющие хвостовой отросток, прикрепляются к бактериальной клетке свободным концом отростка (фибриллами, базальной пластинкой). Проникновение фаговой нуклеиновой кислоты в бактерию наиболее изучено у бактериофагов, имеющих отросток с сокращающимся чехлом. В результате активации АТФ чехол хвостового отростка сокращается, и стержень с помощью лизоцима, растворяющего прилегающий фрагмент клеточной стенки, как бы просверливает оболочку клетки. При этом ДНК фага, содержащаяся в его головке, проходит в форме нити через канал хвостового стержня и инъецируется в клетку, а капсид фага остается снаружи бактерии. Некоторые мелкие кубические фаги, способные адсорбироваться на половых пилях, вводят свою нуклеиновую кислоту через канал этих пилей. ДНК нитевидных фагов проходит в бактерию вместе с одним из капсидных белков. Инъецированная внутрь бактерии нуклеиновая кислота подавляет биосинтез компонентов клетки, заставляя ее синтезировать нуклеиновую кислоту\_\_и белки фага. Эти процессы схожи с репродукцией вирусов человека. После образования компонентов фага происходит самосборка частиц: сначала пустотелые капсиды головок заполняются нуклеиновой кислотой, затем сформированные головки соединяются с хвостовыми отростками. В результате изменения внутриклеточного осмотического давления и действия фагового лизоцима происходит разрушение оболочки, лизис бактерии и выход фагов из нее. Весь литический цикл от адсорбции бактериофага на бактерии до его выхода из нее

занимает 20–40 мин.

**Умеренные бактериофаги** в отличие от вирулентных взаимодействуют с чувствительными бактериями либо по продуктивному, либо по интегративному типу. Продуктивный цикл умеренного фага идет в той же последовательности, что и у вирулентных фагов, и заканчивается лизисом клетки. При интегративном типе взаимодействия ДНК умеренного фага встраивается в хромосому бактерии, реплицируется синхронно с геномом размножающейся бактерии, не вызывая ее лизиса. ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии, называется ***профагом***, а культура бактерий — ***лизогенной****.* Такое сосуществование бактерии и умеренного бактериофага называется ***лизогенией*** (от греч. *lysis —* разложение, *genea —* происхождение). Профаг, ставший частью хромосомы бактерии, при ее размножении передается по наследству потомкам. Каким образом нуклеиновая кислота присоединяется к бактериальной хромосоме? После проникновения в бактерию ДНК умеренного фага приобретает форму кольца, а затем интегрирует по типу кроссинговера в строго определенную гомологичную область хромосомы клетки. Например, профаг лямбда всег-да локализуется между галактозным и биотиновым локусом хромосомы кишечной палочки. Итак, при лизогении образование фагового потомства не происходит. В основе ≪сдерживающего≫ механизма репродукции фагов лежит образование в бактерии специфического репрессора — низкомолекулярного белка, подавляющего транскрипцию фаговых генов. Биосинтез репрессора детерминируется генами профага. Наличием репрессора можно объяснить способность лизогенных бактерий приобретать иммунитет (невосприимчивость) к последующему заражению гомологичным или близкородственными фагами. Под иммунитетом в данном случае понимается такое состояние бактерии, при котором исключается процесс вегетативного размножения вышеуказанных фагов и лизис клетки. Однако термин ≪лизогения≫ отражает потенциальную возможность лизиса бактерии, содержащей профаг. Действительно, профаги некоторой части лизогенной культуры бактерий могут спонтанно (самопроизвольно) или направленно под действием ряда физических или химических факторов дерепрессироваться, исключаться из хромосомы, переходить в вегетативное состояние. Этот процесс заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий. Частота спонтанного ли-

зиса бактерий в лизогенных культурах невелика (10–2, 10–6), т.е. не захватываетвсе клетки, обладающие иммунитетом. Частоту лизиса бактерий можно значительно увеличить, воздействуя на лизогенную культуру ***индуцирующими*** ***агентами*** (УФ-лучи, ионизирующее излучение, перекисные соединения, митомицин С и др.). Сам же феномен воздействия, приводящий к инактивации репрессора, называется ***индукцией*** профага. Явление индукции используют в генной инженерии. Однако спонтанный лизис лизогенных культур может нанести вред микробиологическому производству. Так, если микроорганизмы — продуценты биологически активных веществ оказываются лизогенными, существует опасность перехода фага в вегетативное состояние, что приведет к лизису производственного штамма этого микроба. Геном профага может придавать бактерии новые, ранее отсутствовавшие у нее свойства. Этот феномен изменения свойств микроорганизмов под влиянием профага получил название ***фаговой конверсии*** (от лат. *conversio* — превращение). Конвертироваться могут морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие свойства бактерий. Например, наличие профага в дифтерийной палочке обусловливает ее способность продуцировать дифтерийный экзотоксин. Умеренные фаги могут быть дефектными, т.е. неспособными образовывать зрелые фаговые частицы ни в естественных условиях, ни при индукции. Геном некоторых умеренных фагов (Р1) может находиться в цитоплазме бактериальной клетки в так называемой плазмидной форме, не включаясь в ее хромосому. Такого рода умеренные фаги используют в качестве векторов в генной инженерии.

