

ТЕМА 6

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

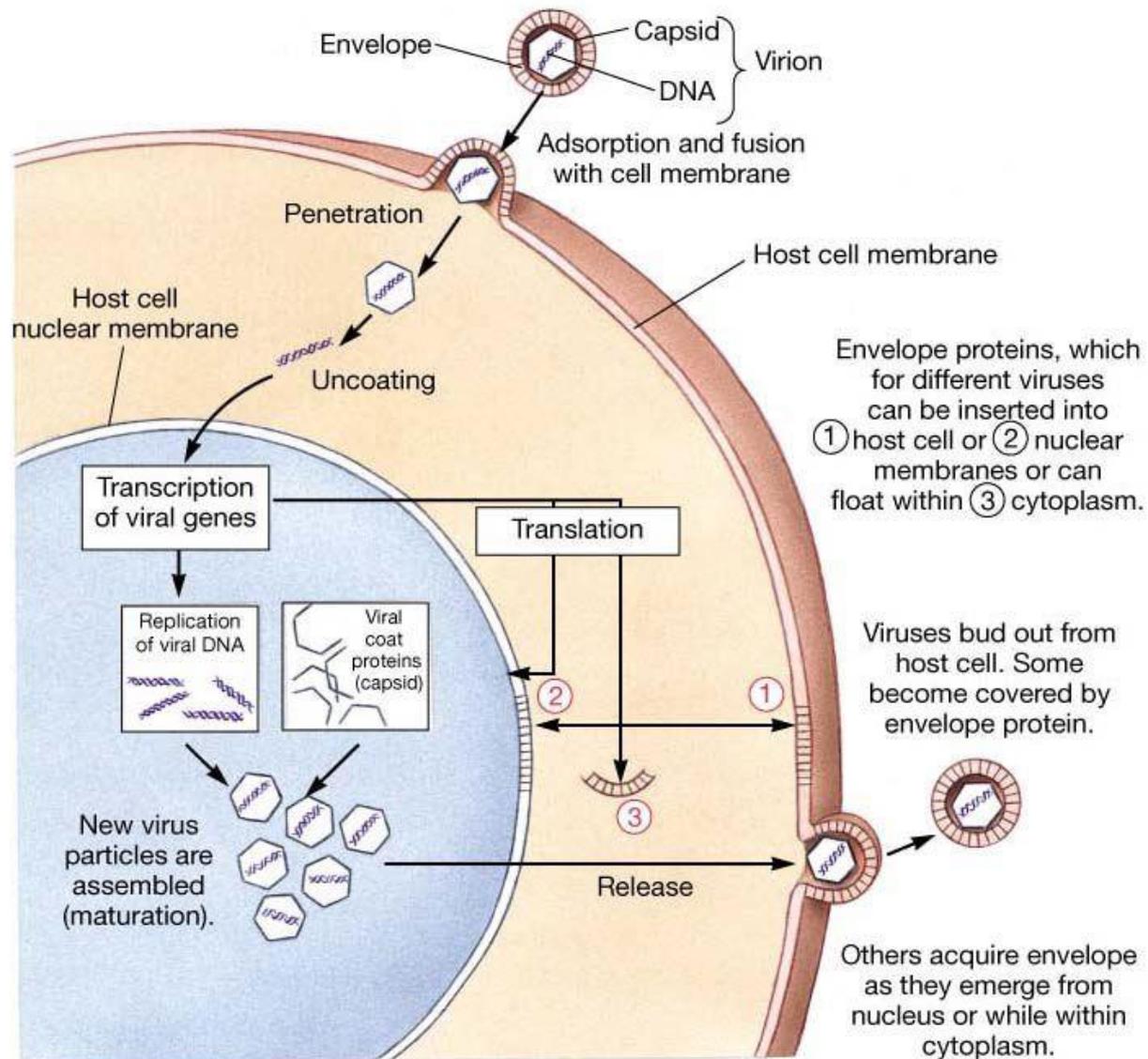
Репродукция вирусов

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

Этапы репродукции

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

Репродукция вирусов



Особенности репродукции ДНК- и РНК-содержащих вирусов

- **ДНК-содержащие:**

вирусная ДНК \longrightarrow иРНК \longrightarrow синтез вирусных белков

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

вирусная РНК \longrightarrow синтез вирусных белков

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

вирусная РНК \longrightarrow иРНК \longrightarrow синтез вирусных белков

- **Ретровирусы:**

вирусная РНК \longrightarrow комплементарная ДНК \longrightarrow иРНК \longrightarrow
синтез вирусных белков

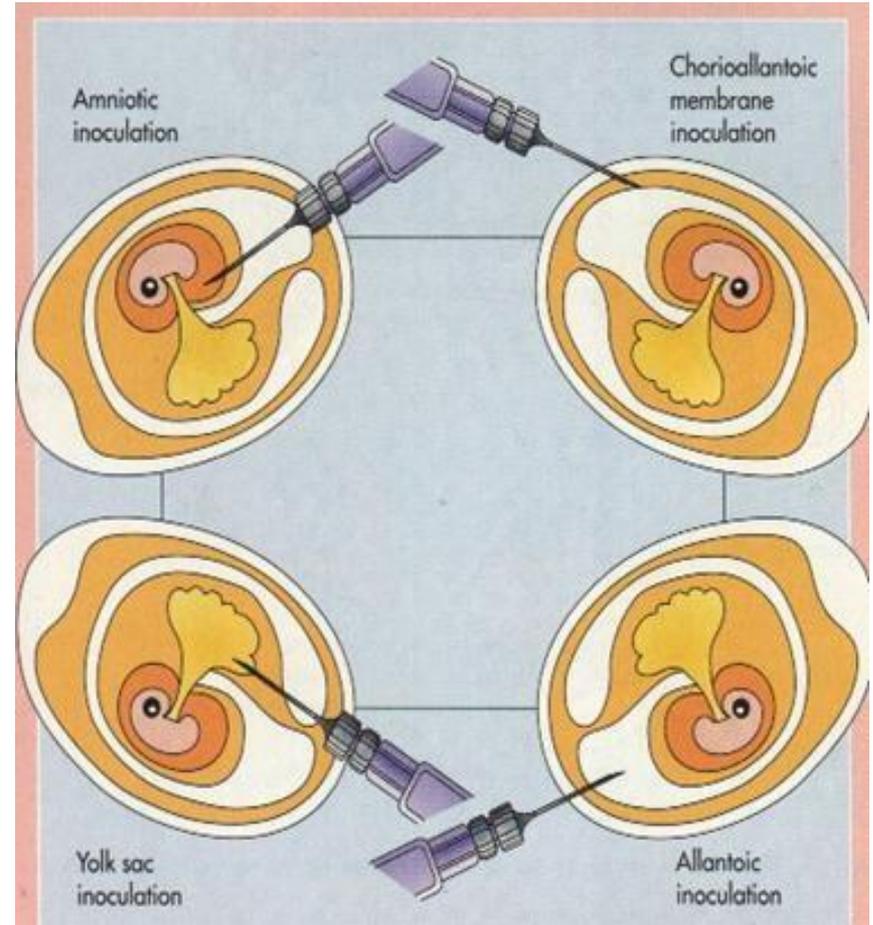
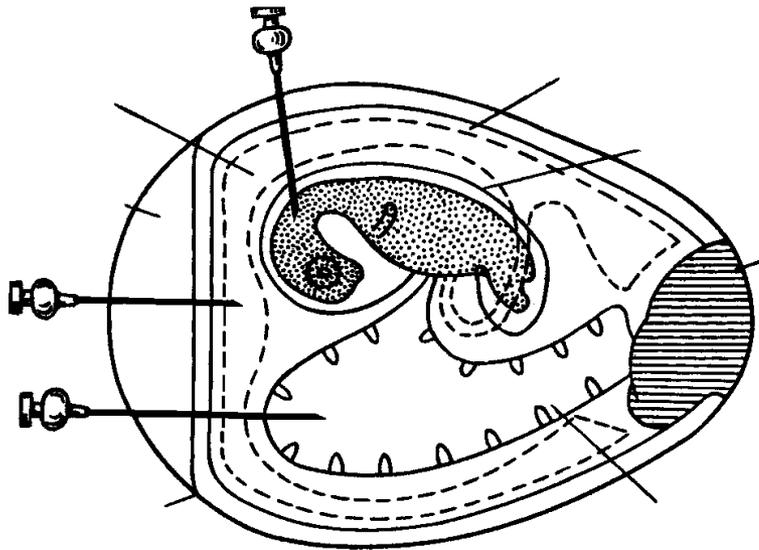
Типы взаимодействия вирусов с клеткой хозяина

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

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах

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

Заражение куриных эмбрионов



Заражение куриных эмбрионов

- В скорлупе выше границы (заранее очерченной карандашом) воздушной камеры делают отверстие диаметром около 1 мм. Инъецируют инфицирующую жидкость в объеме 0,1-0,2 мл, введением иглы на глубину не более 2-3.
- После инъекции вирусосодержащего материала иглу извлекают, а отверстие в скорлупе закрывают каплей расплавленного парафина
- Вскрывают зараженный эмбрион через 48-72 ч инкубации, в период максимального накопления вирусов.

Вскрытие зараженных эмбрионов

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

Методы индикации вирусов в зараженном курином эмбрионе

Показателем заражения эмбриона вирусом может служить:

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

Исследование зараженной ХАО

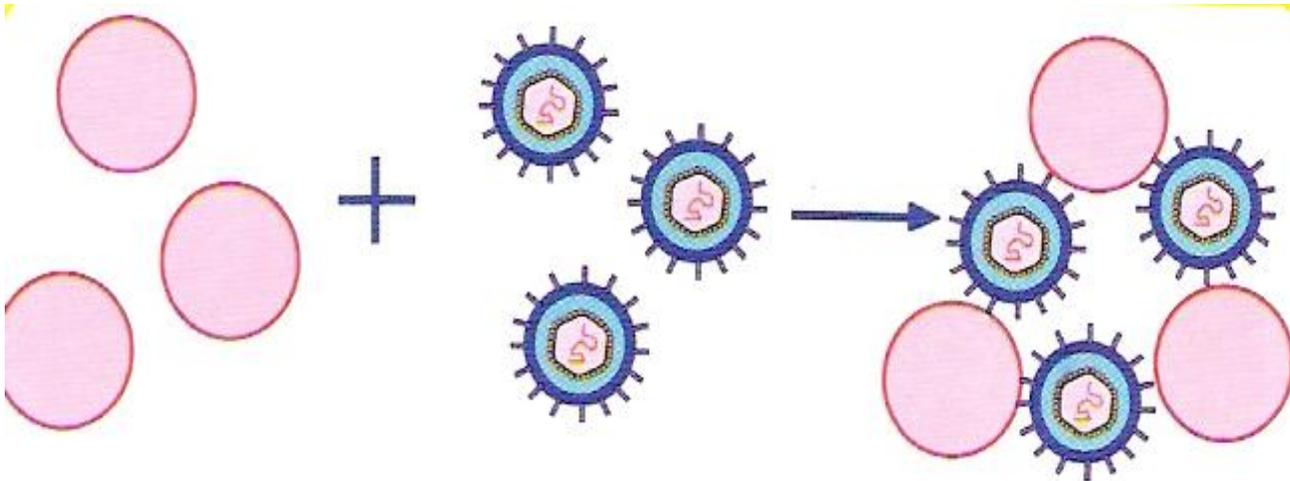
- Для более тщательного осмотра ХАО приподнимают пинцетом и срезают ножницами.
- Для осмотра и взятия всей ХАО удаляют зародыш, желточный мешок и белок, а хорионаллантоисную оболочку отслаивают от внутренней поверхности скорлупы, извлекают и переносят в стерильную чашку Петри с физиологическим раствором.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

Получение амниотической и аллантоисной жидкости

- Аллантоисную жидкость отсасывают пипеткой, которой прокалывают подскорлупную оболочку и ХАО. Ставят бактериологический контроль вирусосодержащего материала посевом на МПБ, или сахарный бульон. Обнаружение вируса в материале проводят с помощью реакции гемагглютинации (РГА) и сохраняют в замороженном состоянии при -4°C
- Взятие амниотической жидкости проводят после удаления аллантоисной жидкости. Для этого пипетку вводят в амнион между головой и телом зародыша и отсасывают пастеровской пипеткой.

