

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.1.1 Персистенция микроорганизмов

Направление подготовки (специальность) 36.06.01 Ветеринария и зоотехния
(уровень подготовки кадров высшей квалификации по программе подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре)

Профиль подготовки (специализация) 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций.....	3
1.1 Лекция № 1 Особенности экологической стратегии микроорганизмов.....	3
1.2 Лекция № 2 Паразитарные системы.....	7
1.3 Лекция № 3 Персистенция бактериальных патогенов, как результат симбиотических отношений.....	14
1.4 Лекция № 4 Экологическая детерминация персистентных свойств микроорганизмов.....	20
1.5 Лекция № 5 Секретируемые факторы персистенции бактерий.....	22
1.6 Лекция № 6 Секретируемые факторы персистенции бактерий.....	22
1.7 Лекция № 7 Факторы защиты патогенных и условно-патогенных бактерий на примере системы «паразит-хозяин»	28
1.8 Лекция № 8 Факторы патогенности микроорганизмов.....	36
1.9 Лекция № 9 Факторы персистенции микроорганизмов на примере системы «паразит-хозяин».....	38
1.10 Лекция № 10 Диагностическая значимость персистентного потенциала микроорганизмов в санитарной микробиологии, экологии, медицине и ветеринарии.....	43
2. Методические указания по проведению практических занятий.....	47
2.1 Практическое занятие № ПЗ-1 Секретируемые факторы персистенции: антилизосимная активность.....	47
2.2 Практическое занятие № ПЗ-2 Секретируемые факторы персистенции: антикарнозиновая активность.....	49
2.3 Практическое занятие № ПЗ-3 Секретируемые факторы персистенции: антилактоферриновая активность.....	51
2.4 Практическое занятие № ПЗ-4 Секретируемые факторы персистенции: антикомплементарная активность.....	53
2.5 Практическое занятие № ПЗ-5 Секретируемые факторы персистенции: IgA-протеазная активность.....	55
2.6 Практическое занятие № ПЗ-6 Факторы патогенности микроорганизмов: структурные компоненты бактериальной клетки.....	56
2.7 Практическое занятие № ПЗ-7 Факторы патогенности микроорганизмов: секретируемые факторы.....	59
2.8 Практическое занятие № ПЗ-8 Внутриклеточный паразитизм микроорганизмов.....	61
2.9 Практическое занятие № ПЗ-9 Диагностическая значимость персистентного потенциала микроорганизмов в санитарной микробиологии, экологии.....	63

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1 (2 часа)

Тема «Особенности экологической стратегии микроорганизмов»

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Симбиотические ассоциации
2. Особенности паразитизма и его эволюция

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Симбиотические ассоциации

Практически все живущие на планете организмы существуют в тесной связи друг с другом, находясь в симбиотических отношениях. **Симбиоз** ("живущие вместе") — понятие, не содержащее никаких дополнительных оттенков (хорошо или плохо, польза или вред и т. д.). Заселение той или иной экологической ниши, с другим биообъектом, совместное освоение разными организмами территориального пространства для жизни или просто соседское сосуществование — все это разновидности ассоциаций симбиоза, которые приобретают разный смысл в зависимости от позиций симбионта. То, что выгодно одному партнеру при симбиозе, совсем может быть не выгодно для другого, и наоборот.

Микробиологическая наука свидетельствует, что человек, животные, растения, простейшие представляют собой прекрасные ниши для заселения L. микроорганизмами. Целевые установки бактерий при этом совершенно различны, но основаны на степени относительной пользы, получаемой партнером от такого симбиоза.

Следует сделать лишь оговорку, что четкое разделение категорий симбиоза иногда бывает крайне затруднено, так как одни и те же симбионты на различных этапах своего сосуществования могут переходить из одной категории симбиотических отношений в другую при изменении условий жизни. Тем не менее, в микробиологии определяются три категории ассоциаций симбиоза: комменсализм, мутуализм и паразитизм.

КОММЕНСАЛИЗМ — наиболее простой вариант симбиотических отношений организмов, когда один вид использует другой организм, больший по размеру, в качестве своего физического окружения с возможным получением пищевых ресурсов. Это характерно для бактериальной микрофлоры, находящейся на коже человека, животных, когда поселившийся комменсал непритязателен к условиям своего сосуществования. Такой вариант комменсализма распространяется и на микрофлору других частей организма хозяина (пищеварительный тракт, мочеполовые органы, слизистые носа, глаз и др.).

В качестве комменсалов рассматривают бактериоиды — микроорганизмы, в большом количестве заселяющие толстую кишку человека и животных. Хозяин предоставляет им условия для жизни: поверхность слизистой, оптимальную температуру, pH, пищевой субстрат, который они ферментируют. Взамен хозяин может использовать (а может и не использовать) некоторые продукты бактериальной ферментации. Бактериоиды безвредны для организма в обычных условиях. Но, к сожалению, при повреждении ткани кишечника (хирургическое вмешательство) изменение кишечной микрофлоры (прием антибиотиков) или снижение иммунитета (стрессовые состояния) могут создать условия, когда бактериоиды станут опасны для хозяина и даже могут нанести ему вред.

В кишечнике человека есть и доминирующий вид — кишечная палочка, которая в обычных условиях составляет основу нормальной (индигенной) микрофлоры. Этот микроорганизм не просто использует "территорию" своего хозяина для проживания, но и старается быть ему полезным: синтезирует для него витамины группы В, сохраняет постоянное микроокружение и не пропускает случайные патогены, утилизирует остатки пищевого субстрата, "тренирует" иммунную систему организма. Нетрудно видеть, что эта деятельность микроорганизмов оказывается выгодной и для другого симбионта, используемого в качестве экониши, — хозяина. Такие взаимоотношения симбионтов основанные на взаимной выгоде двух организмов, определяют как мутуализм. В качестве классических примеров мутуализма рассматривают роль нормальной микрофлоры внутренних органов (лактобациллы во влагалище здоровой женщины) и полостей (бактероиды в рубце крупного рогатого скота) млекопитающих, когда микроорганизмы удовлетворяют свои пищевые потребности за счет хозяина и одновременно приносят ему пользу, сохраняя его внутренний гомеостаз (т. е. здоровье). Палочка Дедерлейна, поселяясь во влагалище женщины, за счет своего кислотообразования "поддерживает" чистоту влагалища, так как кислые значения рН несовместимы с жизнью многих патогенов. Бактероиды в рубце животных получают питание от хозяина, взамен расщепляя целлюлозу и крахмал пищи и выравнивая уровень жирных кислот и газов. Хозяин поглощает кислоты через стенку рубца, получая огромный энергетический потенциал.

Таким образом, **мутуалистический симбиоз** — это взаимовыгодное сожительство, когда оба партнера получают выигрыш.

И, наконец, третья категория симбиотических взаимоотношений — **паразитизм**. Эти отношения выгодны лишь одному симбионту — микроорганизму, в ущерб другому — хозяину.

Паразитирующие виды извлекают пользу из ассоциации, обеспечивая свои основные жизненные интересы за счет хозяина, повреждая его органы и системы и провоцируя тем самым состояние болезни.

Паразитизм возникает при проникновении в хозяина патогенных (болезнетворных) микроорганизмов. Дизентерийная амеба, шигеллы, сальмонеллы, холерный вибрион поселяются на слизистой оболочке кишечника и вызывают воспаление с образованием язв в его стенке. В то же время, как мы уже указывали, и бывшие комменсалы могут сменить свои отношения с хозяином. Это случается при изменении условий существования, когда некоторые условно-патогенные бактерии приобретают высокоспециализированные функции и начинают причинять вред хозяину (бактероиды, кишечная палочка, стафилококки, протей)

Оценивая симбиотические связи микроорганизмов с хозяином, следует обратить внимание на отсутствие четкой грани - в симбиотических отношениях организмов. С одной стороны, одна и та же экологическая ниша хозяина может быть предоставлена для паразита, мутуалиста и комменсала. С другой, один и тот же микроорганизм может из комменсала или мутуалиста превратиться в паразита при соответствующем изменении условий существования. Смена таких взаимоотношений симбионтов, вероятно, заложена в высоком адаптационном потенциале как хозяина, так и паразита и обусловлена длительной эволюцией жизни в организме, где диапазон симбиотических отношений постоянно совершенствуется. Вот почему все три категории симбиотических отношений тесно связаны между собой и разделяются лишь с известной долей условности.

Учитывая, что паразит-хозяинные отношения лежат в основе персистенции микроорганизмов, рассмотрим некоторые характерные особенности паразитизма и адаптационные возможности симбионтов в системе "паразит - хозяин".

2. ОСОБЕННОСТИ ПАРАЗИТИЗМА И ЕГО ЭВОЛЮЦИЯ. В паразит-хозяинной ассоциации микроорганизмы в обычных условиях далеко не всегда вызывают болезнь. Биологическая целесообразность убеждает в том, что, используя хозяина как эконишу и питательный субстрат, паразиту выгоднее как можно дольше находиться в ней и он пытается осуществить это латентно, без прямого поражения хозяина, без манифестных признаков болезни. В этом случае говорят о состоянии "сбалансированной патогенности" (Smith, 1995). Вопрос в том, что это состояние отражает: отбор возросшего уровня генетически определенной устойчивости в популяции хозяина или эволюционно закрепившуюся норму, где "несбалансированная патогенность" — просто следствие перехода патогена к новому (неестественному) хозяину?

Вероятно, для ответа следует подойти к паразитизму как образу жизни симбионтов. В отличие от вирусов (облигатных паразитов) бактерии только часть своей жизни проводят в клетке хозяина, демонстрируя внутриклеточный (факультативный) паразитизм. Если подойти к оценке паразитизма, этого безусловного успеха эволюции, с диалектической точки зрения, то можно видеть его плюсы и минусы. К наиболее очевидным преимуществам паразитизма как явления следует отнести метаболические, питательные и репродуктивные. Паразитирующий микроорганизм получает от хозяина ряд метаболитов без энергетических затрат со своей стороны. Но так как патоген располагает собственными клеточными механизмами и мультиферментными системами для автономной метаболической активности и синтеза макромолекул, то он имеет лишь относительную зависимость от хозяина (Адамов, 1994). Большинство бактериальных патогенов испытывают пищевую зависимость от хозяина, так как получают материал макромолекул (протеины, полисахариды) и переваривают его благодаря своим энзимным системам, воспринимая низкомолекулярные продукты — аминокислоты, моносахара. Хозяин предоставляет патогенам факторы роста, которые они не могут синтезировать для себя.

Все внутриклеточно паразитирующие патогены удовлетворяют свои потребности в кислороде при дыхании, перейдя на анаэробный его тип, факультативно либо даже облигатно. Что касается репродуктивного процесса, то все усилия паразита сконцентрированы на нем, так как патоген избавлен от многих энерготрат благодаря своему хозяину. Однако развитие и репродукция паразитирующего микроорганизма осуществляются под контролем хозяина, так как патоген утратил способность начинать или регулировать собственное развитие. Индуктором такой регуляции и запуска процесса развития патогена являются молекулярные сигналы хозяина, обеспечивающие "узнавание", адгезию, инвазию и, наконец, репродуктивный цикл паразита.

К негативным моментам паразитизма как явления следует отнести очевидную зависимость развития патогена от хозяина. Понятно, что при отсутствии подходящего хозяина патоген может просто не выжить или вынужден перейти во внешнюю среду, персистируя там некоторое время до нахождения соответствующего хозяина. Именно это обстоятельство позволяет объяснить, почему многие бактерии являются условно-патогенными микроорганизмами или факультативно паразитирующими, способными жить как внутри, так и вне хозяина.

Развитие паразитизма как образа жизни, по-видимому, имело место на ранней стадии эволюции, где оказалась велика роль случайного контакта. Эволюция внутриклеточной жизни способствовала тому, что посредством случайных контактов был осуществлен отбор микроорганизмов, способных к адаптации в условиях эукариотической клетки. Кроме того, бесспорным успехом эволюции внутриклеточного существования симбионтов следует признать их биологическую интеграцию. В качестве примера можно указать на эволюцию митохондрий эукариотической клетки, которые рассматриваются как продукты симбиотически ассоциированных гетеротрофных пурпурных бактерий (Маргелис, 1983). Теория случайного паразитизма нашла свое отражение в отечественных публикациях (Литвин, 1986).

Рассматривая паразитизм как образ жизни, следует отметить большую динамичность жизненных устремлений симбионтов. Это проявляется в высоком уровне адаптации патогена к реакциям хозяина. В отличие от обычной окружающей среды (почва, вода, воздух, гниющие субстраты) хозяин для паразита — это высокоспециализированная среда обитания, которая не пассивна, а постоянно активно реагирует на инфекцию (патоген). В свою очередь, хозяева находятся под постоянным давлением со стороны паразита, который является главным селективным фактором их развития и устойчивости (Адамов, 1994).

С точки зрения эволюции, любая инфекция предъявляет свою собственную цену хозяину, беря одни и отвергая другие его ресурсы. Паразитирующие организмы "сталкиваются" с проблемами выживания не только в окружающей внешней среде, но и в адаптивно меняющейся среде хозяина, где они паразитируют и где хозяин контролирует инфекцию. Ответные реакции в виде воспаления, фагоцитоза, антительного ответа хозяина — это внушительные препятствия для патогена, который для выживания в клетке должен совершенствовать свои тактические приемы, уклоняясь от этих барьеров или преодолевая их.

Паразитирующие патогены научились справляться с ответной (защитной) реакцией хозяина. Для иллюстрации этого положения можно сослаться на микобактерии туберкулеза, которые во избежание воздействия ответной реакции хозяина выживают в инфекционных гранулемах, локализованных в организме. Антигенные изменения спирохет при инфекции способствуют тому, что ответная (антительная) реакция хозяина становится неэффективной за счет неспецифичности. Быстрая репликация холерного вибриона приводит к возникновению острого инфекционного процесса — холеры, когда иммунитет хозяина еще не успевает включиться в его защиту. Наконец, известна способность многих бактерий выживать в слабореактивных особях, поскольку генетическая гетерогенность в популяции хозяина, где некоторые представители не реагируют на инфекцию, позволяет патогену свободно размножаться. Приведенные примеры убеждают в том, что взаимоотношения паразита и хозяина не статичны, а, напротив, динамичны. Паразитирующий микроорганизм заставляет хозяина адаптироваться к его изменениям, но это не исключает и факта, что хозяин, постоянно адаптирующийся к паразиту благодаря своим защитным системам, ставит перед ним новые проблемы выживания. В этом нет ничего удивительного, это лишь иллюстрация закона параллельной эволюции хозяина и паразита, сформулированного Н. И. Вавиловым более 70 лет назад. Биологический смысл взаимоотношений хозяина и паразита определяет динамику этого конфликта между симбионтами, где заболевание хозяина — лишь один из возможных результатов.