**Практическое применение фагов.** Бактериофаги используют в лабораторной диагностике инфекций при внутривидовой идентификации бактерий, т.е. определении фаговара (фаготипа). Для этого применяют метод ***фаготипирования***, основанный на строгой специфичности действия фагов: на чашку с плотной питательной средой, засеянной ≪газоном≫ чистой культурой возбудителя, наносят капли различных диагностических типоспецифических фагов. Фаговар бактерии определяется тем типом фага, который вызвал ее\_\_лизис (образование стерильного пятна, ≪бляшки≫, или ≪негативной колонии≫,

фага). Методику фаготипирования используют для выявления источника и путей распространения инфекции (эпидемиологическое маркирование). Выделение бактерий одного фаговара от разных больных указывает на общий источник их заражения. По содержанию бактериофагов в объектах окружающей среды (например, в воде) можно судить о присутствии в них соответствующих патогенных бактерий. Подобные исследования проводят при эпидемиологическом анализе вспышек инфекционных болезней.

Фаги применяют также для лечения и профилактики ряда бактериальных инфекций. Производят брюшнотифозный, сальмонеллезный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый, стрептококковый фаги и комбинированные препараты (колипротейный, пиобактериофаги и др). Бактериофаги назначают по показаниям перорально, парентерально или местно в виде жидких, таблетированных форм, свечей или аэрозолей. Бактериофаги широко применяют в геннойв качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.

**Cтроение генома бактерий**

Бактериальный геном состоит из генетических элементов, способных к самостоятельной репликации (воспроизведению), т.е. репликонов. ***Репликонами***

являются бактериальная хромосома и плазмиды. Наследственная информация у бактерий хранится в форме последовательности нуклеотидов ДНК, которые определяют последовательность аминокислот в белке.Каждому белку соответствует свой ген, т.е. дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов.

**Бактериальная хромосома**

Бактериальная хромосома состоит из одной двухцепочечной молекулы ДНК, ко-

торая может быть как кольцевой (*E. coli*), так и линейной формы (*B. burgdorferi*).

Некоторые бактерии, в частности бруцеллы, *V. cholerae* имеют по две хромосомы. Размеры бактериальной хромосомы у различных представителей прокариот варьируют от 3х108 до 2.5х10 9 Да, что соответствует 3,2х106 нуклеотидных пар (н.п.). Например, у *E. coli* бактериальная хромосома содержит 5х106н.п. Для сравнения: размеры ДНК вирусов составляют порядка 103 н.п., дрожжей107 н.п., а суммарная длина хромосомных ДНК человека — 3х109 н.п. Бактериальная хромосома обладает гаплоидным набором генов, кодирующих жизненно важные для бактериальной клетки функции. Она формирует компактный нуклеоид бактериальной клетки.

**5.1.2. Плазмиды бактерий**

***Плазмиды*** представляют собой двухцепочечные молекулы ДНК размером от 103 до 106 н.п. Они кодируют неосновные для жизнедеятельности бактериальной клетки функции, но придающие бактерии преимущества при попадании в неблагоприятные условия существования.

Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериальной клетке плаз-

мидами, можно выделить следующие: 1) устойчивость к антибиотикам; 2) образование колицинов; 3) продукция факторов патогенности; 4) способность к синтезу антибиотических веществ; 5) расщепление сложных органических веществ; 6) образование ферментов рестрикции и модификации.