Реакции гемагглютинации с амниотической и алантоисной жидкостью

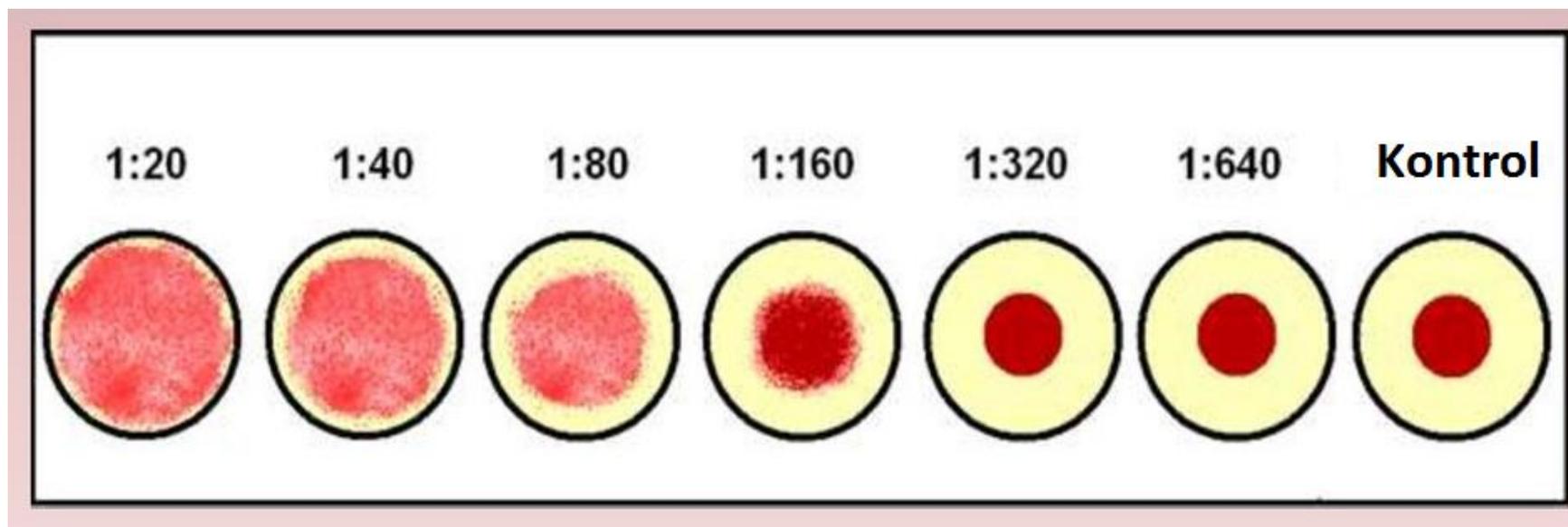
- Обнаружение вируса в алантоисной и амниотической жидкостях зараженного эмбриона проводят постановкой **реакции гемагглютинации**.
- Реакция основывается на способности антигенов некоторых вирусов (гемагглютининов) агглютинировать (склеивать) эритроциты животных и используется при индикации вирусов



Техника реакции гемагглютинации

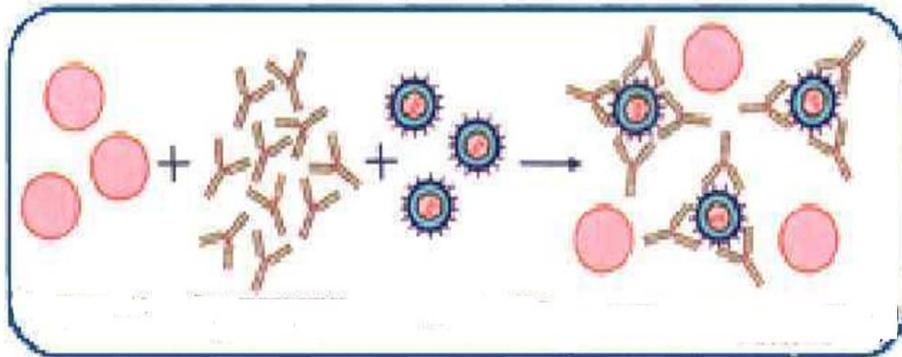
- После вскрытия амниотическую и аллантоисную жидкость разливают в пробирки или лунки плексигласовой пластины в объеме 0,5 мл (для контроля берут 0,5 мл такой же жидкости незараженного эмбриона).
- Затем добавляют по 0,2 мл 1% суспензии отмытых куриных эритроцитов и выдерживают при комнатной температуре.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

Техника реакции гемагглютинации

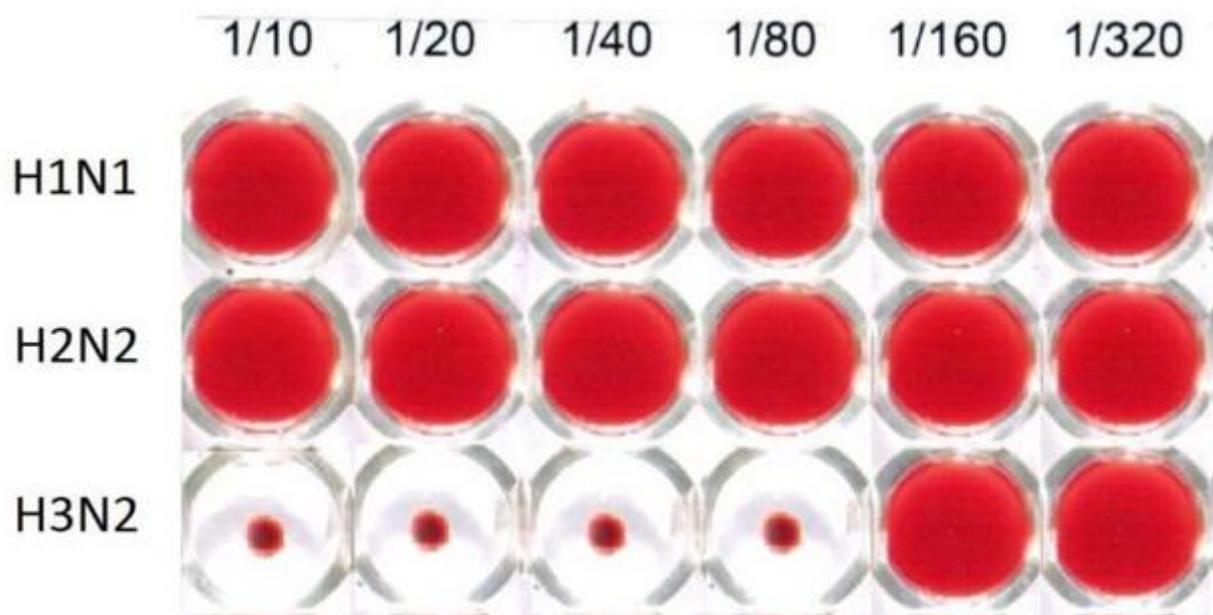


Реакция торможения гемагглютинации

- Используется при идентификации некоторых вирусов (гриппа, кори, клещевого энцефалита и др.)
- Для определения вида вируса в исследуемом материале к нему добавляют сыворотку содержащую антитела к определенному виду вируса
- При наличии вируса в исследуемом материале, комплементарные к нему антитела инактивируют вирус и гемагглютинация эритроцитов не происходит



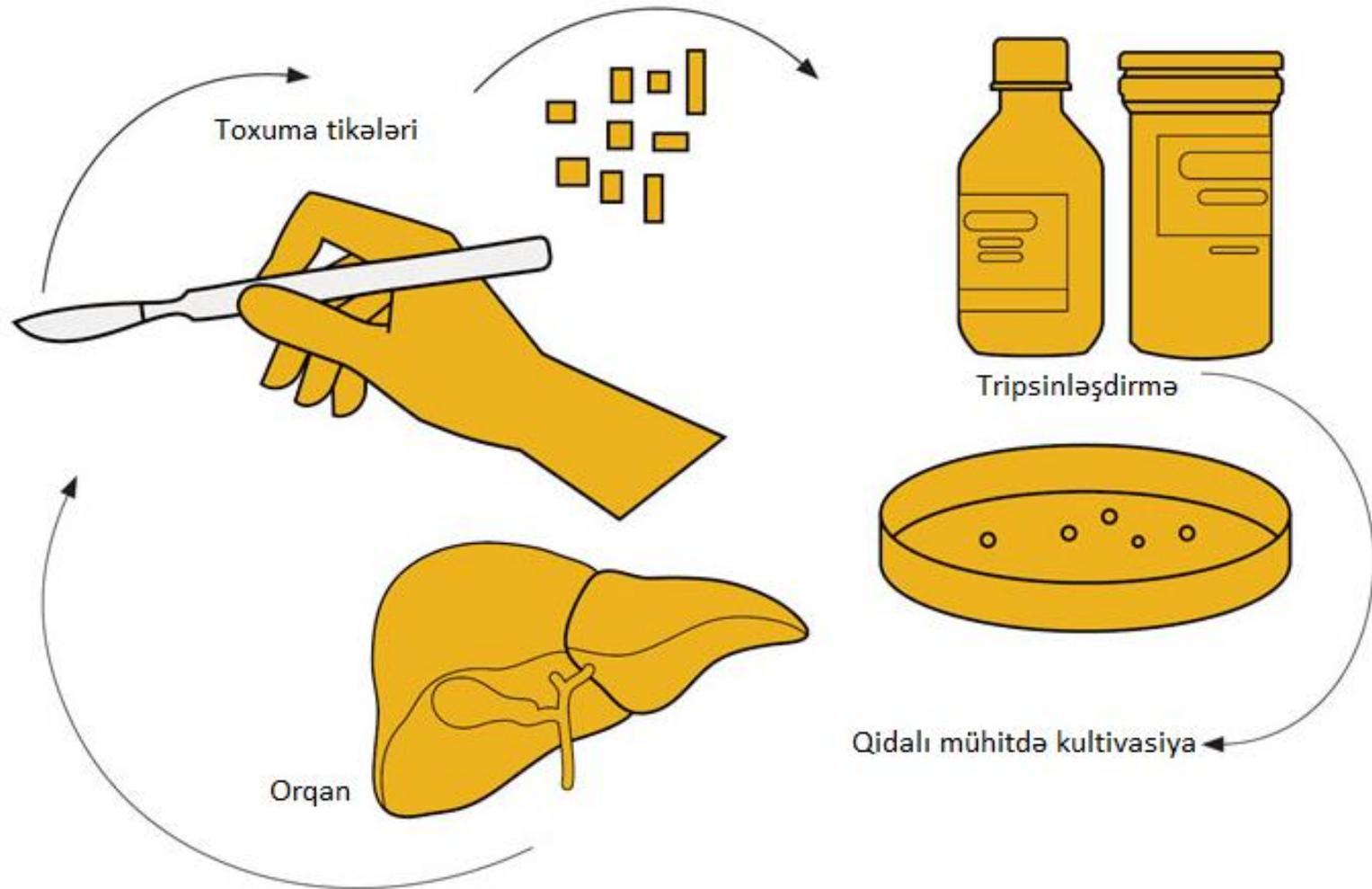
Техника реакции торможения гемагглютинации



Культивирование вирусов в культуре клеток (тканей)

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

Получение клеточных культур



Культивация вирусов в культуре клеток (тканей)

- **Клеточные (тканевые) культуры:**

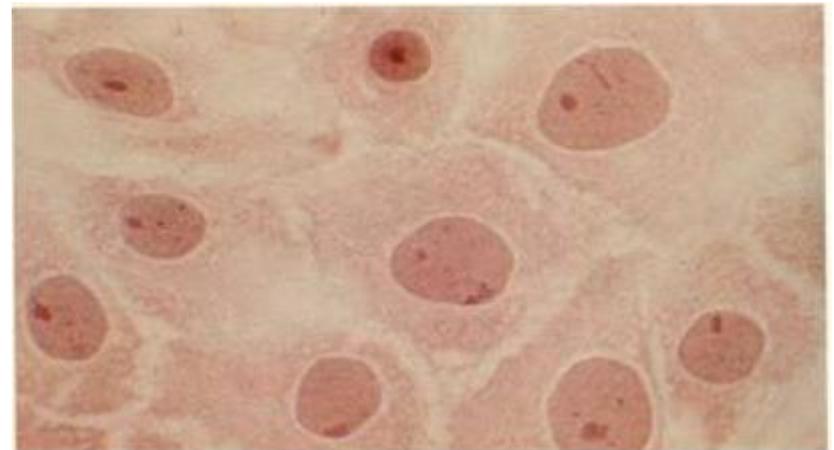
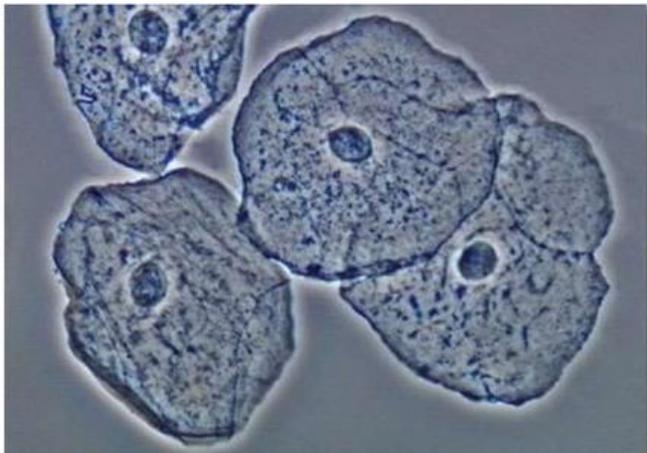
1. однослойные
2. суспензионные
3. органные

- **Однослойные культуры клеток**

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

Первичные культуры клеток

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

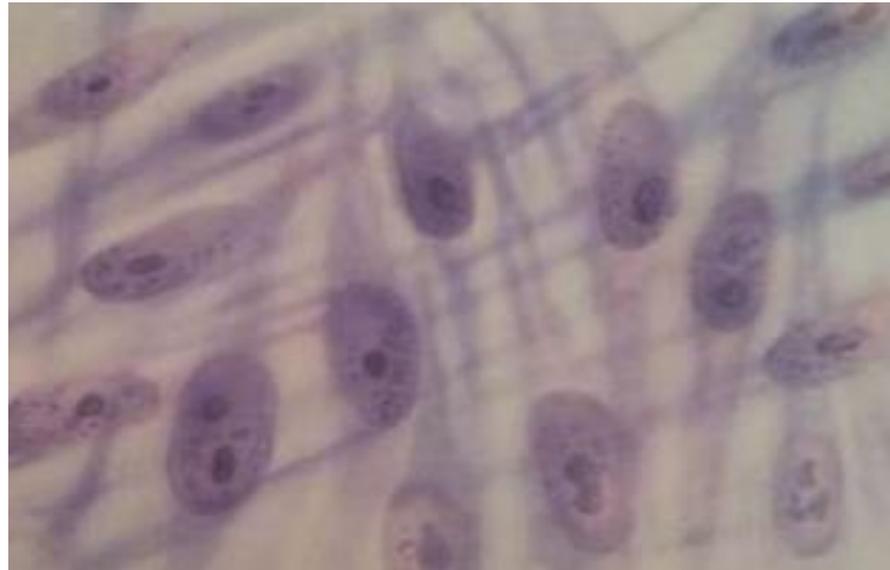


Первичные культуры клеток

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

Диплоидная (полуперевиваемая) линия клеток

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



Питательные среды, используемые для выращивания культур клеток консистенция

- Среда содержит полный набор аминокислот, витаминов и ростовые факторы.
- Наряду с сухими средами и готовыми компонентами выпускают готовые жидкие среды (199, Игла, гидролизат лактальбумина, сухие среды и концентраты)
- Среда подразделяют на ростовые и поддерживающие. Для выращивания клеточных культур применяются ростовые среды обогащенные сыворотками человека и животных (н-р, бычью сыворотку, эмбриональную телячью сыворотку и пр.) Содержание сыворотки в среде может составлять 2 - 30%

Питательные среды используемые для выращивания культур клеток

В среды добавляют феноловый красный, который в кислой среде приобретает желто-оранжевый, а в щелочной - малиновый (темно-красный) цвет.