1.2 Лекция №2 (2 часа)

Тема «Паразитарные системы»

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Типы паразитов. Патогенность микроорганизмов без критерия времени.
2. Патогенность облигатных паразитов
3. Патогенность факультативных паразитов
4. Патогенность случайных паразитов
5. Смена типа (степени) паразитизма
6. Вторая стратегия паразитизма.
7. Третья стратегия паразитизма.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. **Типы паразитов.** О.В. Бухарин и В.Ю. Литвин (1997) выделяют три типа паразитов. *Облигатные паразиты* — их единственной средой обитания всегда служит какой-то другой хозяин. Поэтому независимо от путей передачи такие возбудители отличаются наиболее выраженной зависимостью от хозяев. Среди возбудителей инфекционных болезней облигатными паразитами являются те, которые при пассажах от одного организма к другому не попадают во внешнюю среду (трансмиссивный, половой, трансплацентарный, лактационный пути передачи, а также укусы животных). *Факультативные паразиты* — помимо организма хозяина, в процессе циркуляции могут в разной мере использовать внешнюю среду, так что эта категория паразитов очень не однородна. Отличие их от облигатных паразитов состоит в возможности выхода во внешнюю среду различными нетрансмиссивными путями, а также в способности использовать внешнюю среду в процессах циркуляции и резервации. *Случайные паразиты* — эту группу составляют возбудители типичных сапронозов, для которых внешняя среда (почва, вода, растительные и другие органические субстраты) служит нормальной и наиболее обычной средой обитания. Особенность случайных паразитов состоит в обязательности внешней среды как их основной среды в той же мере, в какой для облигатных и факультативных паразитов обязательен организм хозяина.

Патогенность микроорганизмов без критерия времени. Прежде чем перейти к установлению связей между типами паразитов и их патогенностью, вернемся к понятию «патогенность», но опустив фактор времени из его толкования. Такой подход вполне оправдан, если учитывать то обстоятельство, что микроорганизмы не знают смерти как разделения пространства и времени [Вернадский В.И. 1965].

Размножаясь делением (бактерии), либо реплицируясь с использованием «ферментативного аппарата» клеток хозяина (вирусы), паразитические микроорганизмы фактически являются бессмертными. Поэтому, смерть, как фактор биологической эволюции, значима только для их жертв. А сами они существуют в нашем понимании вне времени. Отсюда следует, что тот критерий патогенности возбудителя инфекционной болезни, в котором учитывается «фактор времени», лишь отражает нашу потребность в определенном комфорте при исследовании события. Давайте проверим этот тезис. Если мы определим патогенность (вирулентность) через временной интервал — от момента инфицирования паразитом хозяина, до момента гибели хозяина, то убедимся в чрезвычайной патогенности возбудителя натуральной оспы (гибель людей наступит в течение 2–3 нед.) и непатогенности ВИЧ. Однако если эту патогенность будем определять

по «конечному результату», то окажется, что среди инфицированных вирусом натуральной оспы погибло только 30% и эпидемия давно закончилась, а среди первично инфицированных ВИЧ — погибли все, а эпидемический процесс продолжается, приводя к инфицированию и гибели все большего числа людей, т.е. ВИЧ достиг предела патогенности, возможной для паразита — 100% смертности своих жертв при сохранении способности к смене хозяев. Вирус натуральной оспы, в сравнении с ним, даже безобиден. По нашему восприятию времени полная гибель инфицированных займет 10 лет, однако для ВИЧ ни этот период, ни даже миллион лет, не означают ничего. Поэтому та патогенность (вирулентность), которая характеризуется быстрым инкубационным периодом и непродолжительной болезнью, завершающейся смертью, это только проявление определенной (условно назовем ее *первой*) стратегии паразитизма, где продолжительность инфекционного процесса лимитируется иммунной системой хозяина (вернее, эволюционно сложившейся для данного биологического вида нормой иммунного ответа). Отсюда можно прийти к выводу и о существовании стратегий паразитизма, при которых продолжительность болезни хозяина будет ограничена продолжительностью его жизни (*вторая стратегия*), и, даже, продолжительностью жизни его как вида (*третья стратегия*). Однако о последних двух стратегиях мы поговорим позже.

2. Патогенность облигатных паразитов (возбудители кори, коклюша, гриппа, желтой лихорадки, чумы, натуральной оспы, лихорадки Денге, Ку-лихорадки и др.). Патогенность таких паразитов является исключительно вынужденной и существует через необходимость сохранения хозяина живым для последующего переноса к новым хозяевам. В зависимости от способа переноса (основные — трансмиссивный и воздушно-капельный), плотности и чувствительности инфицируемой популяции, вирулентность возбудителя новой болезни может значительно колебаться, однако в его распространении всегда можно отследить эпидемическую цепочку. Клиническая картина болезни может носить характер давно сформировавшейся инфекционной патологии, т.е., иметь четкий клинико-патогенетический синдром и эпидемиологию. Наиболее опасно появление в человеческих популяциях новых возбудителей данного типа, использующих трансмиссию с помощью какого либо переносчика, который уменьшает зависимость паразитического микроорганизма от живого хозяина. Более того, он будет поддерживать отбор высоковирулентных штаммов из-за большой вероятности захвата им возбудителя с кровью больных с тяжелыми формами инфекции. Однако процесс формирования таких форм симбиоза хозяина и паразита носит характер коэволюции. Поэтому в инфицированных популяциях новый возбудитель никогда не достигает максимума своей вирулентности, в чем можно убедиться опытным путем, уменьшая его LD₅₀ последовательными пассажами через хозяев. Эффект пассажей делает паразитическую трансмиссию независимой от выживания самого хозяина. Посредством этого ему «дозволяется» большая вирулентность без компромисса, необходимого для его способности передаваться другим хозяевам [Levin B., 1996].

Таким образом, вышеуказанные противоречия «теории коэволюции», созданы теми «коэволюционистами», которые понимают взаимную адаптацию макро- и микроорганизмов, как процесс, ведущий к утрате микроорганизмом паразитических свойств и к превращению его в свою противоположность — комменсал. О.В. Бухарин и Б.Я. Усвятцов (1996), опираясь на предложенный В. Беляковым и соавт. (1987) «принцип саморегуляции паразитарных систем», «развили» эволюционное учение «правилом», в соответствии с которым «эволюция не дает существенных преимуществ ни одному из

взаимодействующих видов — она направлена на достижение динамического противоречивого равновесия». Т.е. эволюции как естественного отбора наиболее приспособленных видов, не существует. А эволюция симбиотических систем представлена ими в виде последовательности событий — «комменсализм-паразитизм-амменсализм-комменсализм» и т.д., напоминающей ламарковское упражнение органов. О.В. Бухарин и Б.Я. Усвятцов (1996), так же как и N. Ampel (1991), принимают частный случай снижения вирулентности микроорганизмом в конце эпидемического процесса за общую закономерность — утрату им паразитических свойств в ходе «эволюции симбиотических систем».

Возможна ли вообще утрата паразитических свойств облигатным организмом, как настаивают указанные выше авторы? Чтобы ответить на этот вопрос, посмотрим, какую цену платят другие биологические виды за переход к паразитическому существованию. Например, внутренние паразиты теряют органы чувств, затем у них до предела упрощается нервная система, и, как у ленточных червей, исчезает пищеварительная — она им больше не нужна. Т.е., отбор перестает следить за формированием структуры, и этого достаточно. Остальное делает *второе начало термодинамики*. Те структуры, которые поддерживает отбор, сохраняются и развиваются, например, органы прикрепления к стенке кишечника [Медников Б.М., 1982]. Эта закономерность носит общебиологический характер. Поэтому она справедлива и для микроорганизмов. Таким образом, переход к облигатному паразитизму всегда сопровождается упрощением организма. Организм не может «скачком» вернуть те утраченные структуры, которые бы позволили ему вновь вернуться в прежнюю среду обитания, перейти к другим формам симбиоза, либо изменить стратегию паразитизма. Для этого ему нужно стать другим видом. А так как это менее вероятно, то при смене условий окружающей среды происходит либо его замещение другим паразитом, либо формирование других форм симбиоза, которые могут не включать паразитические микроорганизмы. Следовательно, патогенность облигатных паразитов является адаптивным признаком, а их поддержание в популяциях отдельных видов может достигаться за счет других механизмов (гетерогенность популяции паразита по вирулентности, использование им переносчиков, сохранение в резервуарах и т.п.). Даже сильное отрицательное давление против высокопатогенных паразитов, вызванное небольшой численностью хозяина, либо ограниченным диапазоном паразитизма возбудителя, ведет не к становлению его как комменсала, а к его вытеснению из популяции хозяина новым микроорганизмом с другой стратегией паразитизма (второго и/или третьего типа). Поэтому теории коэволюции не противоречит ни длительная ассоциация патогенных видов микроорганизмов с их хозяевами, ни поддержание патогенности естественным отбором, но только тогда, когда речь идет об облигатных паразитах и исключается придуманная некоторыми исследователями возможность их перехода к другим формам симбиоза.

3. Патогенность факультативных паразитов (возбудители полиомиелита, холеры, гепатита А, ботулизма, бактериальных менингитов и др.). Для возбудителей инфекционных болезней, являющихся факультативными паразитами, характерны фекально-оральный и воздушно-капельный пути передачи, высокая степень носительства и лишь эпизодическое проявление их в форме тяжелых инфекций. Так, на одного больного менингитом приходится 180 бактерионосителей [Покровский и др., 1976]. По данным В.В. Алексеенко (1991) соотношение больных холерой и вибрионосителей колеблется в разных регионах от 1:1 до 1:100. Проникновение вируса полиомиелита через

гематоэнцефалический барьер происходит не чаще чем в 1% случаев от числа инфицированных [Болотовский В.М., 1993]. Колонизация факультативными паразитами слизистых поверхностей макроорганизма (кишечник, носоглотка) осуществляется в условиях противодействия со стороны микробов-антагонистов, местных барьерных факторов и др. Поэтому создаются условия для природной селекции высоковирулентных штаммов в виде локального феномена. Это позволяет паразитическому микроорганизму:

- 1) избежать ингибирования своего размножения механизмами защиты хозяина;
- 2) пролиферировать в этом хозяине;
- 3) проникать и размножаться в органах, тканях и клетках, в которых он будет меньше конкурировать с другими представителями своего вида и иметь преимущества в данном хозяине [Levin B., 1996].

Экспрессия факторов, ответственных за локальные преимущества микроорганизма, не направлена на его трансмиссию к другим хозяевам. У «новых» возбудителей данного типа вероятно обнаружение генов известных, т.е., «старых» факторов патогенности (например, термолабильных и термостабильных энтеротоксинов). Как мы уже указывали выше, для менингококка проникновение в ликвор и для полиовируса проникновение в клетки ЦНС, является началом их конца. Однако степень факультативности у микроорганизмов различна. Поэтому при некоторых инфекциях, например, кишечных, обсемененность окружающей среды данным возбудителем может возрасти, что, при наличии фекально-орального механизма передачи, приведет к распространению паразитического микроорганизма по эпидемической цепочке. Но патогенность возбудителя холеры не имеет такого решающего значения для его распространения в природе, как для облигатного, например, малярии. В большинстве случаев, «внезапно» появившаяся вирулентность сокращает популяцию носителя и снижает скорость передачи возбудителя. Для других условий, факторы, создавшие локальные преимущества микроорганизму, значения не имеют. Они не придают микроорганизмам большей способности выживать в окружающей среде, не повышают вероятность выживания их популяций в будущем. Это «недальновидная эволюция» вирулентности микроорганизма [Levin B., Bull J., 1994].

4. Патогенность случайных паразитов (возбудители сибирской язвы, легионеллеза, мелиоидоза, псевдотуберкулеза и др.). Применительно к организму теплокровных патогенность их случайных паразитов не может ни поддерживаться посредством природной селекции, ни представлять собой результат «недальновидной» эволюции. Эпизодичность паразитической фазы их существования в теплокровных организмах исключает иной путь развития инфекционной болезни, кроме как случайного проявления ответа макроорганизма на экспрессируемые микроорганизмом вещества — так называемые факторы вирулентности, обычно имеющие другие функции. Клинические проявления таких новых инфекций могут не носить специфической картины (как мелиоидоз) и зависеть от пути проникновения возбудителя (как сибирская язва). Так как жизнь или смерть случайно инфицированного теплокровного организма ничего не значат для поддержания такого паразита в природе, то его вирулентность не лимитируется необходимостью сохранения жизни своим жертвам. Болезнь может протекать в септической форме и сопровождаться высокой смертностью (сибирская язва, мелиоидоз). Массовые инфекции носят характер вспышек (болезнь легионеров, псевдотуберкулез) и редко напоминают классический эпидемический процесс, т.е. передачу возбудителя по цепочке от одного заболевшего к другому. Возбудитель сибирской язвы является

исключением — инфицирование крупного рогатого скота происходит через траву, а затем, при употреблении недостаточно термически обработанного мяса, инфицируются люди. Но для сохранения возбудителя в природе эти жертвы никакого значения не имеют.

5.Смена типа (степени) паразитизма. Среди возбудителей инфекций мы нигде не видим «идеальных убийц». Так или иначе, возможности их поддержания в окружающей среде и проникновения в организм теплокровных, ограничены. Ареалы возбудителей малярии, лихорадки Денге и желтой лихорадки лимитированы ареалами их переносчиков, те, в свою очередь, климатическими и ландшафтными условиями. Возбудитель мелиоидоза может существовать только в определенном типе почв. Возбудитель сибирской язвы для того, чтобы проникнуть в организм животного, должен быть сначала захвачен корневой системой травянистых растений. ВИЧ не сохраняется в окружающей среде и не передается воздушно-капельным путем как вирус гриппа. Тот же, в свою очередь, не способен передаваться половым путем и т.д. Признавая роль Творца в создании паразитических организмов, нам бы пришлось признать и то, что в каждом конкретном случае им не все было продумано. Признавая роль естественного отбора (как выразился писатель Азек Азимов — «демона Дарвина»), нам также придется считаться с тем, что и он не во всех случаях работает безотказно.

Посмотрим, что должно произойти с облигатным паразитом, прежде чем тот станет «случайным» и после гибели своего хозяина обретет «спокойное существование» где-то в почве.

Облигатные паразиты утрачивают ненужные им гены, т.е. те, которые обеспечивают выживание в другой среде обитания. Значит, для смены типа паразитизма такие гены должны вновь возникнуть. Для этого в распоряжении «демона Дарвина» есть мутации. Вероятность мутации в гене 10^{-5} . Однако гарантии того, что эта мутация не создаст бессмысленную последовательность, нет. Бессмысленную мутацию отбор не пропустит. Предположим, что для создания нужного структурного гена в исходном гене должны возникнуть две мутации, тогда их вероятность уже 10^{-10} . Такие ничтожные вероятности не столь часто реализуются, чтобы провести бессмысленную последовательность на следующий этап естественного отбора. Придется оставлять старую [Медников Б.М., 1982].