Репликацию плазмидной ДНК и бактериальной хромосомы осуществляет один и тот же набор ферментов, однако репликация плазмид происходит независимо от хромосомы. Некоторые плазмиды находятся под строгим контролем*.* Это означает, что их репликация сопряжена с репликацией хромосомы так, что в каждой бактериальной клетке присутствует одна или, по крайней мере, несколько копий плазмид. Число копий плазмид, находящихся под слабым контролем, может составлять от 10 до 200 на бактериальную клетку.Для характеристики плазмидных репликонов их принято разбивать на группы совместимости*.* ***Несовместимость*** плазмид связана с неспособностью двух плазмид стабильно сохраняться в одной и той же бактериальной клетке. Несовместимость свойственна тем плазмидам, которые обладают высоким сходством репликонов, поддержание которых в клетке регулируется одним и тем жемеханизмом. Некоторые плазмиды могут обратимо встраиваться в бактериальную хромосому и функционировать в виде единого репликона. Такие плазмиды называются ***интегративными***, или эписомами. Ряд бактериальных плазмид способны передаваться из одной клетки в другую, иногда даже принадлежащую иной таксономической единице. Такие плазмиды называются ***трансмиссивными*** (син.: *конъюгативными*), Трансмиссивность присуща лишь крупным плазмидам, имеющим tra-оперон, в который объединены гены, ответственные за перенос плазмиды. Эти гены кодируют половые пили, которые образуют мостик с клеткой, не содержащей трансмиссивную плазмиду, по которой плазмидная ДНК передается в новую клетку. Этот процесс называется ***конъюгацией***. Мелкие плазмиды, не несущие tra-гены, не могут передаваться сами по себе, но способны к передаче при наличии трансмиссивных плазмид, используя их аппарат конъюгации. Такие плазмиды называются ***мобилизуемыми***, а сам процесс — мобилизацией нетрансмиссивной плазмиды. Особое значение в медицинской микробиологии имеют плазмиды, обеспечивающие устойчивость бактерий к антибиотикам, получившие название R-плазмид, а также плазмиды, отвечающие за продукцию факторов патогенности, способствующие развитию инфекционного процесса.

***R-плазмиды*** (от англ. *resistance* — противодействие) содержат гены, детерминирующие синтез ферментов, разрушающих антибактериальные препараты (например, антибиотики). В результате наличия такой плазмиды бактериальная клетка становится устойчивой (резистентной) к действию целой группы лекарственных веществ, а иногда и к нескольким. Многие R-плазмиды, будучи трансмиссивными и распространяясь в популяции бактерий, делают ее недоступной к воздействию антибактериальных препаратов. Бактериальные штаммы, несущие R-плазмиды, часто являются этиологическими агентами внутрибольничных инфекций.

Плазмиды, детерминирующие синтез факторов патогенности, обнаружены

у многих бактерий — возбудителей инфекционных заболеваний человека. Патогенность возбудителей шигеллезов, иерсиниозов, чумы, сибирской язвы, иксодового бореллиоза, кишечных эшерихиозов связана с наличием и функционированием у них плазмид патогенности. Первыми из этой группы плазмид были определены ***Еnt-плазмида***, определяющая синтез энтеротоксина, и ***Hly-плазмида***, детерминирующая синтез гемолизина у *E. coli.* Некоторые бактериальные клетки содержат плазмиды, детерминирующие синтез бактерицидных по отношению к другим бактериям веществ. Например, некоторые *E. coli* владеют ***Col-плазмидой***, определяющей синтез колицинов, оказывающих микробоцидное действие на колиформные бактерии. Бактериальные клетки, несущие такие плазмиды, обладают преимуществами при заселении экологических ниш. Плазмиды используются в практической деятельности человека, в частности в генной инженерии, при конструировании специальных рекомбинантных бактериальных штаммов, вырабатывающих в больших количествах биологически активные вещества.

**Подвижные генетические элементы**

В состав бактериального генома, как в бактериальную хромосому, так и в плазмиды, входят ***подвижные генетические элементы***, к которым относятся вставочные последовательности и транспозоны.

**Вставочные (инсерционные) последовательности, IS-элементы** (от англ. *insertion sequences*) — это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного участка репликона в другой, а также между репликонами.IS-элементы имеют размеры ~1000 н.п. и содержат лишь те гены, которые необходимы для их собственного перемещения — транспозиции: ген, кодирующийфермент ***транспозазу***, обеспечивающую процесс исключения IS-элемента изДНК и его интеграцию в новый локус, и ген, детерминирующий синтез репрессора, который регулирует весь процесс перемещения.Отличительная особенность IS-элементов — наличие на концах вставочной последовательности ***инвертированных повторов***, которые узнает транспозаза, осуществляющая одноцепочечные разрывы цепей ДНК, расположенных по обе стороны от подвижного элемента. Оригинальная копия IS-элемента остается на прежнем месте, а ее реплицированный дупликат перемещается на новый участок. Перемещение подвижных генетических элементов принято называть репликативной или незаконной рекомбинацией. Однако в отличие от бактериальной хромосомы и плазмид подвижные генетические элементы не являются самостоятельными репликонами, так как их репликация — составной элемент репликации ДНК репликона, в составе которого они находятся. Известно несколько разновидностей IS-элементов, которые различаются по размерам и по типам и количеству инвертированных повторов.

**Транспозоны** *—* это сегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но имеющие структурные гены, т.е. гены, обеспечивающие синтез молекул, обладающих специфическим биологическим свойством, например токсичностью, или обеспечивающих устойчивость к антибиотикам. Перемещаясь по репликону или между ними, подвижные генетические элtменты вызывают:

1) инактивацию генов тех участков ДНК, куда они, переместившись, встраиваются;

2) образование повреждений генетического материала;

3) слияние репликонов, т.е. встраивание плазмиды в хромосому;

4) распространение генов в популяции бактерий, что может приводить к изменению биологических свойств популяции, смене возбудителей инфекций и эволюционным процессам среди микробов.