Лабораторная посуда для культивирования

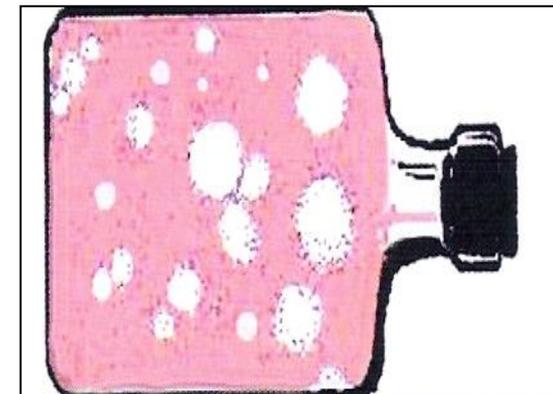
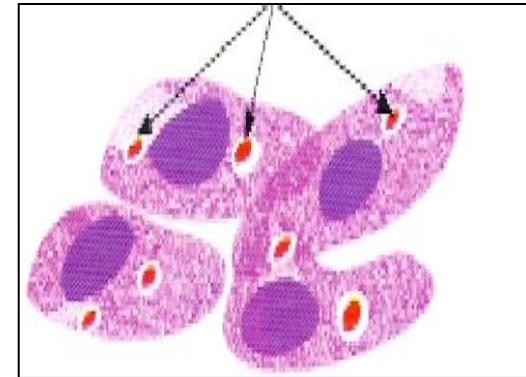
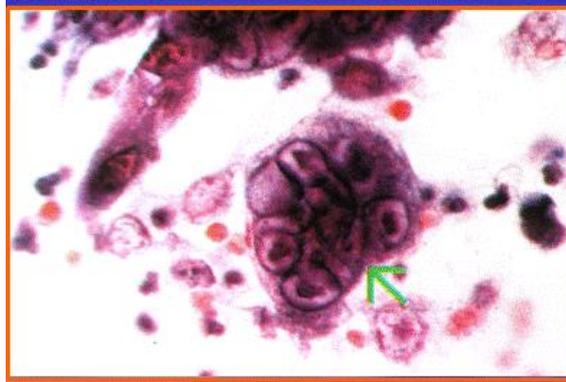


Методы индикации вирусов в культуре клеток

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

Методы индикации вирусов в культуре клеток

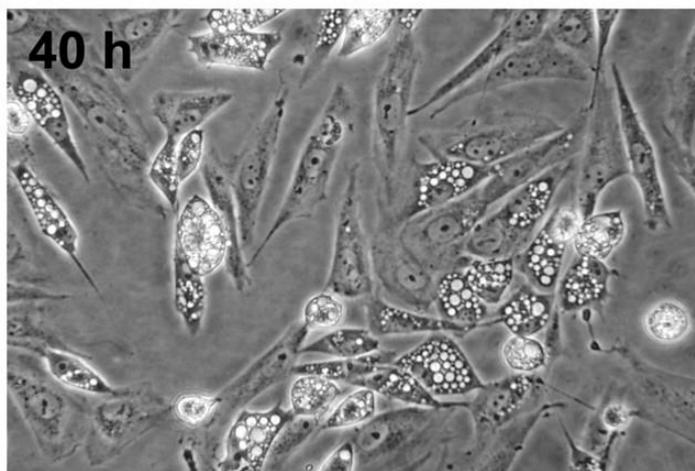
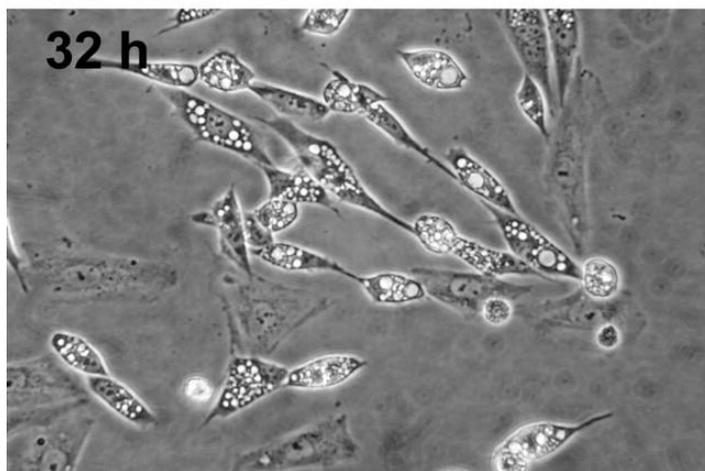
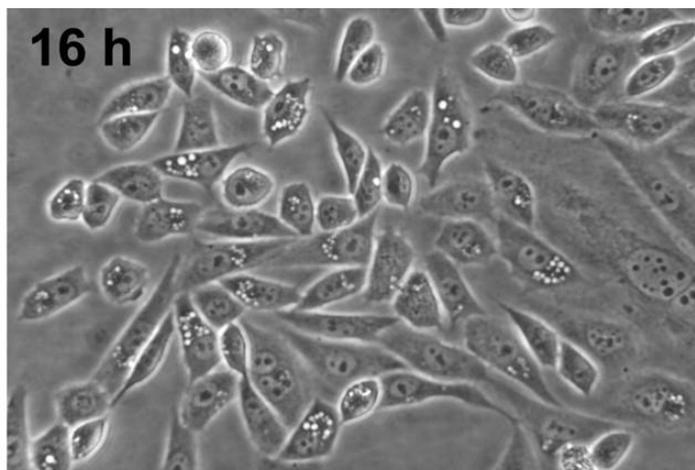
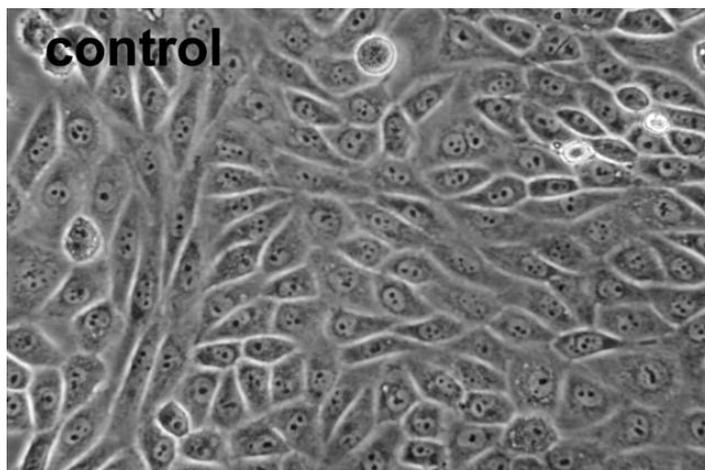
Цитопатогенное действие (ЦПД),
внутриклеточные включения (тельца),
феномен
гемадсорбции,
«негативные
КОЛОНИИ», «цветная
проба»



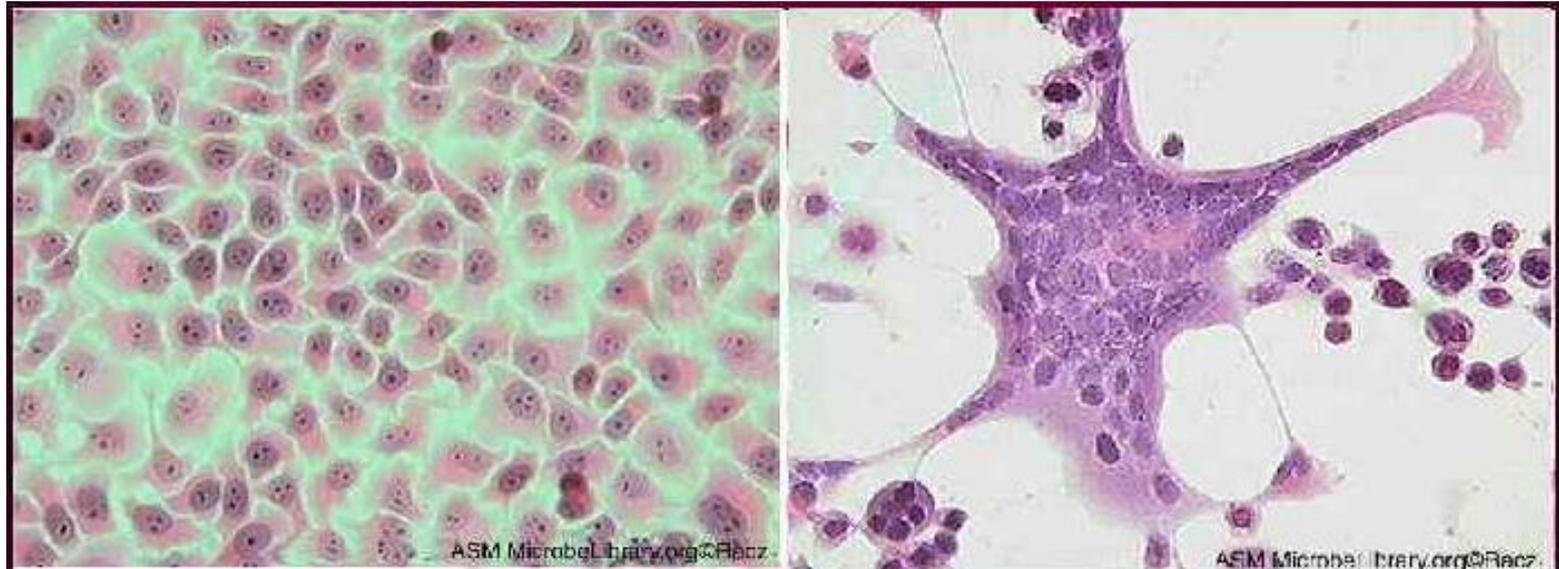
Цитопатогенное действие (ЦПД)

- В процессе репродукции в культуре клеток некоторые вирусы оказывают ***цитопатогенное действие (ЦПД)***, то есть дегенерацию клеток.
- ЦПД проявляется вакуолизацией цитоплазмы клеток, разрушением митохондрий, округлением и гибелью клеток.
- Характер ЦПД позволяет использовать этот феномен для индикации и идентификации вирусов.
- ЦПД может отличаться у разных видов вируса

Цитопатогенное действие

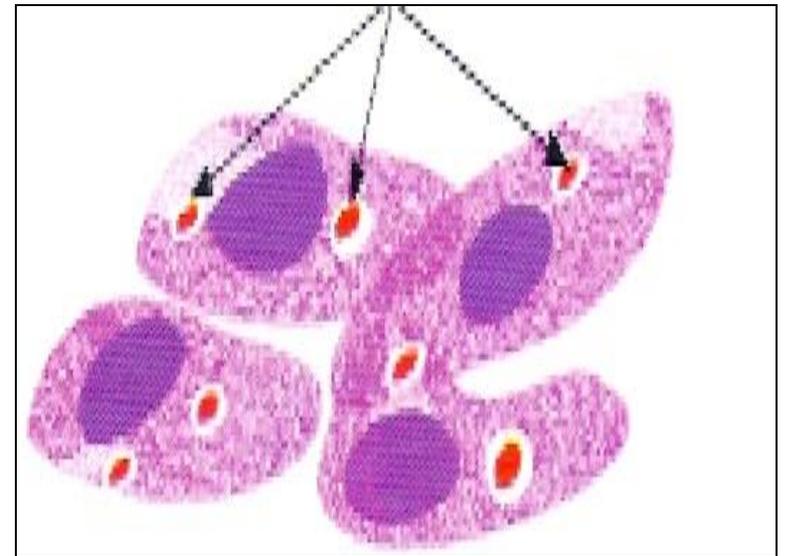


ЦПД вируса простого герпеса



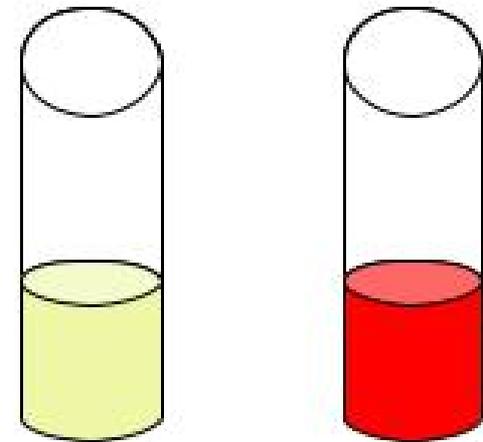
Внутриклеточные включения

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



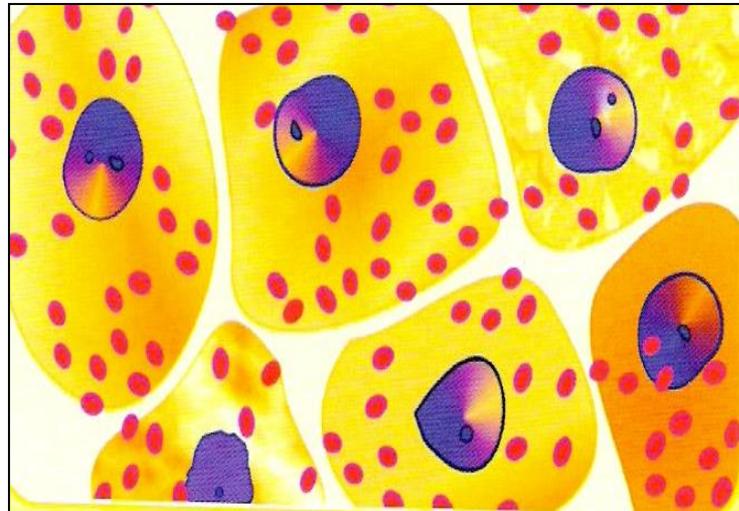
«Цветная проба»