Для бактерий «демон Дарвина» может использовать генетический перенос. Однако плазмиды и фаги случайных и даже факультативных паразитов находятся в другой среде обитания. Красивые опыты по межвидовому переносу генов между бактериями, выполненные в условиях *in vitro*, очень трудно экстраполировать на каждый конкретный эпизод биологической эволюции в природных условиях. Например, конъюгацию, легко получаемую в лабораторных условиях на фильтрах, видимо, можно осуществить и в кишечнике теплокровного животного. Но если мы возьмем конкретные микроорганизмы, например, облигатный паразит — возбудитель чумы и факультативный — возбудитель дизентерии, то убедимся, что встреча их в одном организме, даже при развитии двух инфекций сразу, маловероятна. А если она случайно произойдет в другой среде обитания, например, в каких-нибудь почвенных амебах? Много ли получит с этого «демон Дарвина»? Скорее всего, что немного. Плазмиды, как правило, несут только дополнительные к основным гены, позволяющие микроорганизму выдерживать конкуренцию с другими членами среды его обитания (гены токсинов, антибиотиков и т.п.). Но они не могут определить тип паразитизма.

Тогда как же совместить успехи, достигнутые эволюцией в создании отдельных патогенных видов и явное бессилие эволюции, когда рассматривается возможность большей адаптации этих видов к изменившейся среде обитания, за счет смены типа (степени) паразитизма?

Парадоксальное бессилие «демона Дарвина» генетик С. Райт представил в виде очень наглядной картины. Вообразим разные степени приспособленности к внешним условиям в виде холмистого ландшафта («ландшафта приспособленности»), где высота холма (адаптивного пика) соответствует степени его приспособления (в рассматриваемом нами случае — это вирулентность и тип паразитизма). Популяция, поднявшаяся на маленький пик, не может сменить его на большой, стать более приспособленной, ибо при смене пиков отбор пойдет против уровня приспособленности. Как кошка во время наводнения, спасаясь на низком заборе, может утонуть, хотя рядом был высокий дом, так и паразитический вид вынужден приспосабливаться к меняющейся среде обитания в рамках той способности к паразитизму, которая была закреплена за ним естественным отбором. Поэтому, все надежды на смену каким-то возбудителем типа паразитизма, как и на его переход к комменсализму, иллюзия. Также трудно судить, какой из пиков выше. А вот какой опасней для нас, как биологического вида — это, несомненно, облигатный паразитизм. Именно в его рамках может измениться стратегия паразитизма, «новый» паразитический микроорганизм внезапно достигнет вершины адаптивного пика, а кошка запрыгнет на крышу дома.

6. Вторая стратегия паразитизма. Постоянное наращивание возможностей человеческого общества по активному воздействию на распространение и размножение патогенных микроорганизмов привело к изменению характера пандемий. Массовая иммунизация и антибиотикотерапия, возможность распознавать возбудителя инфекционной болезни, проводить карантинные мероприятия, дезинфекцию, Дератизацию резко снизили риск проникновения в человеческую популяцию паразитических видов микроорганизмов, вызывающих непродолжительную болезнь с коротким инкубационным периодом и интенсивным размножением возбудителя. Появились пути передачи, которые раньше были невозможными (гемотрансфузии, внутривенные инъекции, трансплантации). Тем самым была открыта Дорога облигатным паразитическим микроорганизмам, способным распространяться при невысокой плотности населения и низкой интенсивности передачи. Проникновение в человеческое общество новых возбудителей, использующих вторую стратегию паразитизма, возможно как из родственных природных резервуаров, в которых по каким-то причинам они были законсервированы, так и из латентных очагов в человеческих популяциях, видимо, представляющих собой один общий резервуар. Вызываемая ими инфекция носит медленный характер, возбудитель стремится быть не узнанным иммунной системой и сохранить себя в человеческих популяциях, интегрируясь с геномом человека (ретровирусы, герпесвирусы, вирус гепатита В, аденоассоциируемые вирусы и др.) либо как микоплазменное образование. Продолжительность таких инфекционных процессов не лимитируется иммунной системой хозяина. В механизме передачи преобладает половой путь, который одновременно необходим для сохранения вида-хозяина и не может быть разорван. Эпидемическая цепочка ограничивается лишь количеством человеческих особей в популяции, поэтому распространение некоторых паразитических микроорганизмов приобрело характер пандемии (ВИЧ, вирус гепатита В, некоторые виды вирусов герпеса и микоплазм). Возбудитель не накапливается в больших количествах. Например,

концентрация ВИЧ в периферической крови редко превышает 10^4 частиц в 1 мл^3 [Медников Б.М., 1990]. Используя первую стратегию паразитизма возбудитель сибирской язвы накапливается на терминальной стадии болезни до 10^9 колониообразующих единиц в 1 мл^3 крови [Fritz D. et al., 1995].

Возбудители, использующие вторую стратегию паразитизма, вызывают либо пролиферативные болезни, например, лейкемии (HTLV-1 и HTLV-2), либо как ВИЧ, не вызывают конкретную болезнь, делая организм беззащитным перед лицом какой угодно болезни [Лем С, 1989], либо имитируют соматические болезни — атеросклероз, нарушения психики и др. (герпесвирусы, микоплазмы). Продолжительный латентный период этих болезней сочетается с максимальной вирулентностью их возбудителей, определяемой без учета временного критерия. Длительность болезни может быть сопоставима с продолжительностью жизни человека, но не равна ей, так как для сохранения и передачи микроорганизма, жизнь хозяина при данной стратегии паразитизма, значения не имеет. Уже сейчас можно сказать, что вызываемая такими микроорганизмами патология, замедлила рост средней продолжительности жизни человечества, начавшийся в начале XX столетия, а все надежды победить ВИЧ с помощью современных технологий, провалились.

7.Третья стратегия паразитизма. Об этой стратегии можно пока высказать только гипотезу. В отсутствие селективного давления происходит полиморфизация популяции ВИЧ и ВИЧ-подобных вирусов, проникновение других аналогичных и подобных видов, что ведет к конкуренции между ними, их отдельными подтипами, эндогенными ретровирусами и другими мобильными элементами генома человека. По данным J. Lederberg (1997), с геномом человека способны интегрироваться от 400 до 500 ретровирусов. Этот процесс сложен и не изучен. Само появление живых систем обязано ретроэлементам, которые сыграли важную роль в формировании геномов позвоночных и составляют значительную часть генома человека. Ретротранспозиция ретроэлементов считается главным регулятором темпа эволюции самых различных организмов, включая видообразование новых ретровирусов. Эндогенные ретроэлементы могут играть роль «защитных экранов», препятствующих специфической интеграции ретровирусов в геном высших животных. Конкуренция между эндогенными и экзогенными ретроэлементами происходит в рамках генома хозяина и ее конечной задачей является усиление влияния на него. Поэтому можно предположить, что дальнейшее развитие пандемии СПИДа приведет к появлению новой инфекционной патологии, связанной с избирательным поражением жизненно важных участков генома человека. Распространение же такого возбудителя будет предполагать как половой, так и наследственный механизмы. Инкубационный период значительно превысит таковой для ВИЧ. Болезнь проявит себя разнообразной соматической и наследственной патологией, не принимаемой за инфекционную. Длительность эпидемического процесса — несколько столетий. Растянутость этого процесса во времени не имеет значения за пределами человеческих ощущений. Его результатом могут быть необратимая депопуляция, либо даже запуск механизма случайного (т.е., не обусловленного резким ухудшением внешних условий) уничтожения вида, действующего на генетическом уровне.

1.3. Лекция №3 (2 часа).

Тема «Персистенция бактериальных патогенов, как результат симбиотических отношений»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Паразитизм как образ жизни симбионтов. Позитивные и негативные стороны паразитизма
2. Биолого-экологическая природа паразитизма

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Паразитизм как образ жизни симбионтов. Позитивные и негативные стороны паразитизма

Выживание бактерий, находящихся в той или иной экологической нише, представленной другим биообъектом, основано на симбиотических взаимоотношениях между видами. Именно симбиотические отношения с различной степенью пользы, получаемой партнерами от симбиоза, определяют некоторые характерные особенности паразитизма и адаптационные возможности симбионтов в системе паразит-хозяин.

Биологическая целесообразность убеждает в том, что, используя хозяина как эконишу и питательный субстрат, паразиту выгоднее как можно дольше находиться в ней (без манифестных проявлений болезни). В этом случае речь идет о «сбалансированной патогенности». К сожалению, не совсем ясно, что это состояние отражает - селекцию ли резистентных особей в популяции хозяина или эволюционно закрепившуюся норму, в которой «несбалансированная патогенность» — следствие перехода патогена к новому хозяину.

Следует рассматривать паразитизм как образ жизни симбионтов. Паразитизм — это безусловный успех эволюции, но при оценке его как явления выявляются плюсы и минусы. К наиболее очевидным преимуществам паразитизма следует отнести метаболические и репродуктивные. Паразитирующий микроорганизм получает от хозяина ряд метаболитов без значительных энергетических затрат со своей стороны. И поскольку патоген располагает собственными клеточными механизмами и мультиферментными системами для метаболической активности, то он лишь относительно зависит от хозяина. Большинство бактериальных патогенов испытывают относительную пищевую зависимость от хозяина, так как получают субстрат (протеины, полисахариды) путем переваривания его благодаря своим ферментам в виде низкомолекулярных продуктов (аминокислоты, моносахара).

Свои потребности в кислороде при дыхании внутриклеточно паразитирующие микроорганизмы удовлетворяют, перейдя на анаэробный тип дыхания, то есть факультативно либо даже облигатно. Что касается репродуктивного процесса, то все усилия паразита сконцентрированы на нем, так как патоген избавлен от многих энерготрат благодаря своему хозяину. Однако развитие и репродукция паразитирующих бактерий осуществляется под контролем хозяина, поскольку патоген утратил способность к репродукции *in vivo*. Не исключено, что индуктором такой регуляции и запуска процесса репродукции возбудителя являются молекулярные сигналы хозяина, обеспечивающие «узнавание», адгезию, инвазию и, наконец, собственно репродуктивный цикл паразита.

К негативным моментам паразитизма как явления следует отнести очевидную

зависимость развития патогена от хозяина, понятно, что при отсутствии подходящего хозяина патоген может просто не выжить или вынужден перейти во внешнюю среду, находясь там некоторое время до нахождения соответствующей экониши. Вероятно, этим можно объяснить, *почему* многие бактериальные виды являются условно патогенными микроорганизмами, или факультативно паразитирующими организмами, способными выживать (персистировать) как в организме хозяина, так и вне его.

Развитие паразитизма как образа жизни, по-видимому, имело место на ранней стадии эволюции, где оказалась велика роль случайного контакта. Теория случайного паразитизма нашла свое отражение в отечественных публикациях. Эволюция внутриклеточной жизни способствовала тому, что посредством случайных контактов был осуществлен отбор микроорганизмов, способных к адаптации в условиях эукариотической клетки. Вероятно, следует признать бесспорным успехом эволюции внутриклеточного существования симбионтов их биологическую интеграцию.

В качестве примера можно указать на эволюцию митохондрий эукариотической клетки, которые рассматриваются как продукты симбиотически ассоциированных гетеротрофных пурпурных бактерий.

Рассматривая паразитизм как образ жизни, следует отметить высокую динамичность жизненных устремлений симбионтов (микроба и хозяина), *что* проявляется адаптацией патогена к реакциям хозяина. В отличие от обычной окружающей среды (почва, вода, воздух, гниющие субстраты) хозяин для паразита — это высокоспециализированная среда обитания, которая активно реагирует на инфекцию (патоген). В свою очередь, хозяева находятся под постоянным давлением со стороны паразита, который является главным фактором селекции их устойчивости.

С точки зрения эволюции, любая инфекция предъявляет свою собственную цену хозяину, беря одни и отвергая другие его ресурсы. Паразитирующие организмы сталкиваются не только с проблемами выживания в окружающей внешней среде, но и проблемами выживания в адаптивно меняющейся среде хозяина, где они паразитируют и хозяин контролирует инфекцию. Это ответные реакции в виде воспаления, фагоцитоза, антительного ответа хозяина и есть те препятствия для патогена, который для выживания в клетке должен совершенствовать свои тактические приемы, уклоняясь или преодолевая эти барьеры.

Паразитирующие патогены научились справляться с ответной (защитной) реакцией хозяина.

Примененный структурно-функциональный подход к расшифровке механизмов персистирования бактерий показал, что наиболее уязвимой мишенью у патогена для защитных сил хозяина является пептидогликан.

Результаты исследований по биологической функции бактериального пептидогликана в условиях симбиоза патогена с хозяином позволяют считать, что этот биополимер является мощным раздражителем иммунной системы организма. Выявленные антигенные детерминанты пептидогликана объясняют, почему он оказался структурой с выраженной иммунологической активностью, далеко превосходящей другие структурные компоненты бактериальной клетки.

Тезис о бактериальном пептидогликане как иммунологической мишени может быть подкреплён и его чувствительностью ко многим факторам защиты хозяина, в отношении которых другие компоненты бактериальной клетки обнаруживают высокую резистентность. Известно, что сапрофитические виды грампозитивных микроорганизмов с

поверхностно расположенным (неэкранированным) пептидогликаном высокочувствительны к лизоциму, тогда как грамотрицательные клетки с экранированным пептидогликаном (при помощи липополисахаридного покрытия) оказываются устойчивы к литическому действию лизоцима. Вероятно, это же объяснение лежит в основе известного факта о преимущественном внутриклеточном паразитировании грамотрицательных патогенов (с прикрытым пептидогликаном) в отличие от грампозитивных микроорганизмов (с открытым пептидогликаном). Пептидогликановый полимер бактерий остается чувствителен и уязвим для факторов иммунологической защиты организма, что делает возможным длительную персистенцию в организме хозяина лишь для группы грамотрицательных микроорганизмов (с прикрытым пептидогликаном) и некоторых представителей грамположительной флоры.

Таким образом, если признать, бактериальный пептидогликан является важнейшей иммунологической мишенью для организма хозяина, то станет понятна его ключевая роль с точки зрения понимания центрального вопроса инфекционной иммунологии — распознавание «своего» и «чужого», а следовательно, и участия в феномене микробной персистенции. Вот почему любые адаптационные процессы бактериальной клетки, направленные на защиту (или изоляцию) пептидогликановой структуры клеточной стенки, следует рассматривать в качестве механизмов персистенции бактерий. С целью выживания в организме бактериальная клетка стремится защитить либо сбросить свой пептидогликан, используя для этого ряд приемов: «маскировку» (механическая защита и антигенная мимикрия), «потерю» (образование L-форм), а также «атаку» (секреция факторов иммуносупрессии).

Естественно, в зависимости от вида патогена, механизмы его персистирования различны. Однако подавляющее большинство бактериальных патогенов продуцируют секретлируемые факторы деградации защиты хозяина либо уклоняются от нее, обеспечивая себе персистирование в организме. факторов (антилизозимная, антикомплементарная, «антиинтерфероновая», анти-иммуноглобулиновая и др. активности) бактерий с источником выделения (экзотоксины), что позволило рассматривать их в качестве экологических маркеров микроорганизмов.

Взаимоотношения паразита и хозяина не статичны, а, напротив, динамичны. И если паразитирующий микроорганизм заставляет хозяина адаптироваться к его изменениям, то это не исключает и факта, что хозяин благодаря функции своих защитных систем осуществляет адаптацию к паразиту, ставя перед ним новые проблемы выживания. И в этом нет ничего удивительного, это лишь иллюстрация закона параллельной эволюции хозяина и паразита.