**Интегроны и острова патогенности**

Помимо плазмид и подвижных генетических элементов у бактерий существует еще одна система, способствующая распространению генов, — система интегронов. ***Интегроны*** захватывают посредством сайт-специфической рекомбинации малые элементы ДНК, называемые ***генными кассетами****,* и экспрессируют их. Интегроны могут располагаться как на хромосоме, так и на плазмидах. Поэтому возможно перемещение кассет с одного интегрона на другой как в пределах одной бактериальной клетки, так и по популяции бактерий. Один интегрон может захватывать несколько кассет антибиотикорезистентности.

***Острова патогенности*** — участки ДНК протяженностью не менее 10 000 пар нуклеотидов, которые отличаются по составу Г-Ц-пар нуклеотидов от основного генома бактерий и ответственны за синтез факторов патогенности, обеспечивающих развитие патологического процесса в организме хозяина. Острова патогенности могут быть локализованы в составе хромосомы (*Salmonella*), плазмид (*Shigella*) и геноме конвертирующего фага (*V. cholerae*).

**Мутации у бактерий**

***Мутации*** *—* это изменения в последовательности отдельных нуклеотидов ДНК, которые ведут к изменениям морфологии бактериальной клетки, возникновению потребностей в факторах роста (например, в аминокислотах, витаминах, т.е. ауксотрофности); к развитию устойчивости к антибиотикам, изменению чувствительности к температуре, снижению вирулентности (аттенуация) и т.д. По протяженности повреждений ДНК различают мутации точечные, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, и протяженные, или аберрации. В последнем случае могут наблюдаться выпадения нескольких пар нуклеотидов, которые называются ***делецией***, добавление нуклеотидных пар, т.е.

***дупликация***, перемещение фрагментов хромосомы, ***транслокация***, и перестановки нуклеотидных пар — ***инверсии***. Мутации могут быть спонтанными, т.е. возникающими самопроизвольно, без воздействия извне, и индуцированными.

***Точечные спонтанные*** мутации возникают в результате ошибок при репликации ДНК, что связано с таутомерным перемещением электронов в азотистых

основаниях.

***Спонтанные хромосомные аберрации*** появляются вследствие перемещения подвижных генетических элементов.

***Индуцированные мутации*** происходят под влиянием внешних факторов, которые называются мутагенами*.* ***Мутагены*** бывают физическими (УФ-лучи, γ-радиация), химическими (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, азотистая кислота и ее аналоги и другие соединения) и биологическими — транспозоны.

Аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, например 2-аминопурин, 5-бромурацил, включаются в нуклеотиды, а следовательно, и в ДНК, но при этом они значительно чаще в силу таутомерных превращений спариваются с ≪неправильными≫ партнерами, в результате вызывая замену пурина другим пурином (А–Г) или пиримидина другим пиримидином (Т–Ц). Замена пурина на пурин, а пиримидина на пиримидин называется ***транзицией****.* Азотистая кислота и ее аналоги вызывают дезаминирование азотистых оснований, результатом чего являются ошибки при спаривании и как следствие возникновение транзиции. Аденин в результате дезаминирования превращается в гипоксантин, который спаривается с цитозином, что приводит к возникновению транзиции АТ–ГЦ. Гуанин же при дезаминировании превращается в ксантин, который по-прежнему спаривается с цитозином; таким образом, дезаминирование гуанина не сопровождается мутацией. Акридин и профлавин внедряются между соседними основаниями цепи ДНК, вдвое увеличивая расстояние между ними. Это пространственное изменение при репликации может привести как к утрате нуклеотида, так и включению дополнительной нуклеотидной пары, что приводит

к *сдвигу рамки считывания* тРНК. Начиная с того места, где произошло выпадение или включение нуклеотида, информация считывается неправильно. УФ-облучение затрагивает преимущественно пиримидиновые основания, при этом два соседних остатка тимина ДНК могут оказаться ковалентно связанными.

На бактериях, подвергнутых УФ-облучению, было показано, что повреждения в бактериальных ДНК, вызванные облучением, могут частично исправляться благодаря наличию ***репарационных систем***. У различных бактерий имеется несколько типов репарационных систем. Один тип репарации протекает на свету, он связан с деятельностью фотореактивирующегося фермента, который расщепляет тиминовый димер. При темновой репарации дефектные участки цепи ДНК удаляются, и образовавшаяся брешь достраивается при помощи ДНК-полимеразы на матрице сохранившейся цепи и соединяется с цепью лигазой.