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



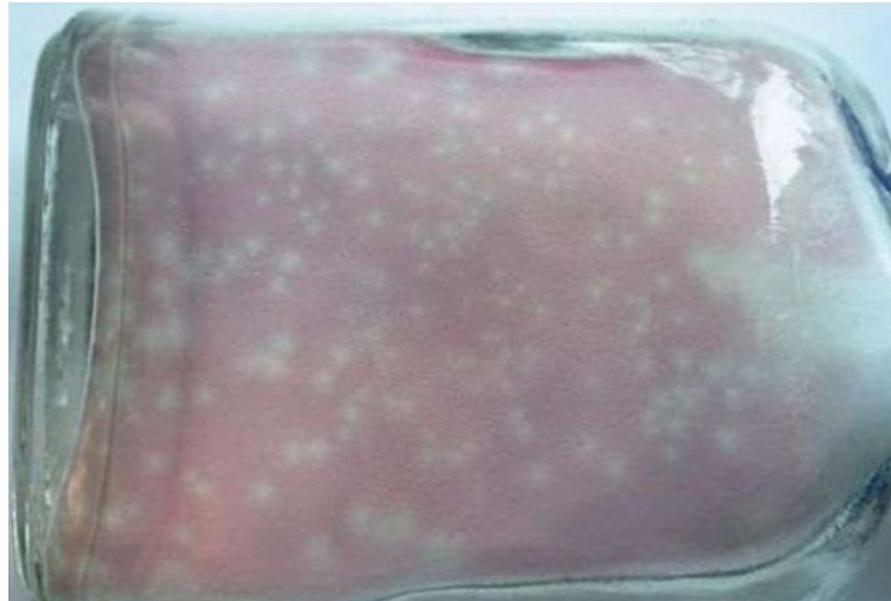
Феномен гемадсорбции

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



«Негативные колонии»

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

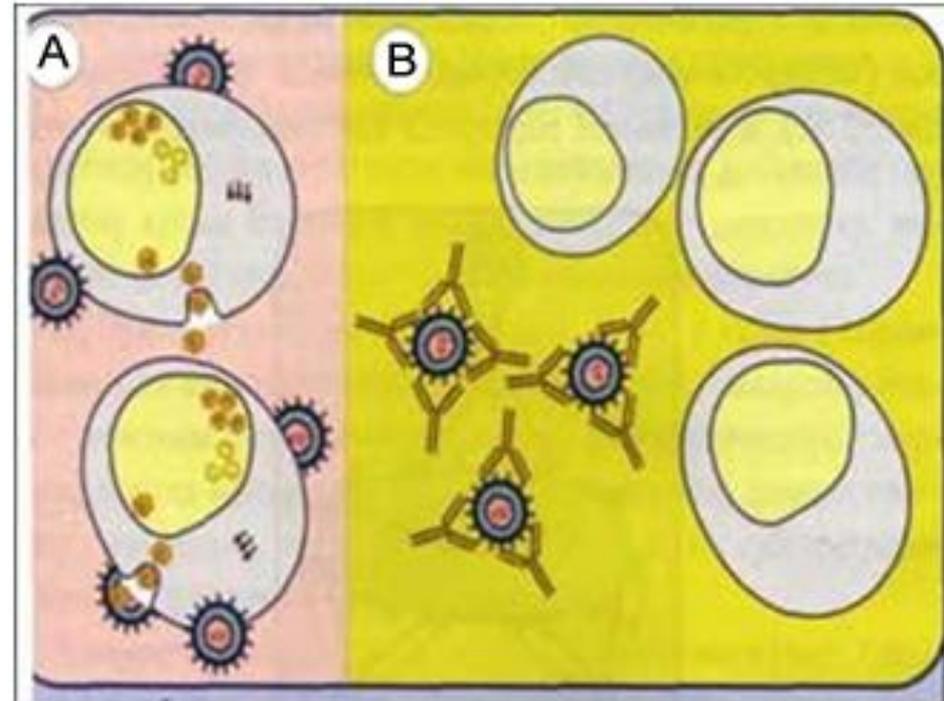


Феномен интерференции

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

Реакция нейтрализации вирусов

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



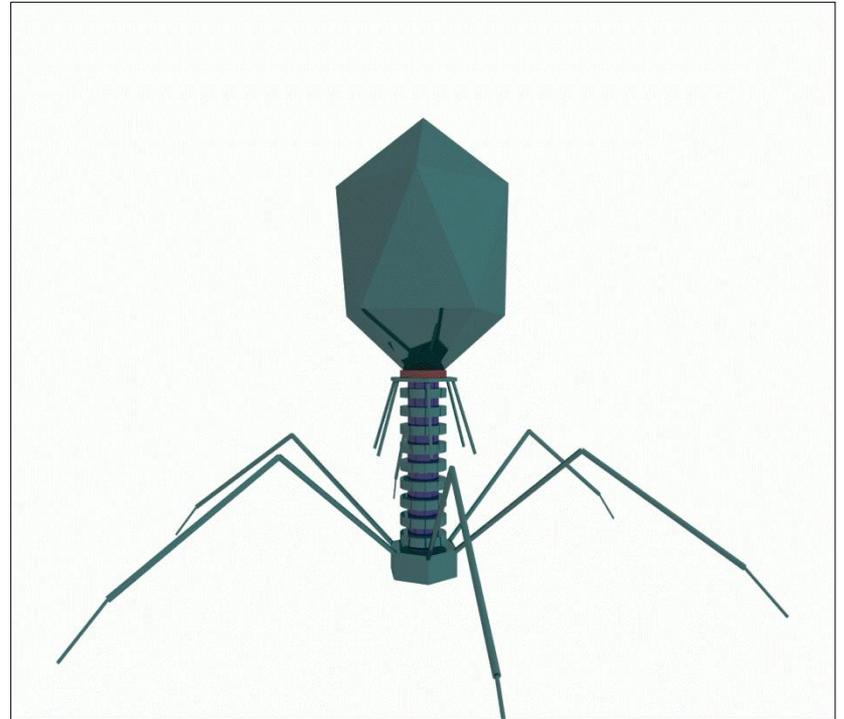
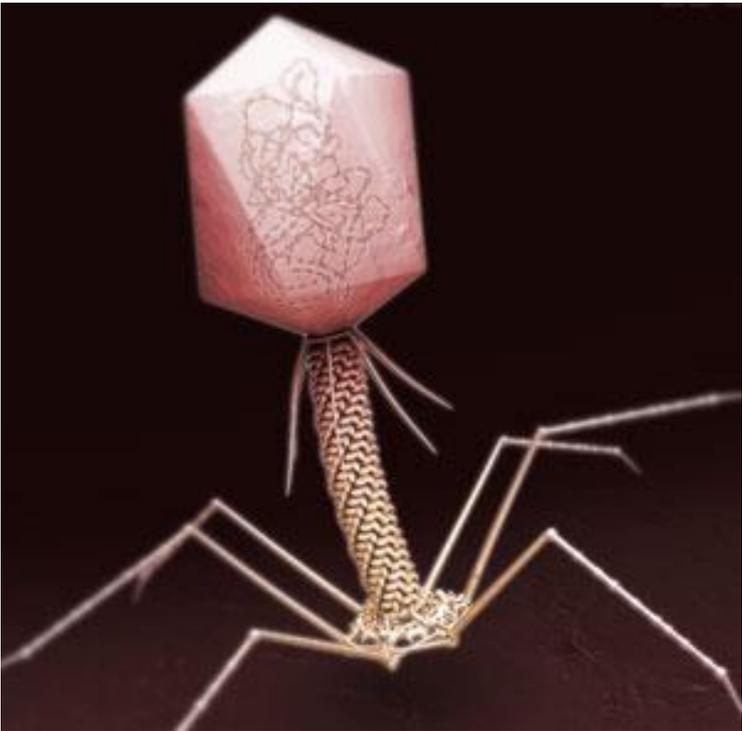
Бактериофаги

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

Строение бактериофагов

- Размеры фагов колеблются от 20 до 800 нм. Их подразделяют на несколько морфологических типов: нитевидные, кубические, сперматозоидной формы и т.д.
- Наиболее изучены колифаги Т (от англ. *type* – типовые). Существуют 7 представителей фагов Т группы, среди которых есть одиночные (Т1, Т3, Т5, Т7) и парные фаги (Т2, Т4, Т6).
- Т2 фаги имеют наиболее сложное строение

Схема строения бактериофагов



Взаимодействие вирулентных фагов с бактериальной клеткой

1. Адсорбция фагов на бактериальной клетке
2. Проникновение нуклеиновой кислоты фага внутрь бактериальной клетки
3. Репликация нуклеиновой кислоты и синтез белков фага
4. Формирование фаговой частицы
5. Выход фага из бактериальной клетки

Взаимодействие умеренных фагов с бактериальной клеткой

- После проникновения умеренного фага в бактериальную клетку ДНК фага встраивается в хромосому бактерии и существует вместе с ней, то есть развивается **интегративная** инфекция. Гибель клетки при этом не происходит.
- ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии, называется **профагом**.
- Подобное сосуществование бактерии и умеренного бактериофага называется **лизогенией**, а культура бактерии, зараженная таким фагом - **лизогенной**
- Профаги некоторой части лизогенных бактерий могут исключаться из хромосом и переходить в вегетативное состояние. Этот процесс заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий
- Превращение умеренного фага в вирулентный возможно под действием различных факторов, н-р, ионизирующего излучения, УФ-лучей и т.д.

Дефектные фаги

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

Получение бактериофагов

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

Определение чувствительности бактерий к фагам методом «стекающей капли»

Определение чувствительности к фагам основывается на строгой специфичности их действия

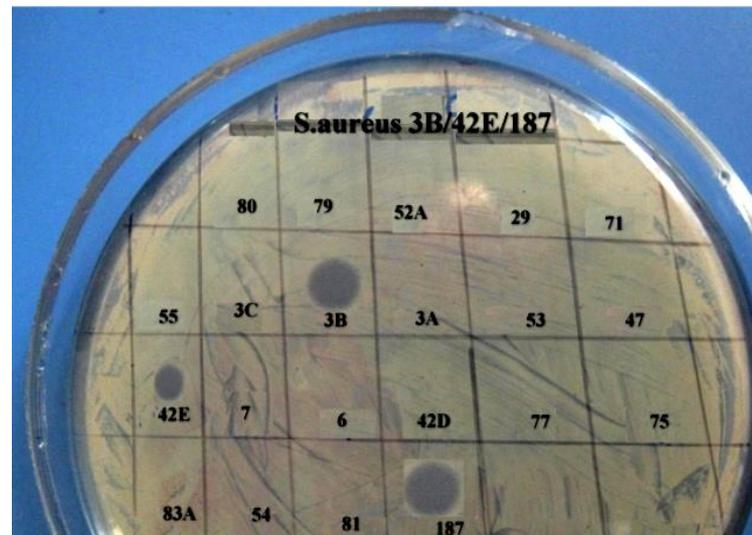
- Применение диагностических (известных) фагов позволяет идентифицировать неизвестную культуру микробов
- Исследуемую бактериальную культуру засевают газоном на поверхности плотной питательной среды в чашке Петри. Затем на поверхность агара наносят суспензию известного фага, и наклонив чашку способствуют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



Определение фаготипа (фаготипаж)