Биологический смысл взаимоотношений хозяина и паразита определяет динамику этого конфликта между симбионтами, где заболевание хозяина лишь один из возможных результатов.

2. Биолого-экологическая природа паразитизма. Учитывая важное селективное значение факторов уклонения паразита от защитной системы хозяина, совершенно очевидно, что факторы патогенности паразита предназначены, прежде всего, не для поражения хозяина, а для сопряженной эволюции, взаимной адаптации и, следовательно, персистенции патогена. Например, резистентность пневмококков к фагоцитозу за счет «экранирования» пептидогликана (капсулообразование) — это свойство как результат селекции сформировалось не для того, чтобы вызвать летальный исход, а для того, чтобы патогену надолго обосноваться в слизистой оболочке респираторного тракта

организма.

В результате длительного пути совместной эволюции (коадаптации) многие паразитарные системы выработали «эволюционную мудрость», суть которой заключается в сохранении популяции хозяина ради сохранения популяции паразита. С одной стороны, под действием возбудителя в организме хозяина развивается и иммунитет, и иммунологическая толерантность; с другой, факторы иммунитета целью его уклонения от защитных механизмов хозяина.

Таким образом, закладывается основа саморегуляции, подтверждающей общее правило, что эволюция не дает существенных селективных преимуществ ни одному из взаимодействующих видов, она направлена на достижение динамического противоречивого равновесия.

Принцип саморегуляции с использованием обратных связей универсален для всех паразитарных систем и включает 4 основных условия:

- гено- и фенотипическая гетерогенность популяций паразита и хозяина;
- динамическая изменчивость взаимодействующих популяций;
- фазность развития паразитарных систем;
- регулирующая роль окружающей среды.

Варьирующими признаками паразита являются, как правило, антигенность, а у хозяина — иммунокомпетентность.

В популяции паразита генетически закреплена способность заранее «предвидеть» и включать регуляторные системы изменчивости и адаптации на последовательных стадиях развития. Это общебиологический принцип опережающего отражения. За эти процессы ответственны такие молекулярные структуры как SOS-система, многокопийные плазмиды, способные регулировать развитие бактериальной популяции. В жизненном цикле паразитов обязательна реализация двух фаз: фазы пребывания в организме хозяина и фазы смены хозяина. Без второй фазы невозможно существование паразита как биологического вида, поскольку жизнь индивидуального хозяина всегда ограничена. Смена хозяина может происходить при участии других видов организмов, а также тех или иных абиотических факторов внешней среды. Во внешней среде проявляется фаза сапрофитизма. Следовательно, экология паразита — это не только его взаимодействие с хозяином, но и выживание во внешней среде.

Экологический аспект паразитизма включает изучение особенностей распространения паразита как среди популяции хозяина, так и внутри организма (места локализации); оценку динамики роста популяций паразита и хозяина, а также исследования регулирующего действия факторов внешней среды. Если диапазон паразитизма возбудителя (степень полигостальности) ограничен одним или небольшим числом сходных видов, то происходит сильное отрицательное селективное давление против высокопатогенных видов, так как значительная гибель хозяина определяет малую вероятность перехода микроорганизма от мертвого к живому хозяину. Выживают только те патогены, которые либо имеют другую экологическую нишу, либо способны выжить в окружающей среде, либо попасть к другому хозяину в качестве комменсала или слабого патогена. Следовательно, паразит должен строить свой «баланс вирулентности» так, чтобы обеспечить в организме хозяина достаточную плотность популяции с целью максимальной трансмиссии от одного хозяина к другому. В случае, когда патоген сталкивается с хозяином, у которого защита ниже среднего уровня, то развивается болезнь и «шансы» возбудителя найти нового хозяина резко падают. Известно, что менингококки

обычно обитают в носоглотке взрослых молодых лиц (бактерионосительство), но редко встречаются у детей до 4 лет. Однако именно в этом возрасте наиболее часто развивается генерализованная форма менингококковой инфекции с высокой летальностью.

Разные виды паразитизма (внеклеточный и внутриклеточный; факультативный, облигатный и случайный) связаны не только с иммунодепрессивными свойствами паразита, но и с особенностью его метаболизма и пищевыми потребностями.

Сорбируя из среды роста различные химические элементы, в частности, железо или медь, бактерии приобретают способность лучше противостоять неблагоприятным факторам, а также получают определенные преимущества в конкурентной борьбе. В результате образования супероксидных радикалов и перекисей с участием сорбированных на клеточной стенке тяжелых металлов осуществляется защита патогенов как от иммунной системы хозяина, так и от неблагоприятных факторов среды. Особое место в системе паразит-хозяин занимает патогенный (вирулентный) потенциал паразита. Однако, к сожалению, именно патогенность бактерий, а, следовательно, и их способность к персистенции недостаточно исследованы. По мнению Н. Smith, наряду с такими достаточно полно исследованными разделами патогенности как адгезия к эпителиальным клеткам, действие неспецифического гуморального и клеточного звеньев иммунитета, продукция токсинов и др. имеются недостаточно изученны. Применительно к обсуждаемой проблеме персистенции микроорганизмов — это антагонистические отношения симбионтов, распространение (инвазия) патогена вглубь тканей и иммунные механизмы длительного персистирования. Не исключено, что названные разделы оказались пока нерешенными не в силу каких-либо технических трудностей, а из-за недостаточного внимания к этим проблемам со стороны микробиологов, занимающихся изучением физиологии бактерий.

К сожалению, до сих пор не ясно, каковы взаимоотношения факторов патогенности и персистенции бактерий в условиях инфекционного процесса с различными его исходами. Как идет перестройка популяционной структуры патогена по вирулентности и персистенции в условиях колонизации хозяина при разных типах инфекции?

Можно сослаться на единичные работы по исследованию динамики факторов вирулентности, персистенции и метаболизма микроорганизмов на модели персистирующей экспериментальной инфекции, в которых показано, что динамика экспрессии факторов патогенности в структуре популяции стафилококков оказалась связанной с динамикой антилизотической активности штамма в ходе инфекционного процесса. При остром, затухающем типе инфекционного процесса происходила селекция клонов с низкой антилизотической активностью и элиминация клонов с факторами патогенности. При персистирующем типе инфекции имела место селекция высокоантилизотически активных клонов, экспрессирующих факторы патогенности.

Выявленное закономерное снижение в популяции золотистых стафилококков количества патогенных особей при инфекции, но с нарастанием количества персистентных вариантов, вероятно, имеет определенный биологический смысл: патогену лучше не «губить» своего хозяина, т.к. он лишится экологической ниши. Гораздо выгоднее создать себе устойчивое равновесие с организмом, обеспечить персистирование, снизив свою вирулентность.

Многие виды бактерий способны паразитировать внутриклеточно, проявляя тропность к различным клеткам хозяина, что обусловлено особенностями экологии паразита. Паразитизм бактерий внутри клетки рассматривается как факультативный, в

отличие от облигатного внутриклеточного паразитизма вирусов, риккетсий и хламидий. Так, стрептококки выявляются у больных ревматизмом в лейкоцитах. При этом стрептококки найдены внутри лейкоцитов как в период рецидива, так и ремиссии.

Внутриклеточный паразитизм бактерий смоделирован в опытах *in vitro* на культуре клеток. Было изучено явление внутриклеточного паразитирования нейссерий на культуре клеток амниотического эпителия человека. Это паразитирование бактерий внутри эпителиальных клеток рассматривалось как «непрофессиональный фагоцитоз». Для изучения внутриклеточного паразитирования менингококков была применена органная культура из носоглоточной ткани человека, а для культивирования шигелл — клетки эпителия слизистой оболочки кишечника человека [34].

Способность патогенов паразитировать внутри клеток организма, представленных как микро- и макрофагами, так и непрофессиональными фагоцитами, обеспечивается целым комплексом разнообразных механизмов.

Микроорганизмам, паразитирующим в фагоцитах (макрофагах, микрофагах), для того, чтобы попасть в нужную клетку, достаточно лишь не препятствовать фагоцитозу. Микроорганизмы, паразитирующие в клетках, не способных к фагоцитозу (эпителиальные клетки, фибробласты и т.д.), проявляют определенную активность с целью пенетрации в такие клетки. Известно, что под действием шигелл наружная мембрана энтероцитов, вдавливаясь в цитоплазму, образует содержащую паразитов вакуоль, которая затем «отшнуровывается». Шигеллы быстро разрушают стенку вакуоли и размножаются в цитоплазме.

Инвазия патогена в эпителиальную клетку достаточно изучена. Этот процесс, по мнению В.Г.Петровской и соавт., зависит от активности как клетки-хозяина, так и возбудителя. По данным Н.М. Овчинникова с соавт., сами эпителиальные клетки втягивают гонококки внутрь с помощью псевдоподий.

К факторам инвазии, с помощью которых микроорганизмы осуществляют функцию проникновения, относят нейраминидазу и гиалуронидазу.

Нейраминидаза (сиалидаза) — фермент, избирательно отщепляющий от различных гликопротеинов, гликолипидов и олигосахаридов сиаловые кислоты. Так как субстрат действия нейраминидазы входит в состав оболочек многих соматических клеток, то под действием этого фермента микробной инвазии повреждаются мембраны клеток. Нейраминидазу продуцируют многие виды патогенных бактерий, а не только вирусы.

В результате воздействия нейраминидазы на субстрат освобождается продукт реакции — сиаловая кислота. Свободные сиаловые кислоты обнаружены в секрете слизистой носа у резидентных стафилококковых носителей и не обнаружены у транзиторных. Это объясняет, почему от резидентных бактерионосителей чаще выделяли золотистые стафилококки с высоким уровнем нейраминидазной активности.

Субстратом для гиалуронидазы в организме хозяина служит гиалуроновая кислота, которая входит в состав соединительной ткани и многих других тканей, а также клеток. Разрушение гиалуроновой кислоты способствует пенетрации паразита в клетку, хотя, прежде всего, гиалуронидаза открывает путь патогену в межклеточное пространство. Продукция гиалуронидазы наиболее характерна для стрептококков, пневмококков, менингококков и клостридий. В очагах менингококковой инфекции частота носительства гиалуронидазо положительных штаммов была в 3 раза выше, чем вне очагов.

Таким образом, оценивая в целом вышеизложенные материалы по системе паразит-хозяин с биологической точки зрения, следует признать эти отношения как бесспорный

успех эволюции, при котором происходит взаимная адаптация и совершенствование системы паразитизма. В широком биологическом смысле налицо выигрыш как популяции хозяина, так и паразита. Выигрыш для паразита — это нахождение нового для себя способа выживания, т.е. сохранение вида. Для хозяина — это естественный отбор через совершенствование собственных механизмов защиты в целях выживания вида.

Но, если с биологических позиций установление равновесной системы паразит-хозяин (бактерионосительство) — эволюционно-прогрессивная форма паразитизма, определяющая развитие и взаимоадаптацию живых систем, то, с точки зрения медицинской, паразитизм — форма симбиоза, несущая гибель части популяции хозяев со всеми вытекающими последствиями.

1.4 Лекция №4 (2 часа).

Тема «Экологическая детерминация персистентных свойств микроорганизмов»

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Персистентные свойства бактериальных патогенов, выделенных из разных источников.
2. Биопрофили патогенных бактерий
3. Прикладные аспекты экологической детерминации персистентных характеристик патогенов

1.4.2 Краткое содержание

1. Персистентные свойства бактериальных патогенов, выделенных из разных источников.

Показано, что штаммы, выделенные от больных либо бактерионосителей, значительно чаще имели персистентный признак и с более выраженной экспрессией в отличие от микроорганизмов, выделенных из других объектов внешней среды.

В работе Б.Я. Усвятцова (1986) показаны различия в АЛА свежевыделенных и музейных штаммов менингококка: среди свежевыделенных культур высокоактивные были обнаружены в 8,8 раза чаще, чем среди музейных штаммов.

В последующем С.Д. Борисов (1988) при изучении АЛА менингококков, выделенных от больных, также выявил 100% распространение данного признака со средним уровнем $10,8 \pm 0,8$ мкг. Менингококки, выделенные из крови и спинномозговой жидкости больных генерализованной формой менингококковой инфекции, обладали широким спектром антилизотической активности и не отличались по количественным характеристикам этого показателя менингококков, выделенных из носоглоточной слизи больных острым назофарингитом.

При обследовании стафилококковых бактерионосителей обнаружено, что от резидентных носителей в 4,5 раза чаще выделялись стафилококки с антилизотической активностью. Основным местом локализации микроорганизмов, инактивирующих лизотим, были клетки эпителия слизистой оболочки переднего отдела носа, из которых активные культуры выделялись в 3,6 раза чаще, чем со слизистой зева.

Изучена связь факторов персистенции (АЛА, АИА) клебсиелл с источником их выделения. Распространенность и выраженность АЛА и АИА клебсиелл, выделенных от больных, бактерионосителей и здоровых лиц имели неоднозначное распределение. Практически 100% штаммов, выделенных от больных, имели АЛА. В группе бактерионосителей лишь 87% клебсиелл обладали АЛА со средним уровнем выраженности. В сравниваемой группе здоровых лиц только 8% клебсиелл обладали АЛА на низком уровне.

У 75% клебсиелл, выделенных от больных, обнаружена АИА со средним уровнем выраженности. В группе бактерионосителей клебсиеллы с АИА были выделены в 60% случаев со средним уровнем активности. У здоровых лиц клебсиеллы с АИА встречались в 7,1% случаев с низким уровнем выраженности признака.

В итоге сделано заключение: частота встречаемости и уровни изученных признаков нарастают в ряду: здоровые – бактерионосители – больные. Активность факторов персистенции свежевыделенных штаммов бактерий более чем в два раза превышала таковую у музейных штаммов.

Изучена динамика АКА микроорганизмов, изолированных из разных экологических ниш. Показана зависимость распространенности и выраженности АКА микроорганизмов от источника выделения. Культуры, выделяемые из объектов внешней среды, имеют наименьший уровень выраженности и распространенности АКА по сравнению с изолятами от бактерионосителей и больных.

Сходная закономерность замечена и у протеев. У штаммов, выделенных из воды, АИА отсутствовала, тогда как у протеев – возбудителей пиелонефрита и диареи – АИА отмечена в 100% случаев.

2. Биопрофили патогенных бактерий.

E. coli – убиквитарный микроорганизм с выраженной гетерогенностью и высоким адаптационным потенциалом. Изучены факторы персистенции (АЛА, АКА, АИА) и другие биологические свойства (адгезия, колициногенность, антибиотикорезистентность) у 254 штаммов кишечной палочки, выделенной из объектов внешней среды, организма здоровых и больных детей.

Проведенные исследования выявили широкое распространение факторов персистенции в природных популяциях эшерихий, своеобразие биопрофилей кишечной палочки, отражающих связь со средой обитания, усиление экспрессии признаков у кишечных палочек в ряду: внешняя среда – здоровый организм – больной организм.

В результате проведенного исследования описан популяционный биопрофиль эшерихий, выделенных из воды, который характеризовался комплексом факторов персистенции, адгезивной способностью и колициногенностью.