Мутация, приводящая к потере функции, называется ***прямой мутацией***. У мутантов может произойти восстановление исходных свойств, т.е. реверсия (от англ. *reverse* — обратный) Если происходит восстановление исходного генотипа,

то мутация, восстанавливающая генотип и фенотип, является обратной или ***пря-***

***мой реверсией****.* Если мутация восстанавливает фенотип, не восстанавливая гено-

тип, то такая мутация называется супрессорной*.* ***Супрессорные мутации*** могут

возникать как в пределах того самого гена, в котором произошла первичная мута-

ция, так и в других генах или могут быть связаны с мутациями в тРНК.

**Рекомбинация у бактерий**

**Генетическая рекомбинация** — это взаимодействие между двумя геномами, т.е. между двумя ДНК, обладающими различными генотипами, которое приводит к образованию рекомбинантной ДНК, формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих родителей. Отсутствие полового размножения и мейоза, в процессе которых у высшихорганизмов происходит рекомбинация, а также гаплоидный набор генов и определяют особенности рекомбинации у бактерий. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые воспринимают его. В клетку-реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора, что приводит к формированию неполной зиготы — *мерозиготы*. В результате рекомбинации в мерозиготе образуется только один рекомбинант, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента с включенным в него фрагментом хромосомы донора. Реципрокные рекомбинанты не образуются. По молекулярному механизму генетическая рекомбинация у бактерий делится на три вида: гомологичную, сайт-специфическую и незаконную.

**Гомологичная рекомбинация.** При гомологичной рекомбинации в процессе разрыва и воссоединения ДНК происходит обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью гомологии. Гомологичная рекомбинация происходит через образование промежуточного соедине-ния, крестообразной структуры Холидея, в которой осуществляется комплементарное спаривание между одноцепочечными участками, принадлежащими разным родительским молекулам ДНК. Процесс гомологичной рекомбинации находится под контролем генов, объединенных в ***REC-систему***, состоящую из генов ***recA*,*B*,*C*,*D.*** Продукты этих генов производят расплетание нитей ДНК и их переориентацию с образованием структуры Холидея, а также разрезают структуру Холидея для завершения процесса рекомбинации.

**Сайт-специфическая рекомбинация** происходит в определенных участках генома и не требует высокой степени гомологии ДНК. Этот тип рекомбинации не зависит от функционирования генов ***recA*,*B*,*C*,*D***. Примером может служить встраивание плазмиды в хромосому бактерий, которое происходит между идентичными IS-элементами хромосомы и плазмиды, интеграция ДНК фага в хромосому *E. coli.* Сайт-специфическая рекомбинация, происходящая в пределах одного репликона, участвует также в переключении активности генов. Например, у сальмонелл следствием этого процесса являются фазовые вариации жгутикового Н-антигена.

**Незаконная или репликативная рекомбинация** не зависит от функционирования генов ***recА*,*B*,*C*,*D***. Примером ее является транспозиция подвижных генетических элементов по репликону или между ними, при этом, как уже было отмечено в разд. 5.1.3, транспозиция подвижного генетического элемента сопровождается репликацией ДНК.

**Передача генетической информации у бактерий**

Рекомбинация у бактерий — это конечный этап передачи генетического ма-

териала между ними, которая осуществляется посредством трех механизмов: конъюгацией (при контакте бактерий, одна из которых несет конъюгативную плазмиду), трансдукцией (при помощи бактериофага) и трансформацией (при помощи высокополимеризованной ДНК).

**Конъюгация**

***Конъюгация*** — передача генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент путем непосредственного контакта клеток. Впервые была обнаружена Дж. Ледербергом и Э. Тейтумом в 1946 г. Необходимым условием для конъюгации является наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды. Трансмиссивные плазмиды кодируют половые пили, образующие конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которой плазмидная ДНК передается в новую клетку. Механизм передачи плазмидной ДНК из клетки в клетку заключается в том, что специальный белок, кодируемый tra-опероном, ≪узнает≫ определенную последовательность в ДНК плазмиды (называемую *origin*), вносит в эту последовательность одноцепочечный