Фаготип бактерий определяют с целью выявления источника инфекции

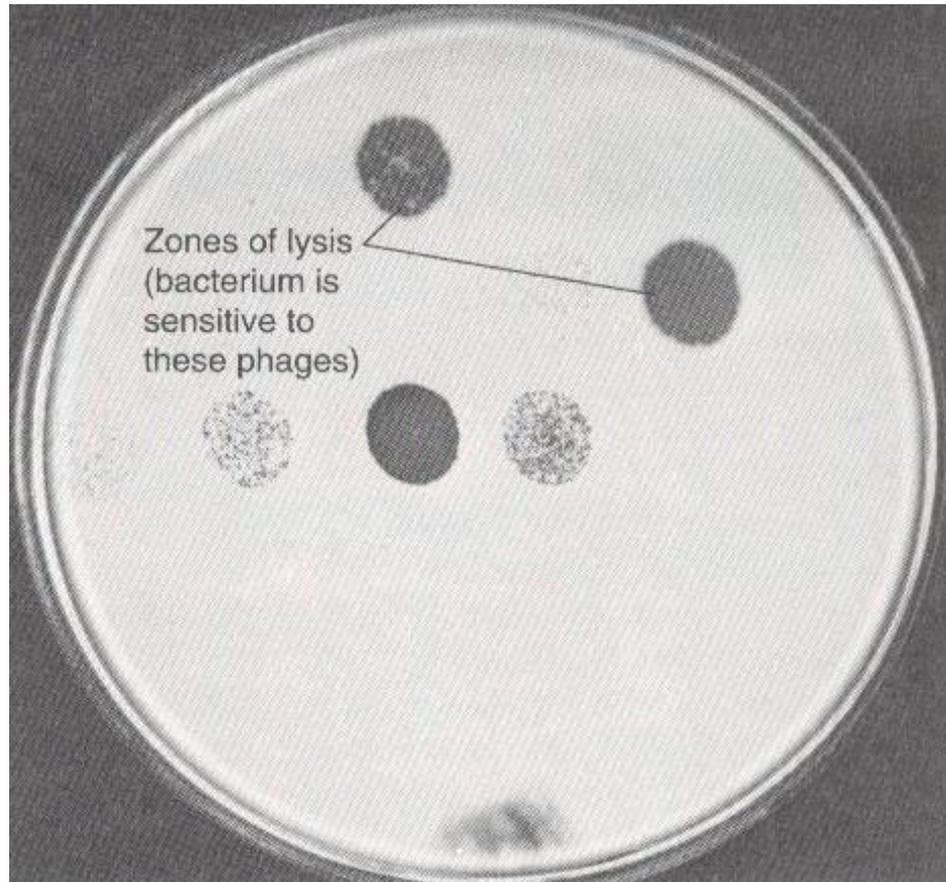
- Испытуемую суточную бульонную культуру засевают на плотную питательную среду в чашку Петри, задняя поверхность которой разграничена на квадраты.
- На каждый квадрат наносят по одной капле различных типоспецифических фагов пастеровской пипеткой
- После суточной инкубации просматривают чашку, отмечая те квадраты, в которых наблюдается лизис бактерий. Фаготип бактериальной культуры определяется тем типом фага, который вызвал лизис.



Практическое применение фагов

- Специфичность фагов составляет основу **фагодиагностики**
 - Применение диагностических фагов позволяет проводить идентификацию неизвестной микробной культуры
 - Фаготипирование (**фаготипаж**) применяется для выявления источника заболевания
- **Фагопрофилактика** и **фаготерапия** основывается способности фагов уничтожать чувствительные к ним бактерии в организме больного. С этой целью фаги выпускают в виде лекарственных препаратов

Фагодиагностика



Экология микроорганизмов

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

Экосистема и ее компоненты

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

Микроорганизмы, обитающие в экосистеме

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

Типы взаимоотношений между микроорганизмами

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

Типы взаимоотношений между микроорганизмами

- **Мутуализм** - взаимовыгодные взаимоотношения разных симбионтов, которое выгодно для каждого из них. Примером мутуалистического симбиоза служат лишайники – симбиоз гриба и сине-зеленой водоросли (цианобактерии).
- - *Метабиоз* – взаимоотношение микроорганизмов, при котором один из них использует для своей жизнедеятельности продукты жизнедеятельности другого.
 - *Комменсализм* – сожительство особей разных видов, при котором выгоду извлекает один вид, не причиняя вреда другому.
 - *Сателлизм* – усиление роста одного вида микроорганизма под влиянием другого вида
- **Антагонизм** выражается в виде неблагоприятного воздействия одного вида микроорганизма на другой, приводящий к повреждению и даже его гибели.

Микроорганизмы в окружающей среде

Основы санитарной микробиологии

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

Санитарно-показательные микроорганизмы

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

Микрофлора почвы

- **Микробный состав почвы.** Различные патогенные и условно-патогенные микроорганизмы могут проникать в почву через фекалии человека и животных.
- **Заболевания передаваемые через почву**
- **Санитарно-показательные микроорганизмы почвы** - *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens*
- **При санитарно-микробиологическом исследовании почвы определяют**
 - общее микробное число в 1гр. почвы
 - титр санитарно-показательных микроорганизмов (*E.coli* и *C.perfringens*);
 - количество термофильных бактерий в 1гр.почвы;
 - при эпидемиологических показаниях в почве определяют патогенные микроорганизмы (сальмонеллы, шигеллы, возбудители столбняка, ботулизма и некоторые вирусы).

Санитарно-микробиологическое исследование почвы

- С площади не менее 5х5м отбираются 5 точечных проб почвы («метод конверта»). Образцы берут соблюдая правила асептики, с глубины в 20-25 см, в количестве 1 кг.
- Общее количество микробов определяется инокуляцией 10-кратных разведений почвы в глубине плотных питательных сред. При малом фекальном загрязнении, кишечные палочки обнаруживаются с помощью методов ферментации или мембранных фильтров.
- При сильном фекальном загрязнении, исследование проводится путем инокуляции почвенной взвеси непосредственно в среду Эндо.

Санитарно-микробиологическое исследование почвы

- Важным критерием санитарного состояния почвы и ее способности к самоочищению является *перфрингенс-титр* (минимальное количество почвы, в котором обнаруживается *Clostridium perfringens*).
- При фекальном загрязнении почвы кишечные палочки исчезают через 4-5 месяцев, а клостридии обнаруживаются в титре 0,01 г.
- Перфрингенс –титр определяют путем инокуляции 10-кратных разведений почвенной взвеси в среду Вильсона-Блэра.
- Количество термофильных бактерий определяют путем инкубации образцов при 60 ° С
- Титр нитрифицирующих бактерий определяют путем инокуляции 10-кратно разведений почвенной взвеси в жидкую среду Виноградского

Микрофлора воды

- **Микробный состав воды**
- **Жизнеспособность микроорганизмов в воде и процессы самоочищения воды**
- **Патогенные микроорганизмы, обитающие в воде и заболевания, передающиеся водным путем**
- **Санитарно-показательные микроорганизмы воды (*E.coli*)**
- **При санитарно-микробиологическом контроле воды определяют следующие показатели:**
 - общее количество бактерий в 1 м воды, т .е. *общее микробное число*
 - *коли-титр* минимальное количество жидкости в котором обнаружена одна кишечная палочка;
 - *коли-индекс* количество кишечных палочек в 1 л воды.
 - при эпидемиологических показаниях в воде определяют *патогенные микроорганизмы*
- **Коли-титр для водопроводной воды должен составлять <300 , коли индекс - 3, микробное число >100 , отсутствовать патогенные микроорганизмы**
- **Проблемы очистки воды**

Определение общего микробного числа воды

- При исследовании берут 1мл водопроводной воды, и 1.0; 0.1 и 0.01 мл воды из открытых водоемов
- Исследуемую воду заливают в стерильные чашки Петри, и добавляют охлажденную до 45-50°C питательную среду
- После инкубации при 37°C в течение 24 ч, выдерживают еще 24 ч. при комнатной температуре
- Проводят подсчет выросших колоний, и определяют количество КОЕ/мл для бактерий, дрожжевых и плесневых грибов

Определение коли-титра воды

- Определение коли-титра и коли-индекса воды проводят при использовании мембранных фильтров или титрованием
- **Метод мембранных фильтров.** 3 образца исследуемой воды (100мл) пропускают через фильтры из целлюлозы, затем фильтры помещают в чашки на среду Эндо и инкубируют 24 ч при 37⁰С. По количеству лактозапозитивных колоний проводят оценку результатов.



Микрофлора воздуха

- **Микробный состав атмосферного воздуха и закрытых помещений**
- **Жизнеспособность микроорганизмов в воздухе**
- **Патогенные микроорганизмы, обитающие в воздухе и заболевания**
- **передаваемые посредством воздуха**
- **Санитарно-показательные микроорганизмы воздуха - гемолитические стрептококки и *Staphylococcus aureus***
- **Принципы санитарно-микробиологического исследования воздуха**
- Исследование воздуха проводят в основном в лечебных и детских учреждениях. При этом определяют:
 - общее количество бактерий в 1 m^3 ;
 - количество альфа- и бета-гемолитических стрептококков и золотистого стафилококка в 1 m^3 ;
 - наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в 1 m^3

Обеззараживание воздуха

Микробиологический контроль воздуха

- **Аспирационный метод** основывается на прохождении воздуха через приборы и его осаждение на питательные среды. В данном случае возможно определить как количественный так и качественный состав микрофлоры.
- **Метод Кротова** — основан на механическом прокачивании воздуха через клиновидную щель в крышке, расположенной над вращающейся поверхностью среды в чашке Петри. При этом происходит осаждение бактерий из воздуха на поверхность питательной среды.
- После инкубирования подсчитывают количество выросших колоний и выражают обсемененность воздуха в КОЕ в определенном объеме воздуха



Микробиологический контроль воздуха

- **Метод седиментации или осаждения** основан на механическом осаждении находящихся в воздухе микроорганизмов на поверхности питательных сред. Этот метод используется для изучения состава микрофлоры воздуха
- Чашки Петри с питательным агаром оставляют открытыми в течение некоторого времени. Затем закрывают и инкубируют в термостате. С помощью этого метода можно определить микробное загрязнение воздуха.
- Используя формулу Омелянского можно приблизительно подсчитать сколько бактерий осаждается на поверхности агара площадью в 100 см^2 в течение 5 м из 10л воздуха

$$\text{Микробное число (X)} = \frac{A \times 100 \times 1000 \times 5}{B \times 10 \times t}$$

X — количество микробов в 1 м^3 ,
A — количество колоний на агаре в чашке,
B — площадь чашки,
t — время (в минутах) экспозиции,
5 — время Омелянского,
10 — объем осаждаемого воздуха, за 5 минут,
100 — площадь осаждения (коэффициент),
1000 — искомый объем воздуха (в литрах)

Роль микроорганизмов в окружающей среде

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

Роль микроорганизмов в окружающей среде

(круговорот азота)

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

Роль микроорганизмов в окружающей среде (круговорот углерода)

- Известно, что при фотосинтезе цианобактерии и водоросли превращают *углекислый газ (CO_2) в органические соединения*
- *Расщепление органических соединений до CO_2* происходит в основном в организме животных и человека. В этом процессе активное участие принимают микроорганизмы.
- Анаэробное расщепление органических соединений происходит путем брожения
- В присутствии кислорода окисление органических веществ до CO_2 и воды осуществляют аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы и животные

Роль микроорганизмов в окружающей среде (круговорот серы)

- **Круговорот серы начинается с разложения органических веществ с образованием сероводорода (H_2S).** В данном процессе особенно активно принимают участие бактерии родов *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*, получающие энергию в процессе анаэробного сульфатного дыхания
- ***Превращение сероводорода в свободную серу***
- ***Окисление свободной серы до сульфатов (SO_4)***
- ***В синтезе органических соединений из сульфатов*** также принимают участие микроорганизмы

Нормальная микрофлора организма человека

- Большинство представителей нормальной микрофлоры являются не причиняющими вреда комменсалами-сапрофитами.
- Представителей нормальной микрофлоры можно обнаружить на коже и слизистых оболочках верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и мочевыводящих путей и т.д.
- Распределение нормальной микрофлоры в слизистых оболочках подчиняется особой «географической специализации». К примеру, дистальные отделы слизистых оболочек, сообщающиеся с внешней средой более богаты микроорганизмами.
- Многие ткани и органы организма человека не сообщающиеся с внешней средой не содержат микроорганизмов. Они являются стерильными. К ним относятся кровь, лимфа, внутренние органы, мозг, спинномозговая жидкость и т. д.