Описаны биопрофили эшерихий, выделенных из воды с разной степенью антропогенного воздействия. Биопрофиль эшерихий из водопроводной воды отличался минимальными значениями признаков и отсутствием у бактерий АИА и колициногенности.

Существует мнение, что информативная значимость биоиндикаторных микроорганизмов тем выше, чем больше свойств у них обнаруживается.

Полученные результаты открывают перспективу использования факторов персистенции в качестве информативных критериев оценки индикаторной значимости эшерихий. Выявление этих признаков доступно для любой лаборатории и может быть использовано для повышения эффективности эколого-гигиенических наблюдений.

Исследование факторов персистенции и описанных биологических свойств у эшерихий, выделенных из организма здоровых детей, показало, что абсолютное большинство штаммов (95%) обладало одним или несколькими признаками персистенции при низком уровне их выраженности. В результате проведенного исследования был описан популяционный биофиль Е. coli – представителя нормальной микрофлоры организма, который характеризовался комплексом факторов персистенции, адгезивной способностью, колициногенностью и множественной к пяти и более антибиотикам. Описанные биофиль нормовариантов кишечной палочки, выделенной из кишечника и мочи, четко дифференцировались по уровню выраженности отдельных признаков в биофилье.

3. Прикладные аспекты экологической детерминации персистентных характеристик патогенов.

Разработан способ определения свежего фекального загрязнения воды поверхностных водоемов, где информативные персистентные признаки эшерихий использованы при проведении санитарно-микробиологического анализа воды. Проведенные исследования подтвердили биоиндикационную значимость персистентных свойств кишечной палочки. Однако был выявлен ряд цитратположительных и лактозоотрицательных энтеробактерий, характеризующихся значительным уровнем выраженности персистентных свойств, что послужило дополнительным критерием оценки санитарного состояния водоема.

Определение у выделенных микроорганизмов АЛА, АКА, АИА надежно подтверждало свежесть фекального загрязнения воды.

Совокупность указанных персистентных признаков отражала «организменную природу» энтеробактерий, тогда как для водных микроорганизмов характерны более низкие значения определяемых признаков или их полное отсутствие. Именно это обстоятельство позволило разделить аллохтонную и аутохтонную микрофлору водоема.

Изучение биофильей эшерихий, выделенных из разных экотопов, позволили определить два кластера: первый – эшерихии, выделенные от больных; второй – непатогенные эшерихии, выделенные от здоровых и из водных объектов.

Отмечена способность персистентных свойств микроорганизмов «маркировать» экологическую принадлежность бактерий.

1.5 Лекция №5-6 (4 часа).

Тема «Секретируемые факторы персистенции бактерий»

1.5-6.1 Вопросы лекции:

4. Антилизозимная активность
5. Антилактоферриновая активность
6. Антикомплиментарная активность

1.5-6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Антилизозимная активность микроорганизмов.

Лизоцим (мурамидаза) является ферментом класса гидролаз, расщепляющим β 1-4-

гликозидные связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой в гликановой составляющей полимерной молекулы бактериального пептидогликана. За счет этого лизоцим обладает достаточно широким спектром литической активности и выполняет в макроорганизме функцию неспецифического антибактериального барьера (Бухарин, 1974).

В связи с этим логично было предположить наличие у ряда микроорганизмов способности к ингибированию и даже к утилизации лизоцима. Основанием для такого предположения послужили данные А. М. Безбородова (1980), установившего, что среди актиномицетов имеются штаммы, угнетающие действие лизоцима, им был выделен штамм *Act. herbescens*-4, из которого удалось извлечь ингибитор мурамидазы.

Систематические исследования по изучению факторов естественной резистентности организма при различных формах инфекционной патологии выявили стабильное снижение лизоцимного параметра на определенных этапах инфекции.

В связи с этим было выдвинуто предположение, что подавление лизоцима при патологии инфекционного генеза обусловлено, вероятно, способностью возбудителя инактивировать мурамидазу - это важнейшее звено неспецифической резистентности.

Проверка теоретической посылки была осуществлена экспериментальным путем с использованием методического приема, применяемого в бактериологии при изучении явления бактериоциногении. Принцип «отсроченного антагонизма» был использован при разработке методики определения способности бактерий деградировать лизоцим (Бухарин и др., 1984), который позволил осуществить количественную оценку изучаемого признака микроорганизмов.

Выявленная способность бактерий инактивировать лизоцим была определена как их антилизоцимная активность (Бухарин, Усвятцов, 1982). Изучение широты и диапазона распространения этого признака микроорганизмов осуществлено почти на 3000 культур 9 родов и 25 видов. Эти данные в обобщенном виде позволили заключить, что антилизоцимная активность стабильно в 88-100% встречается у грамотрицательных микроорганизмов как палочковидных, так и кокковых форм (шигеллы, сальмонеллы, кишечные палочки, иерсинии, гонококки, менингококки, пневмококки и др.). Что касается грамположительных кокков (стафилококки, стрептококки), то антилизоцимный признак у них выявлялся значительно реже (Усвятцов, 1987).

Экспериментальные материалы по выяснению биологической роли антилизоцимного признака у микроорганизмов выявили прямую корреляционную связь способности бактерий к деградации лизоцима и их внутриклеточным паразитированием. При изучении длительности паразитирования 18 штаммов шигелл Зонне и Флекснера в конъюнктивальном мешке морских свинок, инфицированных этими возбудителями, Н. В. Немцева (1984) отмечала, что штаммы с низким уровнем антилизоцимной активности выделялись в течение 3 недель от момента инфицирования, тогда как микроорганизмы с высокой антилизоцимной активностью выделялись в течение 5 недель.

Экспериментальным путем на животных, культуре ткани и методом популяционного анализа было доказано, что антилизоцимный признак можно рассматривать как маркер персистенции бактерий, способных к внутриклеточному паразитированию (Бухарин, 1987).

В исследованиях Немцевой Н.В. (1984) был охарактеризован диапазон уровня антилизоцимной активности у дизентерийных бактерий: низкий (от 0 до 5 мкг), средний (от 6 до 10 мкг) и высокий (выше 10 мкг). Изучена динамика антилизоцимной активности

шигелл. Обнаружена связь антилизозимной активности шигелл с их вирулентностью. На модели куриных эмбрионов впервые показана способность шигелл истощать лизоцим в клетках и тканях организма, где шигеллы с низкой антилизозимной активностью снижали уровень лизоцима в клетках с 47,2 мкг до 25,3 мкг, тогда как штаммы с высокой антилизозимной активностью приводили к более значительному истощению мурамидазы в клетках - до 7,5 мкг. В последующем этот вывод был подтвержден и в опытах с менингококком (Зарифуллина, 1986) и в клинических условиях при шигеллезах (Федосеева, 1985).

В итоге было сформулировано положение, о модельной системе «лизозим хозяина - антилизозим возбудителя», позволяющей с учетом специфичности не только выяснить патогенетические особенности инфекции, но и использовать их в прикладных целях и, в первую очередь, для прогнозирования реконвалесцентного бактерионосительства.

В дальнейшем были проведены эксперименты, позволившие определить генетическую природу антилизозимного признака и изучить плазмидный профиль ДНК, кодирующей антилизозимную активность у клебсиелл, с молекулярной массой в 60 МД (Бондаренко, Яблочков, 1987).

Доказано, что антилизозимный признак бактерий является конститутивным, секретируемым фактором, специфически взаимодействующем с лизоцимом и инактивирующим его. При помощи биохимических методик удалось выделить антилизозимный фактор из кишечной палочки 0-114 и клебсиеллы пневмонии 22-110 и определить его химическую природу - термостабильный анионный белок с молекулярным весом 21000 Д, инактивируемый трипсином (Соколов, 1990).

Оценивая биологическую целесообразность антилизозимного фактора у бактерий, следует отметить его не случайное появление у микроорганизмов что, вероятно, связано с широким кругом хозяев, располагающих лизоцимом, как средством защиты. Смысловая нагрузка приобретения этого фактора бактериями - обеспечить себя дополнительным механизмом выживания, «расчищая» эконишу в условиях внутриклеточного паразитирования. (Бухарин, 1990)

2. Антилактоферриновая активность. Лактоферрин (ЛФ) — железосвязывающий гликопротеин, являющийся важным маркером воспалительного процесса, одним из факторов неспецифической защиты организма, показателем острой фазы (Сухарев и др., 1990).

Впервые лактоферрин молока был описан в 1939 году и выделен вначале из коровьего, затем из женского молока методами фракционирования сульфатом аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и КМ-сефадексе (Айсен, 1978; Sorensen et al., 1939). В 1991 году была расшифрована первичная структура ЛФ молока коровы (Pierce et al., 1991).

Местом синтеза ЛФ молока, слюны, слез и других экскретов считаются железистые клетки соответствующих эпителиальных тканей, а ЛФ сыворотки – нейтрофилы (Masson et al., 1969). Установлены одинаковые физико-химические свойства и иммунохимическая идентичность экскреторного и сывороточного ЛФ (Кокряков и др., 1988; Немцова и др., 1988; Николаев, 1985).

Основной особенностью ЛФ, определяющей спектр его многочисленных функций является его способность специфически связывать ионы железа и некоторых других металлов переходной группы. Функции, в основе которых лежит комплексообразующая способность ЛФ - детоксицирующая, транспортная, антимикробная (Oram & Reiter, 2004).

Несмотря на подробное изучение ЛФ в течение многих лет, его основная функция до сих пор не ясна.

Известно, что рост и развитие желудочно-кишечного тракта новорожденных животных, вскармливаемых материнским молоком, интенсивнее, чем у вскармливаемых молочными смесями (Heierd et al., 1984; Widdowson, 1985). Nichols с соавторами (1990), измеряя встраивание тимидина в ДНК клеток крысы *in vitro*, показали, что ЛФ человека является фактором, стимулирующим рост, причем такая способность ЛФ не зависит от наличия связанного железа. Это открытие увеличивает значимость ЛФ в желудочно-кишечном тракте ребенка: ЛФ не только является источником железа и аминокислот, но и способствует клеточному росту (Nichols et al, 1990).

Создавая и поддерживая дефицитную по катионам железа и других металлов переменной валентности, необходимых для роста бактерий среду, ЛФ является одним из ведущих молекулярных факторов, сдерживающих размножение и рост бактерий и низших грибов на поверхности барьерных эпителиев (Bullen et al., 1978).

ЛФ посредством связывания ионов железа и других металлов переменной валентности из среды поверхностных структур оболочек микроорганизмов лишает последних жизненно важных микроэлементов, входящих в состав цитохромов дыхательной цепи, каталаз, пероксидаз и супероксиддисмутаза, кроме этого, снижает их резистентность к токсическому действию химических реактивных производных кислорода. По мнению американского исследователя Е. Weinberg (1998), удержание железа ЛФ и ТФ во внутренней среде животного организма является одним из ведущих механизмов защиты от инфекций и опухолевого роста.

Однако многие патогенные бактерии имеют специфические рецепторы, способные связывать ЛФ и утилизировать связанное с данным белком железо.

Бактериостатическое действие ЛФ в отношении микрофлоры – *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. mutior*, *S. pneumoniae*, *Vibrio cholerae* 5698, *Pseudomonas aeruginosa* (Кокряков и др., 1989) присуще только ненасыщенному железом ЛФ – апоЛФ.

Известно, что ЛФ коровьего молока проявляет бактериостатическую активность по отношению к бактериям. Наиболее чувствительны к его действию оказались штаммы *Escherichia coli* (Rainard, 1950), а некоторые штаммы *Staphylococcus aureus* проявляли устойчивость к ЛФ. Это заставляет предполагать, что механизм антибактериального действия ЛФ сложнее, нежели простое удаление железа из среды. Было показано, что ЛФ вызывает изменение проницаемости наружной мембраны некоторых грамотрицательных бактерий (Ellison, 1988). ЛФ способен выщеплять молекулы липосахаридов (эндотоксинов) из наружной мембраны грамотрицательных бактерий, что происходит в результате связывания ЛФ Mg^{2+} и Ca^{2+} , которые стабилизируют наружную мембрану. Возможно также взаимодействие электростатического характера слабоосновного ЛФ (pH~8,5) с карбоксильными группами в составе мембраны. Кроме того, вероятно дезорганизация оболочки бактерии приводит к активации вещества, вызывающего аутоповреждение (Ellison et al., 1985).

Совместное действие ЛФ с лизоцимом, также являющимся бактериостатиком и содержащимся в грудном молоке, может приводить к синергичному бактерицидному эффекту (Ellison & Giehl, 1991).

При бактериальных инфекциях и нагноительных процессах концентрация ЛФ нейтрофилов в плазме возрастает параллельно количеству нейтрофилов. При этом увеличивается транспорт железа с ТФ на ЛФ, который, будучи нагруженным железом,

переносит его клеткам ретикулоэндотелиальной системы, где железо откладывается в виде ферритина (Rainard, 1950). Вирусная инфекция приводит к снижению уровня ЛФ в нейтрофилах и плазме, несмотря на наличие лейкоцитоза при вирусных заболеваниях. Снижение сывороточного ЛФ отмечается также при радиоактивном облучении, введении цитостатиков и кортикостероидов (Bellamy et al., 1992).

Возможно, что все клетки животных и растений, чтобы выжить имеют «внутриклеточный пищеварительный аппарат», образованный лизосомной системой. В систему входят совокупность мембранных пузырьков, пребывающих в постоянном изменении, лизосомы, которые содержат кислые гидролазы для «очищения» клетки и поглощения бесполезного клеточного материала. Именно эти кислые гидролазы находятся в первичных гранулах многоядерных нейтрофилов, тогда как вторичные или специфические гранулы этих лейкоцитов содержат фосфатазу, часть лизоцима и ЛФ. В момент фагоцитоза происходит параллельное внеклеточное освобождение кислых гидролаз и ЛФ. Во всех клетках организма лизосомный аппарат обеспечивает переваривание материалов внеклеточного происхождения (гетерофагия) и материалов самой клетки (аутофагия). В секреторных клетках лизосомы, кроме того, обеспечивают функцию кринофагии, что позволяет поглощать избыток секреторных компонентов и поддерживать гомеостаз желез внешней секреции. В связи с этим предполагается участие ЛФ в процессах внутриклеточного пищеварения (Bullen et al., 1978).

Бактерицидные свойства ЛФ в отношении некоторых видов микроорганизмов могут быть объяснены образованием коротких основных (катионных) пептидов N-концевых участков белка путем ограниченного протеолиза. Пептиды ЛФ крупного рогатого скота с аминокислотной последовательностью 1-54 и более короткий 1-41, так называемый лактоферрицин В, обладают еще большим, чем ЛФ микробицидным действием, которое объясняется выраженной основностью аминокислотной последовательности на концах молекул этих пептидов (Ellison et al., 1985; Кокряков и др., 1989, 1999).

В настоящее время известно, что штаммы, обладающие антилактоферриновой активностью способны персистировать в организме.