разрыв и ковалентно связывается с 5’-концом. Затем цепь ДНК, с которой связан белок, переносится в клетку-реципиент, а неразорванная комплементарная цепь остается в клетке-доноре. Клеточный аппарат синтеза ДНК достраивает одиночные цепи и в доноре, и в реципиенте до двухцепочечной структуры. Белок, связанный с 5’-концом перенесенной цепи, способствует замыканию плазмиды в реципиентной клетке в кольцо. Примером служит перенос в реципиентную клетку F-фактора, или ***F-плазмиды*** (от англ. *fertility* — плодовитость), которая является как трансмиссивной, так и интегративной. Клетки-доноры, обладающие F-фактором, обозначаются как F+-клетки, а клетки-реципиенты, не имеющие F-фактора, — как F–-клетки. Если F-фактор находится в клетке-доноре в автономном состоянии, то в результате скрещивания (F+- и F–-клетки) клетка-реципиент приобретает донорские свойств. Если F-фактор или другая трансмиссивная плазмида встраиваются в хромосому клетки-донора, то плазмида и хромосома начинают функционировать в виде единого трансмиссивного репликона, что делает возможным переносбактериальных генов в бесплазмидную клетку-реципиент, т.е. процесс конъюгации. Штаммы, в которых плазмида находится в интегрированном состоянии с хромосомой, переносят свои хромосомные гены бесплазмидным клеткам с высокой частотой и поэтому называются Hfr (от англ. *high frequency of* *recombination* — высокая частота рекомбинации). Процесс переноса хромосомных генов в случае скрещивания Hfr- и F–-клеток всегда начинается с расщепления ДНК в одной и той же точке, месте интеграции F-фактора или другой трансмиссивной плазмиды. Одна нить донорской ДНК передается через конъюгационный мостик в реципиентную клетку. Процесс сопровождается достраиванием комплементарной нити до образования двунитчатой структуры. Перенос хромосомных генов при конъюгации всегда имеет одинаковую направленность, противоположную встроенной плазмиде. Сама трансмиссивная плазмида передается последней. Переданная в реципиентную клетку и достроенная до двунитчатой структуры, нить ДНК донора рекомбинирует с гомологичным участком реципиентной ДНК с образованием стабильной генетической структуры. Вследствие хрупкости конъюгационного мостика F-фактор редко передается в клетку-реципиент, поэтому образовавшийся рекомбинант донорскими функциями, как правило, не обладает.

Вследствие направленности передачи генов конъюгация используется для

картирования генома бактерий и построения генетической карты.

**Трансдукция**

**Трансдукция** — передача бактериальной ДНК посредством бактериофага. Это явление было открыто в 1951 г. Н. Циндером и Дж. Ледербергом. В процессе репликации бактериофага внутри бактерий фрагмент бактериальной ДНК проникает в фаговую частицу и переносится в реципиентную бактерию во время фаговой инфекции. Различают общую и специфическую трансдукцию.

**Общая трансдукция** — перенос бактериофагом фрагмента любой части бактериальной хромосомы. Она происходит вследствие того, что бактериальная ДНК фрагментируется после фаговой инфекции и кусочек бактериальной ДНК того же размера, что и фаговая ДНК, проникает в вирусную, формируя дефектную фаговую частицу с частотой приблизительно 1 на 1000 фаговых частиц. При инфицировании клетки-реципиента дефектной фаговой частицей ДНК клетки-донора ≪впрыскивается≫ в нее и рекомбинирует гомологичной рекомбинацией с гомологичным участком хромосомы-реципиента с образованием стабильного рекомбинанта. Этим типом трансдукции обладают Р-фаги.

**Специфическая трансдукция** наблюдается в том случае, когда фаговая ДНК интегрирует в бактериальную хромосому с образованием профага. В процессе исключения ДНК-фага из бактериальной хромосомы в результате случайного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК фрагмент бактериальной хромосомы, становясь дефектным фагом.Так как большинство умеренных бактериофагов интегрирует в бактериальную хромосому в специфических участках, для таких бактериофагов характерен перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК клетки-донора. ДНК дефектного фага рекомбинирует с ДНК клетки-реципиента сайт-специфической рекомбинацией. Рекомбинант становится меродиплоидом по привнесенному гену. В частности, бактериофаг передает специфической трансдукцией gal-ген у *E. coli.*

**Трансформация**

**Трансформация** — передача бактерии фрагмента бактериальной высокополимеризованной ДНК из разрушенной бактерии. Феномен трансформации впервые был описан в 1928 г. Ф. Гриффитсом, обнаружившим превращение бескапсульного R-штамма пневмококков (*Streptococcus* *pneumoniae*) в штамм, образующий капсулу S-формы. Гриффитс ввел мышам одновременно небольшое количество авирулентных R-клеток и убитых нагреванием S-клеток. R-клетки были получены от штамма, капсульное вещество которого принадлежало к типу S II, а убитые нагреванием S-штаммы принадлежали к типу S III. Из крови погибших мышей были выделены вирулентные пневмококки с капсулой S III. Природу трансформирующего фактора в 1944 г. установили О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти, которые показали, что ДНК, экстрагированная из инкапсулированных пневмококков, может трансформировать некапсулированные пневмококки в инкапсулированную форму. Таким образом, было доказано, что именно ДНК является носителем генетической информации. Процесс трансформации может самопроизвольно происходить в природе у некоторых видов бактерий, чаще у грамположительных, когда ДНК, выделенная из погибших клеток, захватывается реципиентными клетками. Процесс трансформации зависит от компетентности клетки-реципиента и состояния донорской трансформирующей ДНК. *Компетентность* — это способность бактериальной клетки поглощать ДНК. Она зависит от присутствия особых белков в клеточной мембране, обладающих специфическим аффинитетом к ДНК. Состояние компетентности у грамположительных бактерий связано с определенными фазами кривой роста. Трансформирующей активностью