Нормальная микрофлора организма человека

- Различают постоянную и транзиторную микрофлору
- **Постоянная или резидентная** (индигенная, автохтонная) представлена микробами, постоянно присутствующими в организме.
- Она представлена **облигатной** (*бифидобактерии, лактобактерии, бактероиды, кишечные палочки*) и **факультативной** (*стафилококки, стрептококки, клебсиеллы, клостридии*) микрофлорой
- **Транзиторная микрофлора** (аллохтонная) не способна к длительному существованию в организме

Микрофлора кожи

Микроорганизмы	Морфологические особенности
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Грам(+) гроздевидные кокки
<i>Staphylococcus aureus</i>	Грам(+) гроздевидные кокки
<i>Propionobacterium acne</i>	Грам(-) плеоморфные палочки
<i>p. Corynebacterium</i> (дифтероиды)	Грам(+) плеоморфные палочки
<i>p. Lactobacillus</i>	Грам(+) палочки
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Грам(+) кокки
<i>p. Candida</i>	Дрожжеподобные грибы
<i>Malassezia furfur</i>	Дрожжеподобные грибы

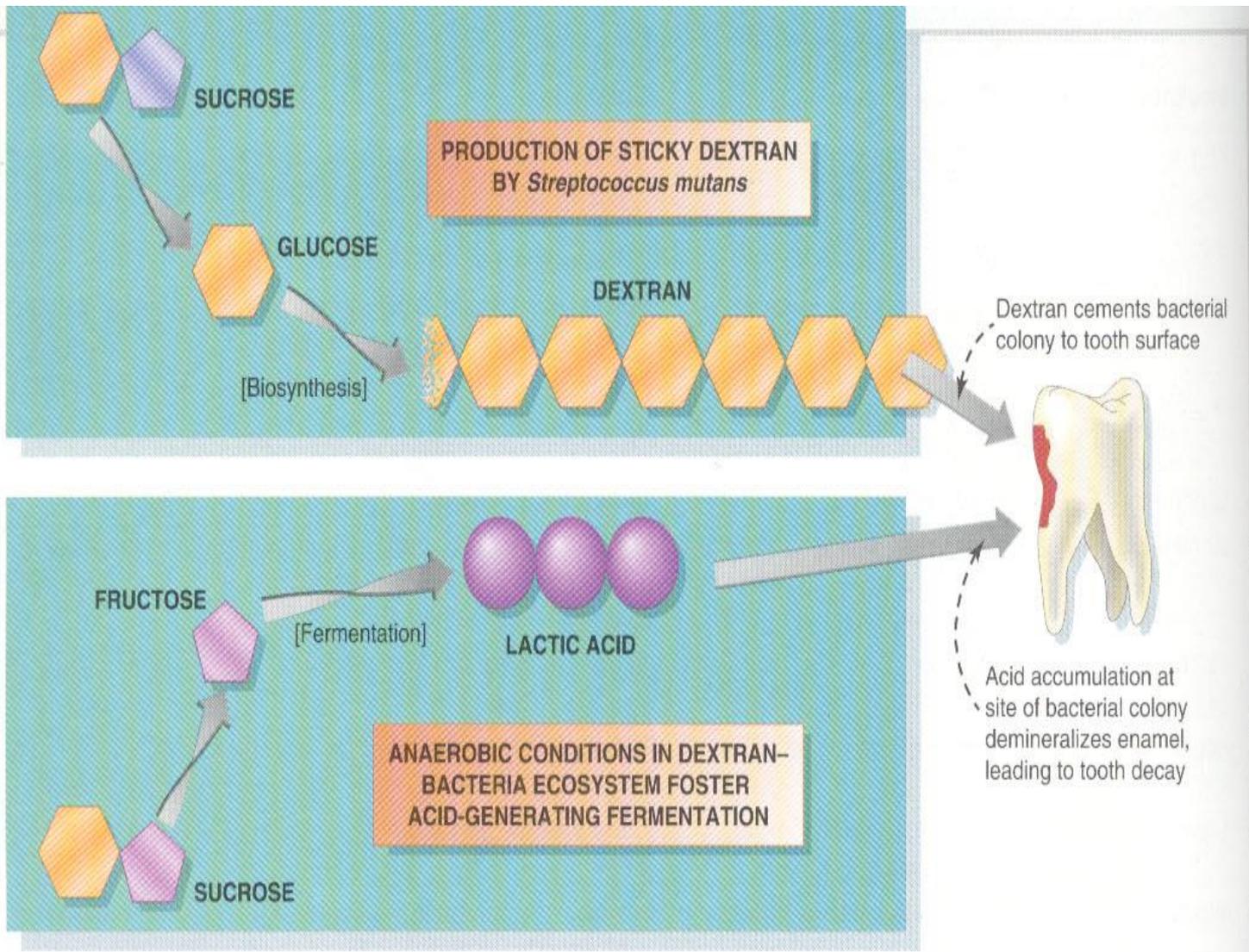
Микрофлора дыхательных путей

Анатомическая область	Микроорганизм	Морфологические свойства
Верхние дыхательные пути (полость носа и носоглотка)	<p>Staphylococcus epidermidis Staphylococcus aureus Зеленыящие стрептококки Streptococcus pneumoniae Branhamella catarrhalis p.Corynebacterium (дифтероиды) p.Наемophilus p.Bacteroides p.Actinomyces</p>	<p>Грам(+) гроздьевидные кокки Грам(+) гроздьевидные кокки Грам(+) кокки в виде цепочек Грам(+) диплококки Грам(-) коккобактерии Грам(+) плеоморфные палочки Грам(-) плеоморфные палочки Грам(-) плеоморфные палочки Грам(+) палочки, или нитевидные, образующие мицелий</p>
Нижние дыхательные пути (трахея, бронхи, бронхиолы, легкие)	Микроорганизмы не встречаются	

Нормальная микрофлора пищеварительного тракта

Анатомическая область		Микроорганизм	Морфологические особенности
Ротовая полость			
Слюна и зубы		<p>р. Streptococcus</p> <p>р. Lactobacillus</p> <p>р. Veilonella</p> <p>р. Bacteroides</p> <p>Fusobacteria</p> <p>р. Actinomyces</p>	<p>Грам(+) кокки в виде цепочек</p> <p>Грам(+) палочки</p> <p>Грам (-) диплококки</p> <p>Грам(-) плеоморфные палочки</p> <p>Грам(-) палочки</p> <p>Грам(+) палочки, или нитевидные, образующие мицелий</p>
Глотка, миндалины	глоточные	<p>р. Streptococcus</p> <p>Branhamella catarrhalis</p> <p>р. Corynebacterium (дифтероиды)</p> <p>р. Staphylococcus</p>	<p>Грам(+) кокки в виде цепочек</p> <p>Грам(-) коккобактерии</p> <p>Грам(+) плеоморфные палочки</p> <p>Грам(+) гроздьевидные кокки</p>
Пищевод		Микроорганизмы слюны и пищевых масс	
Желудок		<p>р. Lactobacillus</p> <p>р. Corynebacterium (дифтероиды)</p> <p>р. Candida</p>	<p>Грам(+) палочки</p> <p>Грам(+) плеоморфные палочки</p> <p>Дрожжеподобные грибы</p>

Этиологическая роль микроорганизмов в развитии кариеса



Нормальная микрофлора пищеварительного тракта

Анатомическая область	Микроорганизм	Морфологические свойства
Тонкая кишка	<p>р.Lactobacillus р.Enterococcus р. Bacteroides р.Candida</p>	<p>Грам(+) палочки Грам(+)кокки Грам(-) плеоморфные палочки Дрожжеподобные грибы</p>
Толстая кишка	<p>р.Bacteroides р.Bifidobacterium Сем-во Enterobacteriaceae р.Enterococcus р.Clostridium р.Fusobacterium р.Lactobacillus р.Staphylococcus р.Peptostreptococcus р.Candida Entamoeba coli р.Trichomonas</p>	<p>Грам(-) плеоморфные палочки Грам(+) палочки Грам(-) палочки Грам(+) диплококки Грам(+) спорообразующие палочки Грам(-) палочки Грам(+) палочки Грам(+) гроздьевидные кокки Грам(+) кокки в виде цепочек Дрожжеподобные грибы Protozoa Protozoa</p>

Микрофлора толстой кишки

- Толстая кишка чрезвычайно богата микроорганизмами. Содержит 10^8 - 10^{12} микробных клеток в 1 гр. фекалий. Наибольшее количество микроорганизмов обнаруживается в дистальных отделах толстой кишки. Микроорганизмы составляют около 20-30% фекалий.
- Нормальная микрофлора толстой кишки представлена приблизительно 500 видов микробов, поэтому эту область иногда называют микробным резервуаром организма.

Микрофлора толстой кишки

- **Облигатная микрофлора** толстой кишки представлена в основном анаэробными бактериями (96-99%).
- Преимущественными представителями нормофлоры являются *бактероиды, бифидобактерии, анаэробные лактобактерии*.
- 1-4% всей флоры составляют другие представители облигатной флоры, н-р, *E.coli, Enterococcus, Lactobacillus*
- **Факультативная микрофлора** представлена другими представителями семейства *Enterobacteriaceae*, бактериями родов *Clostridium, Fusobacterium, Staphylococcus, Peptostreptococcus, Candida* и др.

Микрофлора слизистой.

Просветная микрофлора.

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

Слизистая кишечника как входные ворота инфекции

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

Возрастные особенности микрофлоры толстого кишечника

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

Нормальная микрофлора мочеполового тракта

Анатомическая область	Микроорганизм	Морфологические свойства
Мочеиспускательный канал (нижняя треть)	<p>р. Micrococcus</p> <p>Staphylococcus epidermidis</p> <p>р. Streptococcus</p> <p>Mycobacterium smegmatis</p> <p>р. Corynebacterium (дифтероиды)</p> <p>р. Bacteroides</p> <p>р. Neisseria</p> <p>Сем-во Enterobacteriaceae</p>	<p>Грам(+) кокки</p> <p>Грам(+) гроздьевидные кокки</p> <p>Грам(+) кокки в виде цепочек</p> <p>Грам(+) кислотоустойчивые палочки</p> <p>Грам(+) плеоморфные палочки</p> <p>Грам(-) плеоморфные палочки</p> <p>Грам(-) диплококки</p> <p>Грам(-) палочки</p>
почки, мочевыводящие пути, мочевого пузыря, верхние отделы мочеиспускательного канала	Микроорганизмы не встречаются	
Влагалище	<p>р. Lactobacillus</p> <p>р. Corynebacterium (дифтероиды)</p> <p>р. Streptococcus</p> <p>р. Staphylococcus</p> <p>Сем-во Enterobacteriaceae</p> <p>р. Candida</p> <p>Trichomonas vaginalis</p>	<p>Грам(+) палочки</p> <p>Грам(+) плеоморфные палочки</p> <p>Грам(+) кокки в виде цепочек</p> <p>Грам(+) гроздьевидные кокки</p> <p>Грам(-) палочки</p> <p>Дрожжеподобные грибы</p> <p>Protozoa</p>
матка, маточные трубы, яичники	Микроорганизмы не встречаются	

Значение нормальной микрофлоры

- Большинство представителей нормальной микрофлоры, особенно облигатные, обладают **антагонистической активностью** в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.
- Эта активность связана со способностью продуцировать органические кислоты (молочную, уксусную и др.) антибиотики, бактериоцины и пр. соединения, препятствующие **колонизации патогенных микроорганизмов**
- Таким образом, микрофлора участвует в **колонизационной резистентности**, которая является совокупностью защитных свойств организма и конкурентных свойств нормальной микрофлоры кишечника, придающих стабильность микрофлоре и предотвращающих колонизацию организма посторонними микробами.

Значение нормальной микрофлоры

- Нормальная микрофлора – важный фактор ***врожденного иммунитета***. Антигены микрофлоры неспецифически стимулируют иммунную систему
- Нормальная микрофлора индуцирует синтез антител, которые можно обнаружить в сыворотке здоровых людей.
- Нормофлора кишечника участвует в водно-солевом обмене, обмене белков, углеводов, жирных кислот, в продукции биологически активных соединений (антибиотиков, витаминов (К и группы В))

Значение нормальной микрофлоры

- Значение микрофлоры было установлено после того, как были получены **безмикробные животные-гнотобионты**.
- Животные-гнотобионты содержат в специальных безмикробных условиях (подаются стерильный воздух, пища, вода).
- Недоразвитие основных иммунокомпетентных органов у гнотобионтов (например, тимуса, лимфоидной ткани кишечника) делает эти животные восприимчивыми к инфекциям и неспособными выживать в обычных условиях

Жизнь в стерильных условиях

- Основные различия между гнотобионтами и обычными животными кроются в процессах разложения и механизмах защиты против болезней.
- Поскольку у гнотобионтов нет бактерий, их ткани не подвергаются гниению.
- Поскольку они никогда не контактируют с микроорганизмами, у них снижена активность систем защиты: у них меньше лейкоцитов, лимфоидной ткани, практически нет антител
- Гнотобионты получают витамины без участия бактерий (раньше считалось, что они необходимы для получения витаминов), а их экскременты (до сих пор считалось, что на 50% они состоят из разлагающихся веществ) весят столько же, сколько и у обычных животных

Жизнь в стерильных условиях

- В отсутствие инфекционных болезней, гнотобионтные животные погибают только от органичных нарушений. Потому они являются прекрасной площадкой для изучения нарушений функции органов, старения тканей и других медицинских проблем пожилого возраста.
- *При подобных обстоятельствах ученые могут заняться изучением еще более увлекательной проблемы: насколько можно продлить жизнь?*
- Ученые Нотр-Дама (Частный университет в городе Саут-Бенд, Индиана, США) уже сотрудничают с клиникой Чикагского университета в изучении кариеса, а с другими лабораториями в изучении вирусных инфекций, питания, витаминов и заболеваний кур. Планируется также изучение болезней сердца и онкологических заболеваний

Дисбиоз и дисбактериоз

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

Факторы, способствующие развитию дисбиозов и дисбактериозов

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

Механизм развития дисбиоза и дисбактериоза

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

Заболевания связанные с дисбиозом и дисбактериозом

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

При диагностике кишечного дисбиоза и дисбактериоза учитывают следующие признаки

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

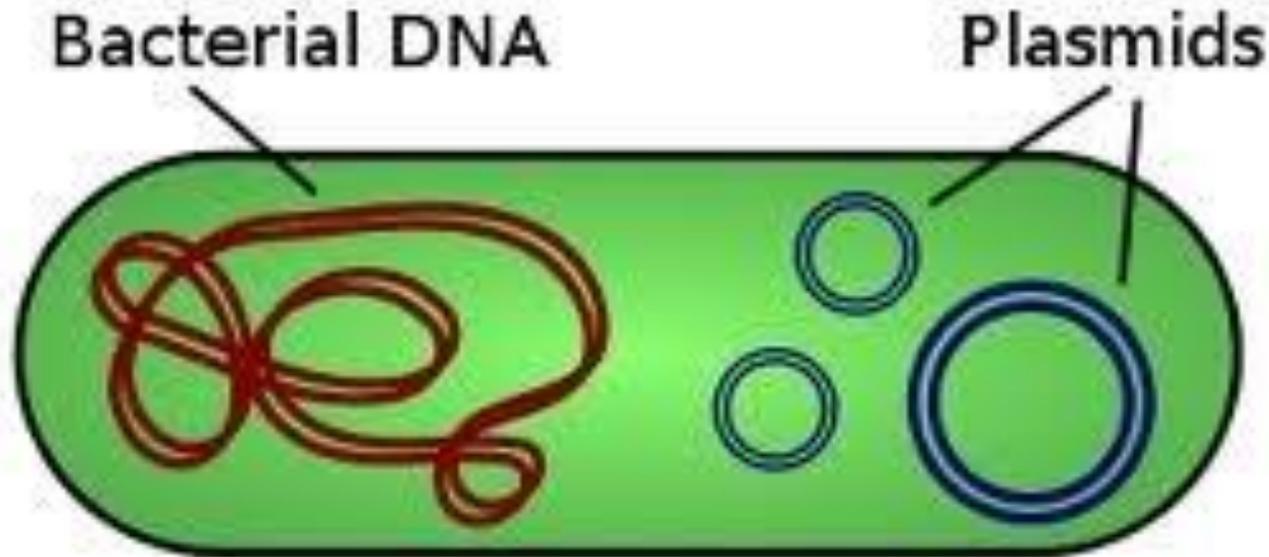
Лечение дисбиоза и дисбактериоза

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

Организация генетического аппарата у бактерий

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

Организация генетического аппарата у бактерий



Нуклеоид бактерий

- По аналогии с ядром эукариотических клеток ДНК бактерий называют **нуклеоидом**, который состоит примерно из 4000 генов. Бактериальная хромосома обладает **гаплоидным набором** генов, ее удвоение обычно сопровождается делением клетки.
- При делении бактериальной клетки количество хромосом может достигать 2-4, а иногда 10-15. Обычно хромосома бактериальной клетки содержит 5×10^6 н.п. (для сравнения суммарная длина хромосомных ДНК человека 3×10^9). Длина бактериальной хромосомы (н-р, у *Escherichia coli*) в развернутом состоянии составляет около 1мм .