Выраженность антилактоферриновой активности определяется видовой принадлежностью микроорганизма (Валышева, 2003). По данным Alugupalli и Kalfas (1996) деградация лактоферрина была более выраженной под действием *Porphyromonas gingivalis* и *Capnocytophaga sputigena*, слабой под действием *Capnocytophaga ochracea*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* и *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter sputorum*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Bacteroides forsythus* и *Peptostreptococcus micros*. В отличие от *P.gingivalis* на деградацию лактоферрина бактериями *C.sputigena* не оказывали влияние ингибиторы протеаз; обнаруженные фрагменты лактоферрина проявляли электро-форетическую подвижность дегликозилированных форм лактоферрина. Кроме того, слабая реактивность или отсутствие взаимодействия этих фрагментов со специфическим к сиаловой кислоте лектином свидетельствует, что они десилированы (Alugupalli, 1996). Штаммы *Porphyromonas gingivalis* полностью деградируют ЛФ, в то время как протеазы *Prevotella intermedia* и *Prevotella nigrescens* приводят только к частичной деградации белка (Tomita et al., 2002).

В настоящее время проблема регуляции антилактоферриновой активности микроорганизмов различными факторами является не достаточно изученной и требует

дальнейших исследований в этом направлении. В частности, остаются открытыми вопросы о действии эндогенных факторов желудочно-кишечного тракта, а также лечебно-профилактических препаратов (антибиотиков, лекарственных растений, пробиотиков, пребиотиков и др.) на антилактоферриновую активность микроорганизмов.

3. Антикомплиментарная активность бактерий.

Открытие комплемента в конце XIX в. связывают с именем Жюля Борде, работавшего в лаборатории И. И. Мечникова в Париже. Первые данные указывали, что в сыворотке крови животных имеется термолабильное вещество, которое усиливает опсонизацию бактерий и в присутствии антител убивает их. Опсонизирующая и лизирующая активность сыворотки связана с большой группой белков, объединенных в единую систему комплемента. Понятие «комплемент» было предложено в 1895 г. немецким ученым П. Эрлихом. Наибольшее количество его содержится в сыворотке крови морской свинки. Взаимодействие антител с антигеном провоцирует каскад реакций, состоящий из последовательной активации одного белка системы предыдущим белком этой системы. Некоторые из членов системы комплемента связываются ковалентно с бактериями, опсонизируя их для успешного поглощения фагоцитами, обладающими соответствующими рецепторами к комплементу. Другие члены функционируют как хемоаттрактанты, привлекая в зону воспаления, где происходит активация системы комплемента, фагоцитирующие клетки. Заключительные компоненты каскадной реакции выступают в качестве литических факторов, разрушая бактерии (Галактионов, 2004).

Исследование взаимодействия системы комплемента с бактериальными клетками имеет столь же многолетнюю историю, что и изучение самой системы. Открытый благодаря своим бактерицидным свойствам, комплемент сразу привлек внимание исследователей, занимающихся изучением защитных сил макроорганизма, а также бактериологов, изучавших вирулентные характеристики бактерий. Так, Л.С. Резникова ссылается на работу Соса (1914), в которой указывается на способность бактериальных суспензий инактивировать комплемент, причем различные бактерии обладали различным антикомплементарным действием. В частности, сенная палочка, по данным Соса, «продуцирует растворимые антикомплементарные вещества, в то время как сарцина инактивирует комплемент путем адсорбции» (Резникова, 1967). Об антикомплементарных свойствах бактериальных суспензий упоминается в работе Д.Г. Кудлай (1954), где исследовалась взаимосвязь этих свойств с морфологическими признаками бактерий. Вероятно, наиболее существенным вкладом в объяснение подобных фактов явилось открытие Пиллемером в 1954 году пропердина и последовавшая за этим открытием разработка теории альтернативного пути активации комплемента. Открытие альтернативного пути активации во многом объяснило общеизвестный тогда факт адсорбции комплемента бактериальными антигенами (Бойд, 1969).

В настоящее время изучению взаимодействия комплемента с бактериальными клетками посвящено большое количество работ (Игнатов, 1987). Однако термин «антикомплементарная активность бактерий» практически не используется исследователями так как он употребляется в отношении, например, нативных декстранов (Преображенская и др., 1977). Очевидно это связано с возможностью по-разному его интерпретировать. Во-первых, инактивация комплемента при контакте с бактериями может происходить вследствие его активации по альтернативному пути, а также непосредственной активации C1 в отсутствии антител (так называемая неклассическая

активация С1) бактериальными липополисахаридами (Lachmann и др., 1984). Во-вторых, бактериальные клетки могут продуцировать протеолитические ферменты, разрушающие белки системы комплемента (Goldlust, 1968, Vaca Pacheco, 1988). В-третьих, весьма вероятной остается возможность продукции специфических ингибиторов комплементарных протеинов, которые широко распространены в микробном мире. Резистентность бактерий к бактерицидному действию системы комплемента, рассматриваемая Р. W Taylor в качестве фактора вирулентности и связана с особенностями липополисахаридов клеточной стенки, их экранированием, особенностями организации наружной мембраны (для грамотрицательных бактерий), присутствием специализированных антикомплементарных белков на ней, также может быть расценена как антикомплементарная активность (Taylor, 1988).

О способности золотистых стафилококков разрушать комплемент известно из работ Р. Lew с соавторами (1979). Эта способность к деградации комплемента оказалась возможной при наличии у золотистых стафилококков внеклеточной протеазы (Bhakdi, 1985). Антикомплементарная активность была обнаружена у *Cl. hystolyticum* (Goldlust., 1968) и *P. Aeruginosa* (Vaca Pacheco., 1988), которые продуцировали протеолитические ферменты, разрушающие белки системы комплемента. Ю.А Брудастов (1992), изучавший антикомплементарную активность бактерий, выявил наличие этого признака у стафилококков, кишечных палочек и клебсиелл. Распространение изучаемого признака, как и его величина, нарастали в ряду окружающей среда – бактерионосители – больные. Отмечено повышение антикомплементарной активности в популяциях золотистых стафилококков при экспериментальной инфекции на мышах, обусловленное накоплением клонов, обладающих изучаемым свойством, в том числе и более выраженным. Показано, что штаммы стафилококков, выделенные от больных с затянувшимся гнойно-воспалительным процессом, чаще обладали способностью инактивировать комплемент (Дерябин и др., 1996). При определении антикомплементарной активности у штаммов золотистых и эпидермальных стафилококков, выделенных от резидентных и транзитных бактерионосителей, установлена высокая частота распространения с высоким уровнем выраженности признака у штаммов, выделенных от резидентных бактерионосителей (Матюшина, 1996). Последующее изучение антикомплементарной активности у стафилококков выявило высокую частоту ее распространения у золотистых стафилококков (89,4%) по сравнению с эпидермальными (2,9%), что позволило рекомендовать этот тест в качестве дополнительного дифференцирующего признака среди представителей рода *Staphylococcus* (Бухарин и др. 1992). Описана антикомплементарная активность у гококков (Ахунова и др. 1997).

1.7 Лекция №7 (2 часа).

Тема «Факторы защиты патогенных и условно-патогенных бактерий на примере системы «паразит-хозяин».

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Факторы патогенности.
2. Инфицирование слизистых поверхностей.
3. Инвазия.

4. Внутриклеточная жизнь бактериальных патогенов.
5. Взаимодействие бактериальных патогенов с иммунной системой хозяина.

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

1.Факторы патогенности. Каждый из них ответственен за проявление конкретных свойств микроорганизма в инфекционном процессе.

К ним относят: *факторы адгезии и колонизации* — с их помощью бактерии распознают рецепторы на мембранах клеток, прикрепляются к ним и колонизируют клетки (различные поверхностные структуры клеточной стенки); *факторы инвазии* — благодаря им бактерия проникает в клетку (белки наружной мембраны); *факторы, препятствующие фагоцитозу* — либо маскируют бактерию от фагоцитоза (капсула), либо подавляют фагоцитоз (различные белки — белок А у стафилококков, белок М у стрептококков); *факторы, подавляющие фагоцитоз* — вещества, подавляющие окислительный взрыв фагоцитов (например, V-W-антигены *Y. pestis*); *ферменты «защиты и агрессии» бактерий* — способствуют распространению бактерий по тканям хозяина (гиалуронидаза, лецитиназа, протеазы и др.); *эндотоксины* — представлены только у грамотрицательных микроорганизмов (липосахариды и связанные с ними белки клеточной стенки). Высвобождаются в среду организма после гибели клетки и обладают многообразным воспалительным и пирогенным действием неспецифического характера; *экзотоксины* (подробно о них в разделе 1.5) — токсические молекулы, активно секретируемые в окружающую среду с помощью специальных секретируемых систем [Коротяев А.И., Бабичев С.А., 1998]. Далее мы покажем участие этих факторов в инфекционных процессах.

2.Инфицирование слизистых поверхностей.

Слизистые поверхности носоглотки, желудочно-кишечного тракта и половых путей изобилуют комменсалами, которые ограничивают доступ патогенов к питательным веществам. Кроме того комменсалы занимают поверхностное пространство и продуцируют различные ингибирующие вещества. Механизм противодействия бактериальных патогенов комменсалам плохо изучен. Известно, что лишь очень небольшим количествам патогенов слизистой оболочки удастся преодолеть эту защиту. Следующий барьер, который они должны преодолеть, это слизь. Обнаружено, по крайней мере, два механизма, позволяющие бактериям преодолевать этот барьер.

Первый — это подвижность (т.е., обладание жгутиками) и хемотаксис. *Второй* — наличие в слизи рецепторов хозяина для адгезинов бактерий, которые удерживают бактерии и блокируют взаимодействие с рецепторами эпителиальных клеток. Патогенные бактерии способны расти в слизи, тем самым подавляя любые рецепторы или другие блокирующие агенты [Smith H., 1995]. Далее, что бы не допустить удаления в результате движения воздушного потока либо содержимого кишечника, им необходимо закрепиться на поверхности эпителия. Способность бактерий к адгезии и колонизации поверхностей закреплена естественным отбором. Она наблюдается не только в организме человека и теплокровных животных. Эта функция необходима бактериям при сапрофитическом существовании. Например, легионеллы активно прикрепляются к поверхности цианобактерий [Bohach, Snyder 1983], холерные вибрионы активно колонизируют зоопланктон, хитин которых используется ими как источник питания и стимулируют размножение холерных вибрионов [Nalin et al., 1979]. Таким образом адгезия — это общебиологическое явление, известное как свойство микроорганизмов фиксироваться и

размножаться, колонизируя поверхности различной природы. Большинство грамотрицательных бактерий прикрепляются к эпителиальным клеткам человека и животных с помощью адгезинов, представляющих собой особые органеллы [Бухарин О.В. и Усвятцов Б.Я., 1996]. Отдельные патогены используют сразу несколько «факторов адгезии», например, *B. pertussis* и *H. influenzae*. Наиболее распространенными являются пили — выросты нитевидной формы, расположенные на полюсах бактериальной клетки. Как правило, они состоят из белковых субъединиц с молекулярной массой 15000—30000 и содержат до 50% гидрофобных аминокислот [Мороз А.Ф., 1988]. Пили используются бактериями для связи с субстратами почвы, и этот процесс нередко имеет характер адгезин-рецепторного взаимодействия, обеспечивающего им высокую специфичность при колонизации в организме теплокровного. Например, пили уропатогенных кишечных палочек связываются с группировкой альфа-D-галактопиранозил-(1-4)-бета-D-галактопиранозида, входящей в состав гликолипида поверхности эпителия, выстилающего верхний отдел уринарного тракта [Hultgren S. et al., 1993]. Количество и тонкая структура таких рецепторов в уринарном тракте человека варьируют, однако у уропатогенных бактерий синтезируются различные адгезиновые варианты пилей, что значительно повышает вероятность их адгезии. Синегнойная палочка проявляет адгезивные свойства по отношению к эпителию дыхательного тракта, чем объясняется частая его колонизация при застойных явлениях в трахее и бронхах. Адгезия синегнойной палочки к другим эукариотическим клеткам происходит только в случае их термического или химического повреждения [Мороз А.Ф., 1988].

Адгезия бактериального патогена может осуществляться к компонентам внеклеточного матрикса — фибронектину, коллагену, ламинину и др. Матриксные белки имеют последовательность RGD, с которой взаимодействуют интегрины клеточной поверхности. Тем самым белки внеклеточного матрикса способствуют «приклеиванию» бактерий к клеткам-мишеням хозяина [Finlay B., Falkow S., 1997]. Адгезия бактерий к таким белкам носит специфический характер и каждый патоген реализует эту возможность «по-своему». Для проявления патогенности некоторых бактерий критическое значение имеет их взаимодействие с матриксными белками. Например, белок YadA способствует связыванию *Yersinia enterocolitica* с клеточным, но не плазмменным фибронектином посредством адгезии с коллагенами и ламининами. Утрата YadA снижает вирулентность возбудителя иерсиниоза для мышей почти в 100 раз [Pere J.C. et al., 1995].

В последние годы стало ясно, что адгезия бактерий не является простым механическим взаимодействием их лиганд-структур с рецепторами на поверхности клеток-мишеней хозяина, имеющими другое предназначение. Взаимодействие патогена с клеткой хозяина может приводить к *активации сигнальных систем клеток* непосредственно бактериальным компонентом, либо через стимуляцию активационных факторов хозяина, например, воспалительных цитокинов. Было показано, что энтеропатогенные кишечные палочки (ЕПЕС) секретируют белки, активирующие сигнальный путь, включающий фосфорилирование одного из белков клетки-хозяина — Hrp90. После этого становится возможной адгезия бактерии к поверхности клетки. Самым удивительным для ученых, обнаружившим данное явление, оказалось то, что тирозин-фосфорилированная форма Hrp90 и есть тот рецептор, с которым взаимодействует адгезия ЕПЕС — наружный мембранный белок интимин (94 кД), кодируемый *eae*-геном [Rosenshine et al., 1996; Goosney D. et al., 1999]. Механизм, запускающий инвазию

бактерий после их адгезии к клеткам хозяина, включается еще до того, как эта адгезия произошла. Бактерии способны «чувствовать» свое окружение и регулировать плотность своих популяций посредством сигналов «от клетки к клетке».

Заметим, что почти все факторы вирулентности бактерий строго регулируются, при этом их экспрессия связана с различными сигналами окружающей среды (температура, концентрация ионов, осмолярность, количество железа, pH, наличие источника углерода, содержание кислорода и др.). Патогены используют один или более из этих факторов для того, чтобы «понять» в какой среде, т.е., на какой стадии инфекционного процесса они находятся в настоящее время. Например, гены инвазии обычно включаются на ранней стадии инфекции, но подавляются, когда бактерии проникают внутрь клеток хозяина [Finlay B., Falkow S., 1997].

Обращает на себя внимание избыточность механизмов адгезии и колонизации у бактерий.

3. Инвазия. Многие патогенные микроорганизмы способны проникать в клетки хозяина и активно в них размножаться. Для проникновения в клетки бактерии используют адгезивные молекулы, называемые инвазинами. Наиболее распространенный механизм адгезии включает активацию сигналов в клетке хозяина, которые делают возможным инвазию бактерий посредством запуска нормальных клеточных реакций. Проникновение же бактерий в клетку обеспечивается элементами ее цитоскелета.