обладает только двунитчатая высокоспирализованная молекула ДНК. Это связано с тем, что в клетку-реципиент проникает только одна нить ДНК, тогда как другая — на клеточной мембране — подвергается деградации с освобождением энергии, которая необходима для проникновения в клетку сохранившейся нити. Высокий молекулярный вес трансформирующей ДНК увеличивает шанс рекомбинации, так как внутри клетки трансформирующая нить ДНК подвергается воздействию эндонуклеаз. Интеграция с хромосомой требует наличия гомологичных с ней участков у трансформирующей ДНК. Рекомбинация происходит на одной нити, в результате чего образуется гетеродуплексная молекула, одна нить которой имеет генотип реципиента, а другая — рекомбинантный генотип. Рекомбинантные трансформанты формируются только после цикла репликации. В настоящее время это основной метод генной инженерии, используемый при конструировании рекомбинантных штаммов с заданным геномом.

**Особенности генетики вирусов**

Особенность строения вирусного генома заключается в том, что наследственная информация может быть записана как на ДНК, так и на РНК в зависимости от типа вируса.

***Мутации*** у вирусов могут возникать спонтанно, в процессе репликации нуклеиновой кислоты вируса, а также под влиянием тех же внешних факторов и мутагенов, что и у бактерий. Фенотипически мутации вирусного генома прояв ляются изменениями в антигенной структуре, неспособностью вызывать продуктивную инфекцию в чувствительной клетке, чувствительностью продуктивного цикла к температуре, а также изменением формы и размера бляшек, которые образуют вирусы в культуре клеток под агаровым покрытием

Свойства вирусов могут изменяться при одновременном заражении несколькими вирусами чувствительной клетки. Причем изменения свойств при таких условиях могут происходить как в результате обмена между материалами нуклеиновых кислот, принадлежащих разным вирусам (генетическая рекомбинация и генетическая реактивация), так и в результате процессов, не сопровождающихся обменом генетического материала (комплементация и фенотипическое смешивание).

***Генетическая рекомбинация*** встречается чаще у ДНК-содержащих вирусов. Среди РНК-содержащих вирусов она наблюдается у тех из них, которые обладают фрагментированным геномом, например у вируса гриппа. При рекомбинации происходит обмен между гомологичными участками генома.

***Генетическая реактивация*** наблюдается между геномами родственных вирусов, имеющих мутации в разных генах. В результате перераспределения генетического материала формируется полноценный дочерний геном.

***Комплементация*** 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*** наблюдается в том случае, если при смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам, при сохранении неизменности генотипа.

**Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней**

**Рестрикционный анализ**

Данный метод основан на применении ферментов ***рестриктаз***, которые представляют собой эндонуклеазы, расщепляющие молекулы ДНК путем разрыва

фосфатных связей в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое значение для методов молекулярной генетики имеют рестриктазы, которые уз- нают последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии. Точка разрыва ДНК может или совпадать с осью симметрии, или быть сдвинута относительно нее. В настоящее время из различных бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты (участки) узнавания (рестрикции). Выявлено более 80 различных типов сайтов, в которых может происходить разрыв двойной спирали ДНК. В геноме конкретной таксономической единицы находится строго определенное (генетически задетерминированное) число участков узнавания для определенной рестриктазы. Если выделенную из конкретного микроба ДНК обработать определенной рестриктазой, то это приведет к образованию строго определенного количества фрагментов ДНК фиксированного размера. Размер каждого типа фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле: мелкие фрагменты перемещаются в геле быстрее, чем более крупные, и длина их пробега больше. Гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют в УФ-излучении. Таким

образом можно получить рестрикционную карту определенного вида микробов. Сопоставляя карты рестрикции ДНК, выделенных из различных штаммов, можно определить их генетическое родство, выявить принадлежность к определенному виду или роду, а также обнаружить участки с мутациями. Этот способ используется также как начальный этап метода определения последовательности нуклеотидных пар (секвенирования) и метода молекулярной гибридизации.