Гены

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

Генотип

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

Фенотип

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

Внехромосомные генетические элементы

- Внехромосомные факторы наследственности бактерий представлены *плазмидами* и *мигрирующими генетическими элементами*.
- Они кодируют неосновные для жизнедеятельности микробной клетки функции, но обеспечивают адаптацию к условиям внешней среды.

Плазмиды

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

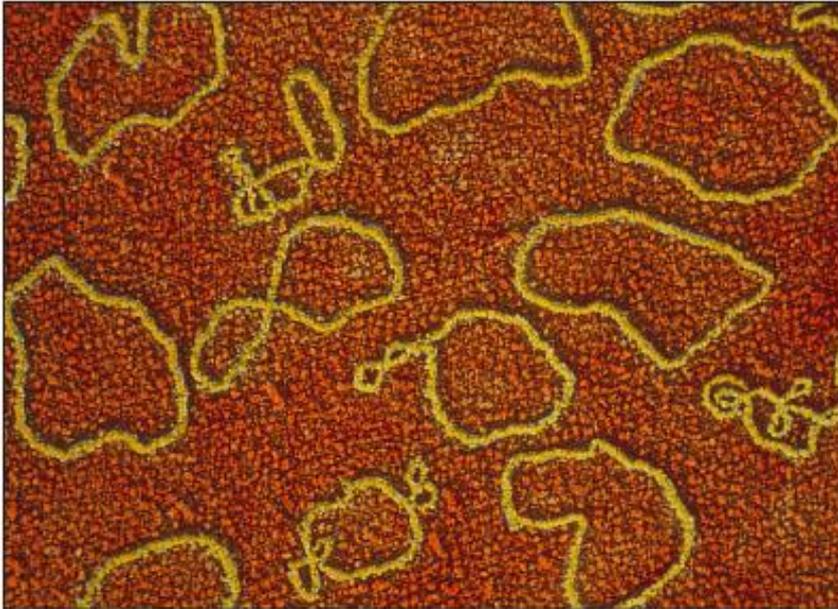
Плазмиды обладают следующими свойствами:

- Реплицируются независимо от хромосомы
- Передаются от одной клетки к другой
- Присутствуют в кольцевой или линейной форме
- Могут передаваться от клетки к клетке.

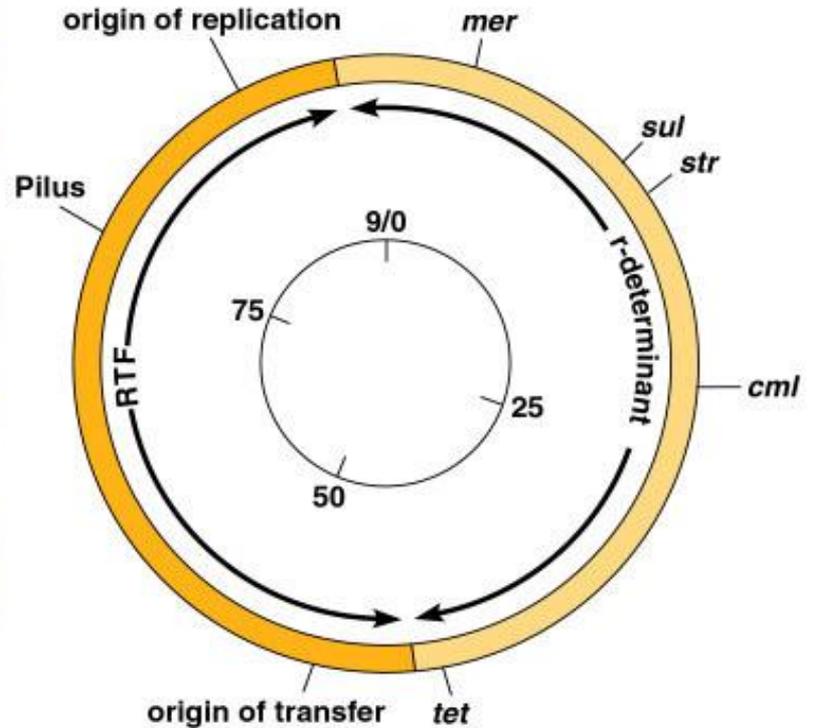
Плазмиды

- Будучи внехромосомными факторами наследственности плазмиды обуславливают устойчивость бактерий к антибиотикам, образование ими колицинов, продукцию токсинов и пр. свойства. В соответствии с определенными признаками, кодируемыми плазмидными генами, выделяют следующие плазмиды:
- **F- плазмиды** (от англ. *fertility* – плодовитость) – участвуют в конъюгации
- **R- плазмиды** (от англ. *resistance* - устойчивый) – детерминируют синтез ферментов разрушающих антибактериальные препараты
- **tox⁺-плазмиды** - детерминируют синтез экзотоксинов (н-р, дифтерийный и ботулинический токсины)
- **Col⁺-плазмиды** - детерминируют синтез колицинов и др. бактериоцинов кишечной палочкой *E.coli*

Плазмиды



(a)



(b)

Мигрирующие генетические элементы

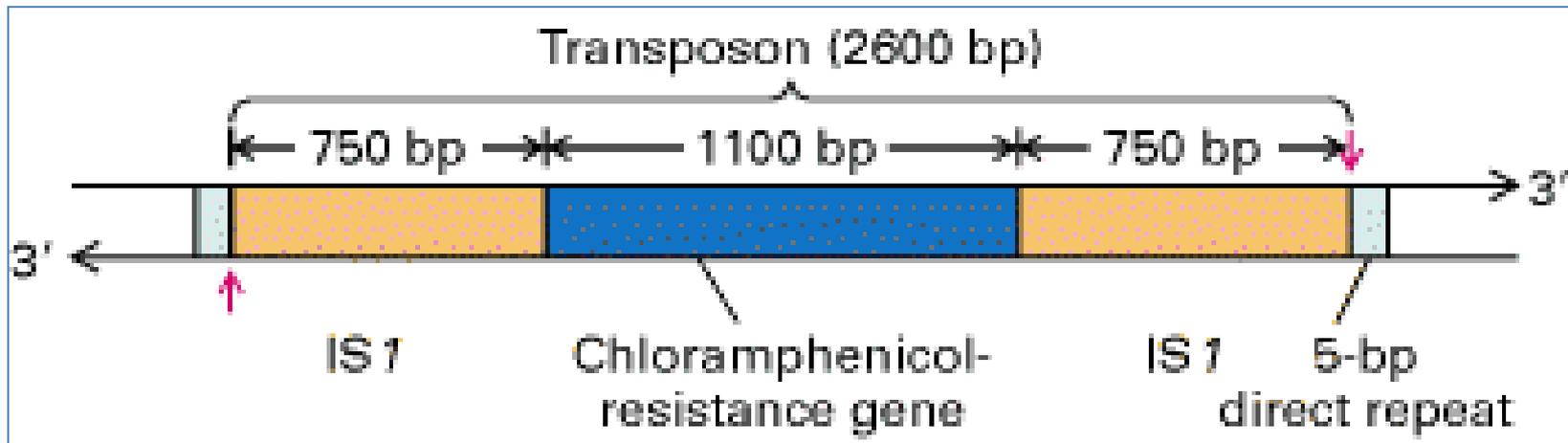
- Отдельные участки ДНК, способные осуществлять собственный перенос (транспозицию) из одного участка репликона в другой, а также между репликонами называются ***подвижные генетические элементы***
- Транспозиция обусловлена способностью мигрирующих элементов кодировать специфический фермент - ***транспозазу***
- **К мигрирующим генетическим элементам относятся**
- - вставочные последовательности (IS- элементы),
- транспозоны (Тn- элементы),
- дефектные фаги

IS-элементы

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

Транспозоны

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



Виды изменчивости у бактерий

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

Модификация

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

Диссоциация

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

R - S диссоциация

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



Сравнительная характеристика микроорганизмов образующих S- и R-колонии

S-колонии	R- колонии
Колонии гладкие, блестящие , выпуклые	Колонии неправильной формы, мутные, шероховатые
Вызывают помутнение в жидких средах	Образуют осадок в жидких средах
Могут иметь жгутики	Могут не иметь жгутики
Могут образовывать капсулу	Не образуют капсулу
Биохимически активны	Биохимическая активность низкая
Патогенные виды высоковирулентные	Слабо вирулентные
Обнаруживаются в основном при острой форме болезни	Обычно обнаруживаются при хронической форме болезни

Наследственная изменчивость

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

Мутации

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

Мутации

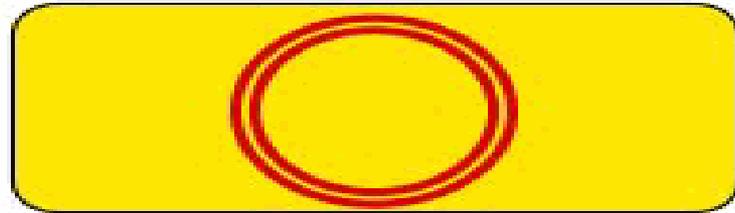
- **Спонтанные**
 - *обратные, или реверсии*
- **Индукцированные**
 - *мутагены (химические, физические, биологические)*
- **Точечные (генные) мутации**
 - *фреймшифт мутации (со сдвигом рамки считывания)*
 - *миссенс мутации (с изменением смысла)*
 - *нонсенс мутации (антисмысловые, бессмысленные)*
- **Хромосомные мутации (делеции, инверсии, дупликации)**
- **По фенотипическим признакам- (нейтральные, условно-летальные, летальные мутации)**