Некоторые патогены, например, *Rickettsia prowazekii*, продуцируют фосфолипазы, разрушающие клеточную стенку вокруг «прилипшего» микроорганизма и он проникает непосредственно в цитоплазму [Walker D.H. et al., 1983]. Однако каким образом осуществляется контроль энзиматической деградации, предотвращающий клеточный лизис и как клетки хозяина восстанавливают свои мембраны после инвазии, остается неизвестным [Finlay B., Falkow S., 1997].

Прежде всего это экзотоксин А (является ADP-рибозилтрансферазой). Он способен инактивировать фактор элонгации 2 и тем самым ингибировать в клетке белковый синтез. Экзотоксин А ответственен за локальные повреждения тканей и иммуносупрессию. Экзонзим S также является ADP-рибозилтрансферазой, но преимущественно рибозилирует GTP-белки, такие как Ras. Он ответственен за непосредственное разрушение легочной ткани. Два гемолизина — фосфолипаза С и рамноллипид, могут действовать как синергисты при разрушении липидов и лектинов. Рамноллипид содержит детергент-подобную структуру и благодаря ей он растворяет фосфолипиды легочных тканей, делая их более доступными для разрушения фосфолипазой С. Протеазы (LasB-эластаза, LasA-эластаза и щелочная протеаза) играют основную роль во время острой фазы инфекции. Роль щелочной протеазы в инвазии *P. aeruginosa*, неизвестна. LasA-эластаза является сериновой протеазой и действует как синергист LasB-протеазы (цинк металлопротеаза) при деградации эластина легочной ткани. LasB-эластаза деградирует не только эластин, но и фибрин и коллаген, а также инактивирует человеческие иммуноглобулины G и A, компоненты комплемента и лизоцим, находящийся в воздушных путях, т.е., LasB-эластаза еще и препятствует действию механизмов защиты хозяина [Van Delden C, Iglewski B., 1998]. Система регуляции генов патогенности *P. aeruginosa* показана на рис. 9.

Salmonella typhimurium — возбудитель энтероинфекции людей. Для проникновения возбудителя в нефагоцитирующий эпителий необходимы несколько хромосомных генов (*inv/spa*), кластированных на «острове патогенности», названном SPI1 (*Salmonella pathogenicity island 1*; более подробно см. «острова патогенности» и «системы секреции

бактериальной клетки»). Подобно ЕРЕС, АРМ кодирует третий тип секреторной системы, активируемой посредством межклеточного контакта. Это позволяет экспортировать в клетку хозяина детерминанты вирулентности, необходимые для бактериальной инвазии [Goosney D. et al., 1999]. Рис. 11. Механизм инвазии *Salmonella typhimurium*. А. Трансмиссионная электронная микрофотография индуцированного *Salmonella* «рифления» мембраны поляризованных Caco-2 эпителиальных клеток. В. Инвазия *Salmonella* в эпителиальные клетки хозяина. *Salmonella* секретирует белки вирулентности, включающие SopE и SptP с помощью секреторной системы III типа. SopE функционирует как фактор обмена гуанидина для небольших СТР(гуанидинтрифосфат)-связывающих белков, вероятно, вызывая обмен GDP на GTP белка CDC42, члена семейства Rho. SptR является фосфатазой, необходимой для инвазии. Предполагается, что она разрушает цитоскелет. Инвазия также стимулирует активность фосфолипазы C (PLC1, приводящей к истечению из клетки и иоцитолтрифосфата (IP3) и Ca^{2+} . Последний, в свою очередь, «обратным ходом» может быть вовлечен в перестройку цитоскелета, что приводит к «рифлению» мембраны эукариотической клетки и интернализации *Salmonella* [Goosney D. et al., 1999]

Yersinia. Наиболее изучены системы инвазии у *Yersinia enterocolitica* и у *Yersinia pseudotuberculosis*. Первоначально они проникают в организм через посредничество М-клеток пейеровых бляшек подвздошной кишки. Дальнейшая диссеминация происходит благодаря выживанию внутри макрофагов, которые мигрируют через лимфатическую систему. Оба микроорганизма обладают хромосомными генами, кодирующими наружный мембранный белок инвазии, способствующий их адгезии и проникновению в нефагоцитирующие клетки. Показано, что инвазин эффективно присоединяется к белкам семейства (бета1-интегринов. После тесного связывания с интегринами, инвазин индуцирует проникновение бактерии во внутрь клетки с помощью механизма, подобного «застежке молнии» («zipper-like» mechanism — «зип-лайк» механизм). Он заключается в «расстегивании» мембраны вокруг бактерии в момент ее проникновения в клетку хозяина. Энтеропатогенные *Yersinia* обладают еще двумя инвазинами: Ail и YadA. Белок Ail способствует более эффективной адгезии к эпителиальным клеткам, но не участвует в их инвазии. Зато он способствует устойчивости *Yersinia* к действию сыворотки (такие белки широко распространены среди других инвазивных бактерий). YadA — это белок, закодированный на плазмиде. Подобно инвазину он связывается с (бета1

-интегринными клетками хозяина. Присоединение *Yersinia* к бета1-интегрину клетки хозяина запускает механизм контакт-зависимой секреции плазмидных факторов вирулентности и последующей транслокации в ее цитоплазму отдельных бактериальных белков [Smith H., 1995; Finlay B, Falkow S., 1997].

Патогены, связывающие молекулы хозяина для осуществления инвазии. Механизмы инвазии отдельных патогенов не поддаются логике. Легионеллы и микобактерии связывают фрагменты комплемента C3b и C3bi, которые облегчают их проникновение в фагоцитирующие клетки, и тем самым, уменьшают для них риск подвергнуться воздействию окислительных радикалов [Schlesinger L.S., Haas R., 1994]. Другие микроорганизмы связывают фибронектин, который затем функционирует как мостик между бактерией и фибронектиновым рецептором клетки хозяина, способствуя их инвазии. Например, *Mycobacterium leprae* продуцирует фибронектинсвязывающий белок, который способствует ее проникновению в эпителий и шванновские клеточные линии [Schorey A.B. et al., 1995]. Интересно, что механизмы, используемые для инвазии в

нефагоцитирующие клетки функционируют и в отношении фагоцитирующих клеток. Например, мутант *S. typhimurium*, утративший способность к инвазии эпителиальных клеток, одновременно значительно снижает свою способность проникать в фагоцитирующие клетки [Gahring L.C., 1990]. Это возможно потому, что использование бактериями путей активной инвазии, помогает им избежать антибактериальной активности фагосом, куда они неизбежно попадают при традиционном фагоцитозе [Finlay B., Falkow S., 1997].

4. Внутриклеточная жизнь бактериальных патогенов. Механизм блокирования активного фагоцитоза макрофагами теплокровных имеет аналоги в природе: легионеллы, проникая в амёбы и инфузории, используют те же механизмы, предотвращающие их переваривание и позволяющие микробам активно размножаться в вакуолях простейших [Бухарин О.В., Литвин В.Ю., 1997]. Т.е. патогенность «новых» для человека бактерий может объясняться тем, что они уже были преадаптированы к такой встрече. С. Richmond (1987) считает, что проникновение легионелл в легочные макрофаги обусловлено их «ошибкой» (по определению В. Levin — это «недалновидная эволюция»), ставшей возможной из-за большого сходства этих клеток с их природными хозяевами — амёбами. Любопытно и то, как легионеллы убивают человеческие фагоциты. Для этого они используют эволюционно очень древний прием — индуцирование апоптоза, видимо «отработанный» еще на амёбах [Hagele S., et al., 1998]. В ряде исследований обнаружена прямая корреляция между успешным внутриклеточным ростом бактерии и ее вирулентностью [Finlay B., Falkow S., 1997].

Большинство фагоцитированных бактерий все же погибает в макрофагах и полиморфно-ядерных лейкоцитах. Однако некоторые применяют удачные стратегии собственного выживания. Например, *S. flexneri* и *L. monocytogenes* растворяют мембрану образовавшейся вокруг них вакуоли и таким образом получают доступ к богатой питательными веществами цитоплазме. *Coxiella burnetii* выживает и даже «процветает» среди бактерицидных агентов, доставляемых клеткой хозяина в фаголизосомы. Основным требованием Демона Дарвина к патогену является способность того приспособиться к температуре, осмолярности, концентрации кислорода и уровню питательных веществ внутри тканей хозяина. Это позволит ему достичь такой скорости размножения, которая в наибольшей степени способствует использованию ресурсов хозяина при данной стратегии паразитизма, а, следовательно, ведет к дальнейшему развитию болезни.

Жизнь внутри вакуоли. Патогены используют разнообразные механизмы, позволяющие им избежать гибели в вакуолях («непробиваемые» капсулы; ферменты, нейтрализующие кислородные радикалы и протеолитические ферменты и др.). Но удивительно то, что некоторые из них фактически зависят от факторов, обнаруженных в фаголизосомах! Например, *C. burnetii* и *S. typhimurium* нуждаются в кислых значениях pH в качестве сигнала для внутриклеточной репликации. При этом само проникновение именно в данную фаголизосому, тоже предопределено. Специфический рецептор, который патоген использует для вторжения в эпителиальную клетку или для поглощения фагоцитом, в значительной степени влияет на конечную внутриклеточную локализацию вакуоли, которая окружает патоген [Finlay B., Falkow S., 1997]. Вот уж действительно, паразитические микроорганизмы это не примитивные, а более древние формы жизни!

5. Взаимодействие бактериальных патогенов с иммунной системой хозяина. Локальное взаимодействие бактериального патогена с тканями, как правило, вызывает большое количество системных реакций, посредством которых организм хозяина

пытается контролировать течение инфекции. Иммунная система млекопитающих способна узнавать многие компоненты бактерий, особенно ЛПС и пептидогликан. Однако на некоторые из них эта реакция чрезмерна. *Staphylococcus aureus* продуцирует токсин, названный «суперантигеном» из-за того, что он вызывает токсический шок. «Суперантигенами» свойствами обладают отдельные антигены возбудителя псевдотуберкулеза и уropатогенных кишечных палочек. Их роль в инфекционном процессе не ясна. Предполагается, что «суперантигены» позволяют бактериям преодолевать локальные защитные системы хозяина [Finlay B., Falkow S., 1997], т.е. их синтез является следствием «недалековидной эволюции».

В результате длительного селекционного давления (в том числе и в окружающей среде), наиболее «удачливые» патогены вырабатывают стратегию, позволяющую либо избежать, либо вводить в заблуждение иммунную систему нового хозяина. О.В. Бухарин и Б.Я. Усвятцов (1996) выделяют 4 типовых механизма защиты бактерий от факторов иммунитета.

Экранирование клеточной стенки бактерий. Механизмы экранирования структур бактерий (пептидогликан, поверхностные белки клеточной стенки и др.), опознаваемых иммунной системой хозяина, могут иметь как специфический, так и неспецифический характер. Из неспецифических «экранов», наиболее изучены капсулы и капсулоподобные образования.

Создание бактериями капсульного материала полисахаридной и протеиновой природы представляет наиболее типичную тактику бактериального уклонения от фагоцитоза. Являясь по своей природе полимером N-ацетилнейраминовой кислоты, капсулы многих бактерий сходны не только в химическом, но и в биологическом отношении. Они покрывают основные компоненты клеточной стенки и препятствуют активации комплемента сыворотки [Бухарин О.В., Литвин В.Ю., 1997].

Капсулоподобные образования формируются за счет неспецифической сорбции поверхности бактериальной клетки сывороточных протеинов хозяина (иммуноглобулинов, фибриногена, 2-микроглобулина, гаптоглобулина, сывороточного альбумина, и др.). Такое иммуноглобулиновое покрытие может достигать толщины 100 нм. Оно помогает бактериям уйти от распознавания иммунной системой, придает устойчивость к фагоцитозу и прикрывает их поверхность от лиганд-рецепторных взаимодействий [Бухарин О.В., Литвин В.Ю., 1997].

Сходную функцию — экранирование пептидогликана и воспрепятствование опсонизирующему действию системы комплемента, выполняет у стафилококков — белок А, у стрептококков — белок М [Езепчук Ю.В., 1985].

К специфическому механизму экранирования клеточной стенки бактерий, видимо, можно отнести их антигенную вариабельность.

Многие поверхностные структуры бактерий способны к антигенному варьированию — это жгутики, пили, ЛПС, капсулы, S-слой, секретируемые ферменты и отдельные белки клеточной стенки. Однако это не означает, что они все сразу варьируют у каждого патогена. Интенсивному варьированию подвержены только некоторые из них, как правило, это активно экспрессируемые (или экспонируемые) иммунодоминантные поверхностные белки патогенов, «проживающих» на поверхности слизистых оболочек. Примеров антигенной вариабельности среди внутриклеточных бактерий, значительно меньше. Видимо, это связано с тем, что основной иммунный ответ хозяина вызывают другие их антигены [Finlay B., Falkow S., 1997].

Наиболее хорошо механизм антигенной вариации изучен у *Neisseria* (*N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*). Основной варьирующей антигенной структурой у представителей этого семейства являются пили. Гонококки располагают потенциально большим набором серологически различных пилей, однако всегда экспрессируется ген только одного из них. Это вызвано тем, что в бактериальной клетке постоянно экспрессируется только один функционально активный пилиновый локус (*pil E*). Но одновременно с ним в хромосоме разбросаны еще более чем 50 усеченных нетранскрибируемых генов пилей. В случае генетической перестановки, происходящей по принципу «русской рулетки» (и посредством *Rec A*), экспрессируемый ген в *pil E* заменяется одним из молчащих, с другими серологическими свойствами — антигенная структура гонококка меняется [Seifert H.S., 1992].

Другой варьирующей структурой семейства являются их поверхностные белки Ора. Экспрессия гена каждого такого белка независима от других и реализуется через «двухпозиционный переключатель». Каждый ора-ген в регионе, кодирующем гидрофобную сигнальную последовательность, имеет серию повторов последовательности СТСТТ. Количество СТСТТ определено рамкой трансляции гена и, в итоге, один из двух полных белков Ора экспрессируется. Рекомбинация между СТСТТ-последовательностями меняет количество СТСТТ-повторов и антигенную специфичность белка Ора [Stern A., Meyer T.F., 1987].

Borrelia hermsii — возбудитель возвратной лихорадки, демонстрирует другой пример антигенных вариаций. Этот микроорганизм содержит линейную плазмиду, которая кодирует множество молчащих копий варибельных основных белков. Подобно пилим *Neisseria*, через Перестановки ДНК в экспрессионные сайты на других линейных плазмидах, боррелией осуществляется экспрессия антигенно различных основных белков [Girons S., Barbour A.G., 1991].

Многие бактериальные поверхностные компоненты варьируют от штамма к штамму. Вот только несколько примеров: ЛПС сальмонелл — более 60 типов; капсула *S. pneumoniae* — более 80 типов; IgA-протеаза *H. influenzae* — более 30 вариантов; М-белок стрептококков — более 80 серотипов. Большинство вариаций вызвано маленькими нуклеотидными заменами, вставками и делециями генов, которые кодируют эти факторы вирулентности, а в результате этих процессов мы наблюдаем антигенный дрейф у возбудителя инфекции [Finlay B., Falkow S., 1997].