**Метод молекулярной гибридизации**

**Метод молекулярной гибридизации** позволяет выявить степень сходства различных ДНК. Применяется при идентификации микробов для определения их точного таксономического положения. Метод основан на способности двухцепочечной ДНК при повышенной температуре (90 С) в щелочной среде денатурировать, т.е. расплетаться на две нити, а при понижении температуры на 10 С вновь восстанавливать исходную двухцепочечную структуру. Метод требует наличия молекулярного зонда. **Зондом** называется одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, меченная радиоактивными нуклидами, с которой сравнивают исследуемую ДНК. Для проведения молекулярной гибридизации исследуемую ДНК расплетают указанным выше способом, одну нить фиксируют на специальном фильтре, который затем помещают в раствор, содержащий радиоактивный зонд. Создаются условия, благоприятные для образования двойных спиралей. В случае наличия комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют между собой двойную спираль. Молекулярная гибридизация составляет основу ***микрочипа***, который представляет собой стеклянную пластинку с присоединенными в определенных локусах молекулярными ДНК-зондами (от 100 до 1000), специфичными для некоторой таксономической единицы. Из исследуемого образца выделяют общую ДНК, амплифицируют по стабильной последовательности 16S РНК-гена. Выделенную ДНК метят флуорохромом или ферментом и обрабатывают ею микрочип, создавая условия для гибридизации. После отмывают несвязавшуюся ДНК и определяют локализацию молекулярных гибридов постановкой ИФА или денситометрией.

**Полимеразная цепная реакция**

**Полимеразная цепная реакция** (ПЦР) позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию в нем ДНК микроба без выделения последнего в чистой культуре. Для проведения этой реакции из исследуемого материала выделяют ДНК, в которой определяют наличие специфичного для данного микроба гена. Обнаружение гена осуществляют его накоплением. Для этого необходимо иметь праймеры комплементарного 3’-концам ДНК исходного гена. Накопление (амплификация) гена выполняется следующим образом. Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают, и она распадается на две нити. Добавляют праймеры. Смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры при наличии в смеси ДНК искомого гена связываются с его комплементарными участками. Затем к смеси ДНК и праймера добавляют ДНК-полимеразу и нуклеотиды. Устанавливают температуру, оптимальную для функционирования ДНК-полимеразы. В этих условиях в случае комплементарности ДНК гена и праймера происходит присоединение нуклеотидов к 3’-концам праймеров, в результате чего синтезируются две копии гена. После этого цикл повторяется снова, приэтом количество ДНК гена будет увеличиваться каждый раз вдвое.Проводят реакцию в специальных приборах — амплификаторах. ПЦР применяется для диагностики вирусных и бактериальных инфекций.

***ПЦР в реальном времени*** — это ускоренный метод, при котором амплификация и определение продукта амплификации проводятся одновременно. Методика основана на том, что в амплификационную пробирку вводят молекулярный зонд, который в случае связывания с амплифицированной цепью генерирует флюоресцентный сигнал определенной длины волны. Реакция проводится в автоматическом режиме. ПЦР в реальном времени проводит полный анализ пробы в течение 20–60 мин. Метод позволяет обнаружить даже одну молекулу ДНК или РНК в пробе. Используется для определения вирусной нагрузки, проведения молекулярного типирования.

 **Риботипирование и опосредованная транскрипцией амплификация рибосомальной РНК**

Последовательность нуклеотидных оснований в оперонах, кодирующих рРНК, отличается консервативностью, присущей каждому виду бактерий. Эти опероны представлены на бактериальной хромосоме в нескольких копиях. Фрагменты ДНК, полученные после обработки ее рестриктазами, содержат последовательности генов рРНК, которые могут быть обнаружены методом молекулярной гибридизации с меченой рРНК соответствующего вида бактерий. Количество и локализация копий оперонов рРНК и рестрикционный состав сайтов как внутри рРНК-оперона, так и по его флангам варьируют у различных видов бактерий. На основе этого свойства построен метод ***риботипирования***, который позволяет производить мониторинг выделенных штаммов и определение их вида. В настоящее время риботипирование проводится в автоматическом режиме в специальных приборах.

**Опосредованная транскрипцией амплификация рРНК** используется для диагностики смешанных инфекций. Этот метод основан на обнаружении с помощью молекулярной гибридизации амплифицированных рРНК, специфичных для определенного вида бактерий. Исследование проводится в три этапа:

1) амплификация пула рРНК на матрице выделенной из исследуемого материала ДНК при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы;

2) гибридизация накопленного пула рРНК с комплементарными видоспецифическим рРНК олигонуклеотидами, меченными флюорохромом или ферментами;

3) определение продуктов гибридизации методами денситометрии, ИФА. Реакция проводится в автоматическом режиме в установках, в которых одномоментное определение рРНК, принадлежащих различным видам бактерий, достигается разделением амплифицированного пула рРНК на несколько проб, в которые вносятся комплементарные видоспецифическим рРНК меченые олигонуклеотиды для гибридизации.