Генетические рекомбинации

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

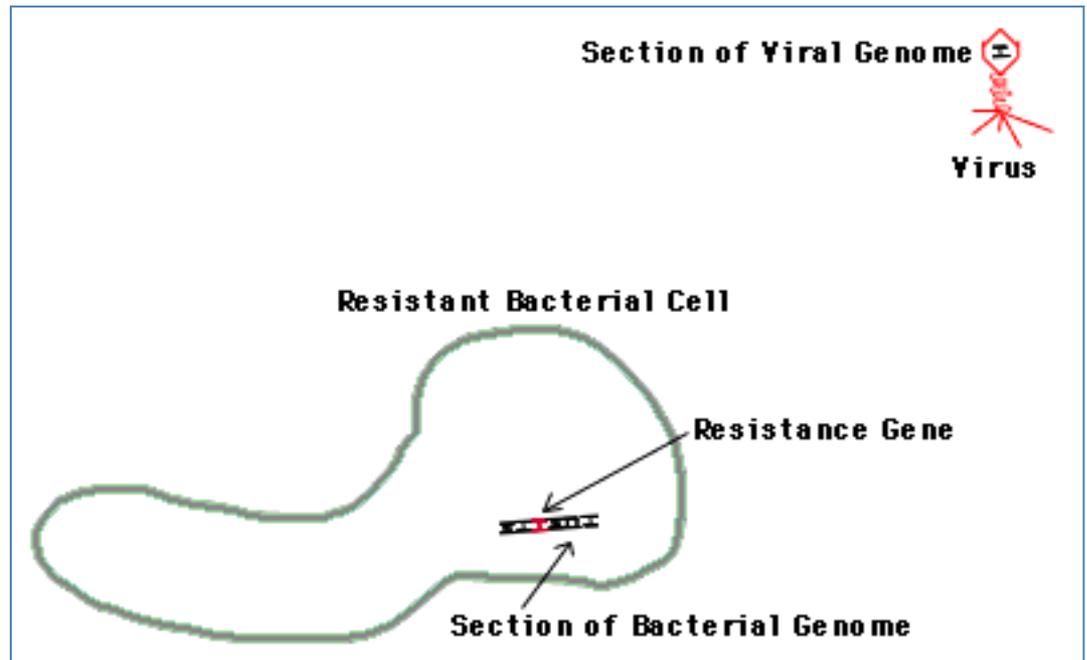
Трансформация

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



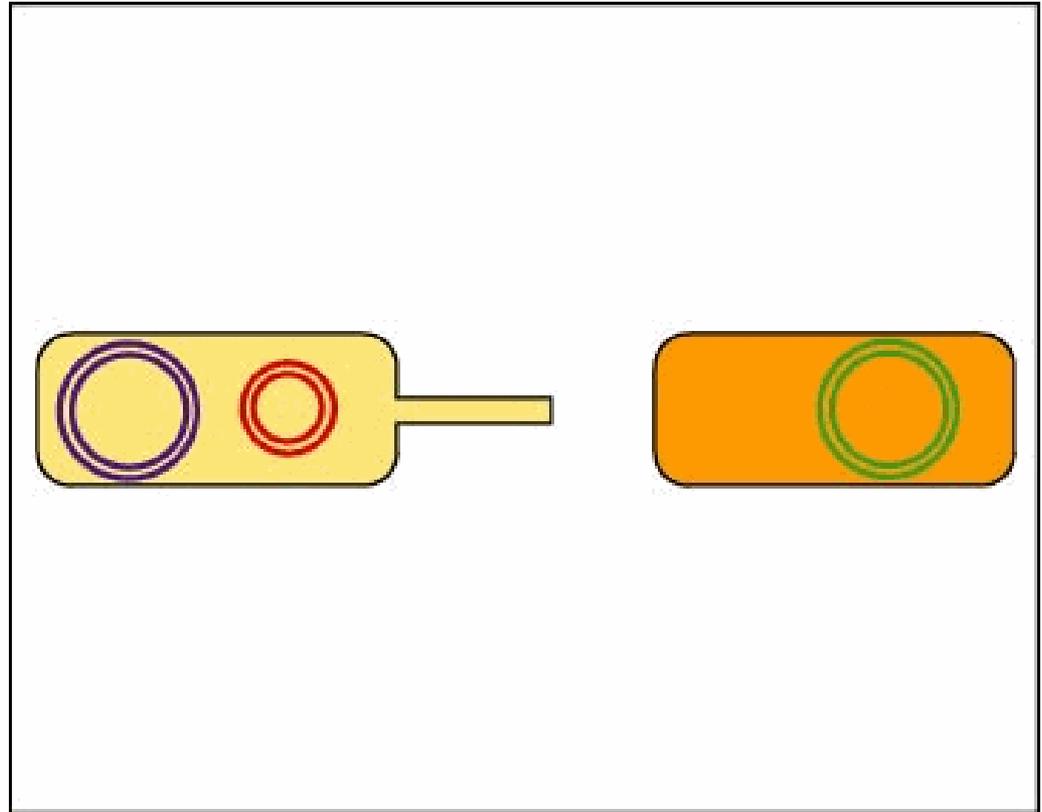
Трансдукция

Трансдукция –
передача
бактериальной
ДНК от донора к
реципиенту
посредством
бактериофага

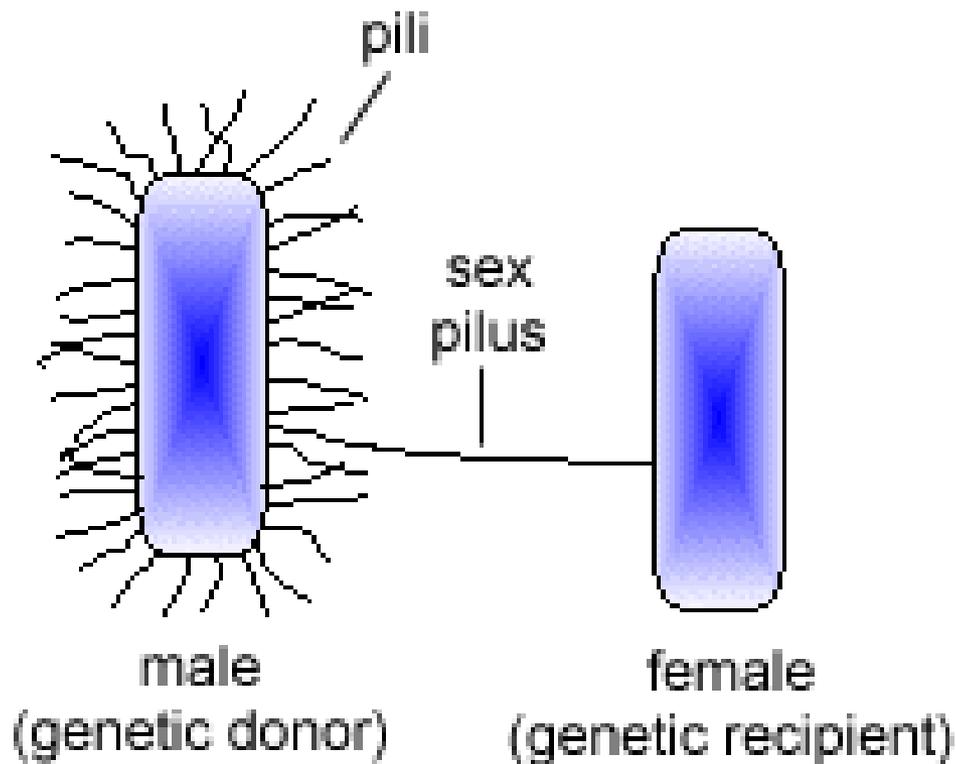


Конъюгация

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



Конъюгация



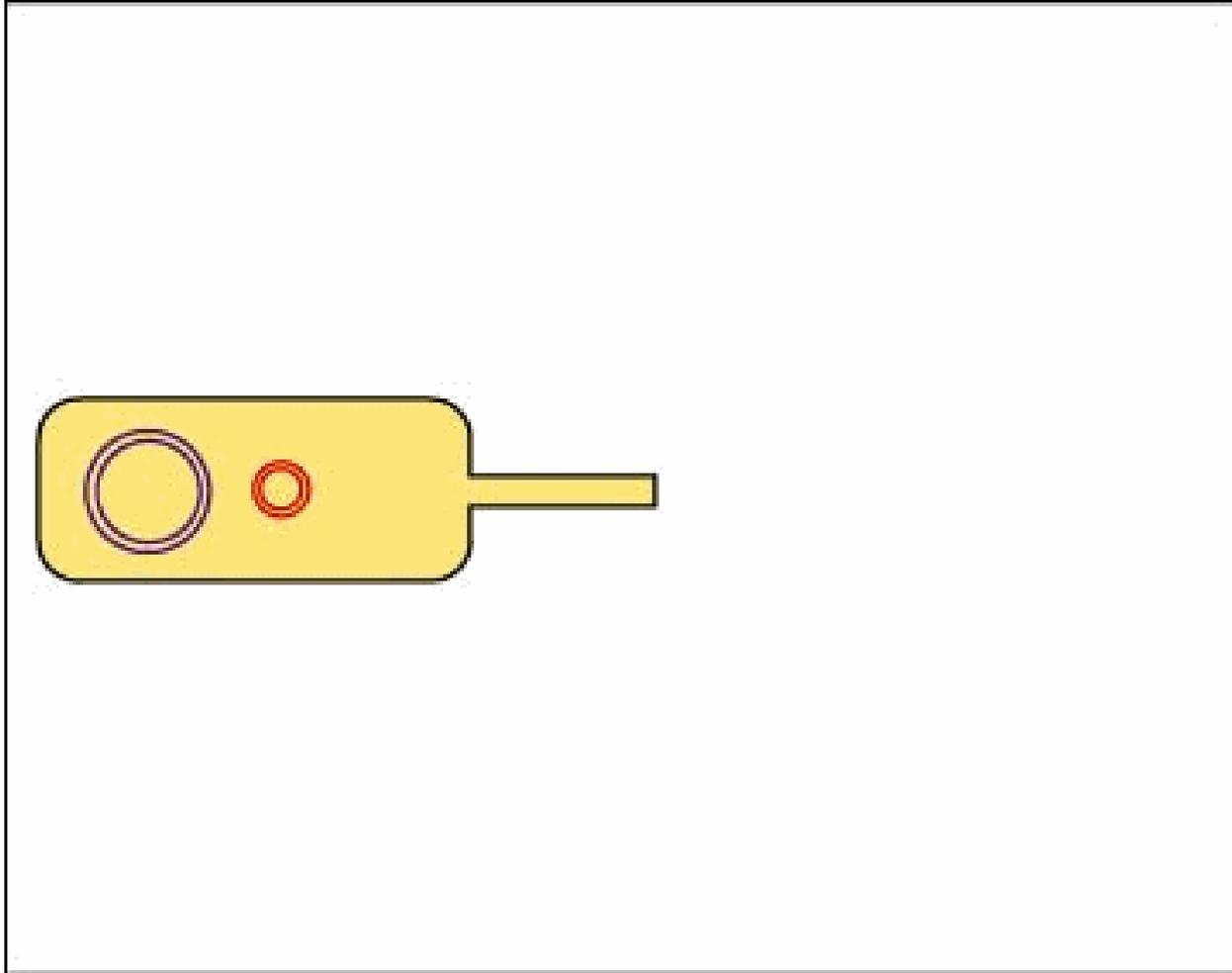
Конъюгация

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

Процесс конъюгации между Hfr- штаммом и F⁻ клеткой

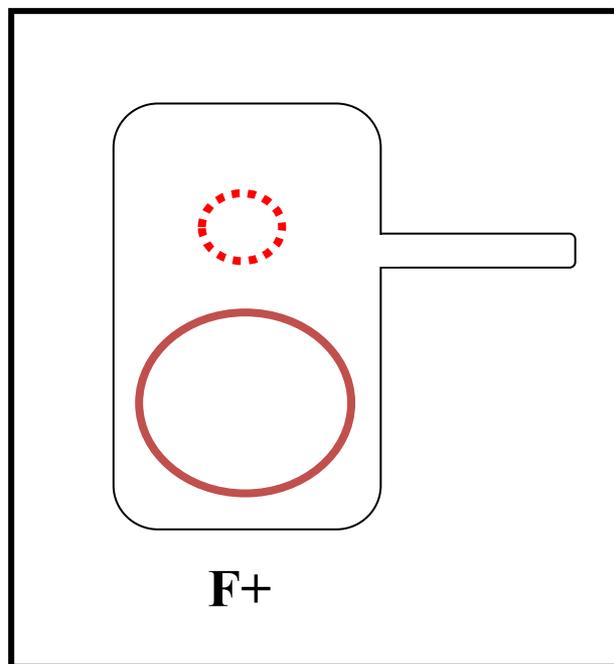
- В процессе конъюгации между Hfr-штаммом и F⁻ клеткой, реципиентная клетка остается F⁻ т.к., полная трансмиссия явление редкое, вследствие хрупкости конъюгационного мостика
- При **Hfr- конъюгации** одна нить донорской ДНК передается в реципиентную клетку, другая остается в Hfr-клетке, то есть донор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

Процесс конъюгации между Hfr- штаммом и F⁻ клеткой



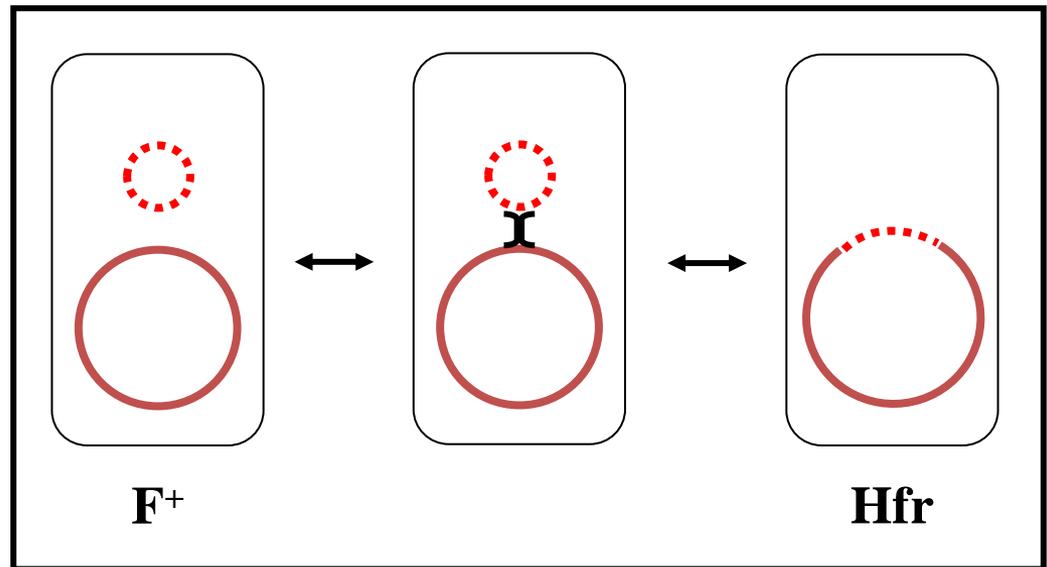
Генетика вирусів

F⁺ клетки



Hfr-штаммы

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



Особенности вирусного генома

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

Виды изменчивости у вирусов

- Модификации
- Мутации
 - не имеющие фенотипического проявления (нейтральные)
 - имеющие фенотипическое проявление
 - летальные – образование бляшек при репродукции
 - условно-летальные – термостабильность вирусов (ts-мутанты)
 - Увеличение инфекционного спектра вирусов
 - Резистентность к противовирусным препаратам

Генетические взаимодействия между вирусами

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

Фенотипические взаимодействия между вирусами

- **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 при смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами. В результате часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам.
- **Фенотипическое маскирование** происходит при множественном инфицировании. Феномен заключается в образовании нуклеокапсида, состоящего из генома одного вируса и капсида другого(**псевдотипирование**)