Продукция бактериями секретлируемых факторов, инактивирующих защиту хозяина. Микробная клетка обладает средствами дистанционного действия, которые представляют многочисленную группу секретлируемых бактериальных субстанций, направленных на инактивацию механизмов иммунной защиты.

Наиболее изучено образование трипсиноподобных ферментов, расщепляющих иммуноглобулины класса А (IgA). Продукция данных ферментов характерна для бактерий, инфицирующих слизистые оболочки бактерий. Протеазы данного типа некоторых микроорганизмов (*P. aeruginosa* и *S. marcescens*) действуют неспецифично и расщепляют другие гуморальные защитные протеины хозяина — лизоцим, фибронектин, и даже компоненты тканей, включая фибробласты. Бактерии также продуцируют ферменты, деградирующие комплемент, лизоцим, бактерицидный компонент лейкоцитарного интерферона, гистоны, дефенсины и др. Наши знания об этих факторах постоянно расширяются [Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., 1996]. Очень важным представляется их способность к полифункциональному действию (см., например,

действие LasB-эластазы). Благодаря этому патоген может добиться «успехов» в новом для себя хозяине не нарушая «принципа экономии генов».

Антигенная мимикрия. Под антигенной мимикрией понимается наличие сходных структур у хозяина и паразита, представленных молекулами разного генетического набора (рис. 12). Сходство между протеинами, закодированными у микроорганизмов, и собственными протеинами хозяина — встречается достаточно широко. Данное явление оставляет отчетливые генетические следы в человеческих популяциях после глобальных эпидемических катастроф.

Образование форм бактерий с отсутствием (дефектом) клеточной стенки. Невозможность «замаскировать» пептидогликан бактериальной клетки приводит к тому, что бактерия либо частично, либо полностью теряет его вместе с клеточной стенкой. С точки зрения паразита, это биологически оправданный шаг, так как возбудитель для организма становится неузнаваем и персистирование его в среде обитания продолжается [Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., 1996].

1.8 Лекция №8 (2 часа)

Тема «Факторы патогенности микроорганизмов».

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Адгезия
2. Колонизация
3. Инвазия
4. Агрессия

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

Факторы патогенности — это материальные носители, обуславливающие способность микробов вызывать инфекционный процесс. К основным факторам патогенности относят способность к адгезии и колонизации, свойства инвазивности и токсигенности, способность к длительному персистированию и др.

1. Адгезия. Размножению бактерий в первичном очаге инфицирования предшествует адгезия (от лат. *ad-haesio*, прикрепляться к чему-либо), т.е. закрепление бактерий на поверхности клеток, что и является началом инфекционного процесса. Прикрепление к поверхности клеток обеспечивают адгезины, или факторы колонизации — различные микробные продукты — молекулы адгезии (белки, ЛПС, липотейхоевые кислоты). Молекулы адгезии могут располагаться непосредственно на поверхности бактериальной клетки, либо входить в состав микроворсинок или капсул. Взаимодействие инфекционного агента с эпителиальными клетками происходит в результате нескольких типов связей, различных по природе и специфичности. Выделяют связи, основанные на взаимодействии электростатических сил, обусловленные гидрофобными свойствами поверхности, лиганд-рецепторные взаимодействия.

Заряд. Бактериальные и эукариотические клетки заряжены отрицательно, но поверхностные ворсинки грамотрицательных бактерий снижают заряд бактерий и уменьшают электростатические силы отталкивания.

Гидрофобность. Бескапсульные бактерии обладают высокой гидрофобностью, усиливающей адгезивность; гидрофобные участки обладают сродством к лигандам на поверхности эукариотических клеток, что и приводит к прочности связи.

Специфические взаимодействия. На поверхности бактерий имеются специфические химические группировки (молекулы) – адгезины, способные к стереоспецифическому связыванию с комплементарными рецепторами на мембранах эукариотических клеток. Между адгезинами микробов и рецепторами соматических клеток происходит лиганд-рецепторные взаимодействия, по принципу «ключ-замок». Этим объясняется тропность микроорганизмов, то есть избирательная способность вызывать заболевания респираторного тракта, ЖКТ, мочевыделительной системы и т.д.

2. Колонизация – процесс размножения микроорганизмов на поверхности эпителия. Для успешной колонизации очага первичного инфицирования бактерии должны выдержать действие многочисленных и разнообразных микробицидных факторов хозяина. Для защиты от них микроорганизмы активно используют ряд структур (капсула, поверхностные протеины) и синтезируемых веществ (экзоферменты).

Капсула ингибирует начальные этапы защитных реакций – распознавание и поглощение. Капсулы «экранируют» бактериальные структуры, активирующие систему комплемента, а также структуры, распознаваемые иммунокомпетентными клетками. Например, слой капсульного вещества защищает тейхоевые кислоты стафилококков от связывания опсонинами. Гидрофильность капсул затрудняет их поглощение фагоцитами, а само капсульное вещество защищает бактерию от воздействия лизосомальных ферментов и токсичных оксидантов, выделяемых фагоцитирующими клетками. Кроме того, бактерии при поглощении легко «снимают с себя» капсулу и избегают контакта с фагоцитом.

Пенетрация – процесс проникновения микроорганизмов внутрь клеток макроорганизма. Это характерно для вирусов, некоторых патогенных бактерий (шигеллы, энтероинвазивные кишечные палочки). Микроорганизмы размножаются внутри клеток, которые гибнут, вызывая нарушение целостности эпителиального покрова (эрозии).

3. Инвазия – способность микроорганизмов проникать через слизистые и соединительнотканые барьеры в подлежащие ткани. Этот процесс обеспечивают жгутики, ферменты. Например, *гиалуронидаза* (*Clostridium perfringens*, некоторые *Streptococcus sp.*, некоторые *Staphylococcus sp.*) расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества, что повышает проницаемость слизистых оболочек и соединительной ткани. *Нейраминидаза* (*Vibrio cholerae*, *Yersinia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Streptococcus spp.*, некоторые *Clostridium spp.*) разрушает гликозидные связи, отщепляя концевые сиаловые кислоты от углеводов. Сиаловые кислоты деполимеризуют поверхностные структуры эпителиальных и других клеток организма, разжижают носовой секрет, слой слизи (муцина) кишечника, способствует распространению не только через слизистую оболочку, но и внутрь клеток.

4. Агрессия – способность патогенных микроорганизмов размножаться в организме хозяина и противостоять его защитным механизмам. Агрессия осуществляется за счет структур клеточной стенки: *капсулы, клеточной стенки, липополисахаридов (ЛПС) Грам- бактерий*, которые подавляют миграцию лейкоцитов, препятствуют фагоцитозу.

Для подавления иммунитета патогенные микроорганизмы продуцируют различные *экзоферменты*: *протеазы* – разрушают иммуноглобулины (антитела), *плазмокоагулазу* – свертывает плазму крови, *фибринолизин* – растворяющий сгустки фибрина, способствуя гематогенному распространению микробов, *лецитиназу* – расщепляющую лецитин цитоплазматических мембран эукариотических клеток, *уреаза H.pylori* нейтрализует кислую среду в желудке.

1.9 Лекция №9 (2 часа).

Тема «Факторы персистенции микроорганизмов на примере системы «паразит-хозяин»

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Экранирование клеточной стенки.
2. Продукция бактериями секретируемых факторов, инактивирующих защиту хозяина
3. Антигенная мимикрия
4. Образование форм с отсутствием клеточной стенки

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

При персистенции микробная клетка пытается защитить свой пептидогликан при помощи разнообразных “экранировочных” структур или путем выделения секретируемых факторов, инактивирующих механизмы клеточной и гуморальной защиты организма. Кроме прямой защиты бактерии пытаются “приспособить” мимикрировать свой пептидогликан для отвлечения от него антительного ответа хозяина, подражая структурным компонентам хозяина (среде обитания). И как крайняя мера — потеря пептидогликана на вместе с клеточной стенкой в целях сохранения бактериальной клетки как вида, ибо в последующем возможна реверсия.

1. Экранирование клеточной стенки.

Микробной клетке выгоднее замаскировать эту структуру, чтобы она не была опознана иммунной системой хозяина, так как пептидогликан, обладая антигенными свойствами, является ее чрезвычайным раздражителем.

Среди экранировочных структур можно назвать поверхностные компоненты клетки, способные ингибировать сывороточные бактерицидные начала: К-полисахаридные антигены *E. coli*; гонококковый поверхностный рецептор, блокирующий антитела; О-антигены с полными полисахаридными боковыми цепочками у гладких форм грамотрицательных бактерий (Braude, 1981). Описан капсулярный материал, ингибирующий поглощение бактерий фагоцитами за счет отмены превентивной опсонизации, — поли-глутаминовая кислота у сибиреязвенных палочек (Kerridge et al., 1963), пневмококковые и менингококковые полисахариды, протеин А у стафилококков и протеин М у стрептококков (Quie, 1983; Densen, Mandell, 1980). Известна защитная роль капсулярного пептидогликолипида — микозида типа С (Draper, 1981) у возбудителя лепры, предохраняющего бактерии от действия лизосомальных ферментов макрофагов. Не исключено, что по мере проведения дальнейших исследований список этих

поверхностных структур персистирующих бактерий расширится и пополнится новыми компонентами.

Механическая защита пептидогликанового слоя клеточной оболочки стафилококков белком А, который стабильно выявляется у золотистых стафилококков, выделенных от людей. Известно, что стафилококки, содержащие белок А, при взаимодействии с сывороткой способны адсорбировать до 90 % иммуноглобулинов G, и наличие этого белка у бактерий — препятствие адсорбции фагов на поверхности клетки-хозяина. Наличие белка А у золотистых стафилококков способствует инактивации комплемента и препятствует эффективному фагоцитозу стафилококков в организме (Акатов, Зуева, 1983). Именно такое покрытие пептидогликана у золотистых стафилококков за счет белка А, к тому же проявляющее лишь слабую антигенность, и может служить, по мнению Н. Smith (1984), объяснением, почему так легко возникает хроническая стафилококковая инфекция, например, у коров, или почему попытки создать иммунитет против стафилококковой инфекции у животных и человека оказались безуспешны (Verhoef, Verbrugh, 1981).

Устойчивость микроорганизмов к их внутриклеточному перевариванию, вероятно, может быть обусловлена и другими экранирующими структурами, в частности полисахаридным слоем. За счет этой структуры стрептококки группы А оказались устойчивы к фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов человека (Leong, Cohen, 1984). И это может оказаться важным в понимании

Бактериальный липополисахарид, обладая многочисленными биологическими функциями, направленными на защиту микроорганизма, способен активировать деятельность цитотоксина.

Для персистенции бактерий имеет значение их липополисахаридный профиль. Описано защитное действие липополисахаридной структуры бактерий от фагоцитоза. Оказалось, что *Br. abortus* успешно противостоит фагоцитам за счет наличия гладкого липополисахарида, снижающего окислительную реакцию нейтрофилов (Kreutzer et al., 1979). Устойчивость стрептококков группы А к лизосомальным ферментам за счет экранизации пептидогликана полисахаридом и сорбированными антителами (Шихман и др., 1990). В качестве экранировочного материала у стрептококков рассматривается М-протеин, который, по мнению Ю. В. Езепчука (1985), препятствует опсонизирующему действию системы комплемента и защищает бактерии от фагоцитарного переваривания.

2. Продукция бактериями секретируемых факторов, инактивирующих защиту хозяина

В целях сохранения возбудителя, находящегося в организме, от бактерицидных факторов сыворотки или фагоцитов микробная клетка располагает также средствами дистанционного действия, которые представляют многочисленную группу секретируемых бактериальных субстанций, направленных на инактивацию механизмов иммунитета организма. Необходимость таких секретируемых факторов у бактериальной клетки очевидна, особенно для патогенных и условно-патогенных бактерий, которые должны уметь противостоять бактерицидным факторам гуморальной и клеточной природы хозяина.

Среди специализированных бактериальных субстанций, преимущественно выделяемых экзоклеточно, можно отметить образование трипсиноподобных ферментов, которые прекрасно расщепляют иммуноглобулины класса А. Протеазы IgA продуцируют многие виды микроорганизмов, колонизирующие слизистые оболочки: *N. gonorrhoeae*, *N.*

meningitidis. H. influenzae, Bacteroides (восемь видов), Ureaplasma urealyticum. S. pneumoniae, S. sanguis, S. mitior, E. coli, Pseudomonas, Proteus. S. marcescens, B. pertussis, Clostridium, Bifidobacterium (Чернохвостова, 1987). IgA-протеазы разных видов микробов различаются по антигенным свойствам и субстратной специфичности

Описаны протеазы, продуцируемые *Ps. aeruginosa* и *Serr. marcescens*, расщепляющие IgA (Molla et al., 1986), действие которых оказалось неспецифично, так как эти внеклеточные протеазы также разрушали и другие гуморальные защитные протеины хозяина — лизоцим, фибронектин и даже компоненты тканей, включая фибробласты.

J. Jacquot с соавторами (1985) выделили и изучили протеазу псевдомонад — эластазу, расщепляющую лизоцим на три фрагмента с потерей бактериолитической активности лизоцима.

Способность бактерий специфически инактивировать лизоцим хозяина была (Бухарин, Усвяцов, 1982) определена как их антилизозимная активность и оценена в персистенции микроорганизмов. Выяснилось, что этот признак встречается у большого количества видов микроорганизмов, преимущественно у грамотрицательных бактерий — в 88—100 % случаев.

Антилизозимная активность выявлена у шигелл (Немцева, 1984; Федосеева, 1986; Герасимов, 1989; Прусс, 1989), сальмонелл (Лосин, 1984; Малышкин, 1986; Михайлов, 1986; Мещеряков) кишечных палочек (Зыкова, 1986; Первушина, 1990), протеев (Керашева, Илинская, 1987), иерсиний (Королюк, Ришук, 1990), гонококков (Усвяцов и др., 1986), менингококков (Борисов, 1988; Зарифуллина, 1986), клебсиелл (Яблочков, 1989; Сурикова, 1992). Закономерно встречался этот признак у носительских штаммов стафилококков (Усвяцов, 1986; Чернова, 1989; Дерябин, 1989).

Ген АЛА *Kl. pneumoniae* оказался конъюгативной плазмидой, которую передавали в штаммы *E. coli*, *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus* и других видов энтеробактерий. Передача АЛА плазмиды сообщала штаммам устойчивость к перевариванию в макрофагах (Петровская, Маракуша, 1987).

Обнаружена зависимость между степенью антилизозимной активности стафилококков и интенсивностью их размножения внутри эпителиоцитов, а также длительностью персистирования: от резидентных бактерионосителей значительно чаще выделялись штаммы с высокой АЛА (Усвяцов, Чернова, 1986; Чернова, 1989).

К секретируемым началам, обеспечивающим персистирование микробной клетки, следует отнести и "антиинтерфероновый" признак, характеризующий способность бактерий инактивировать бактерицидный компонент препарата лейкоцитарного интерферона человека (Бухарин, Соколов, 1988).

"Антиинтерфероновая" активность бактерий выявлена у большой группы патогенных и условно-патогенных грамотрицательных и грампозитивных микроорганизмов (*Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Gafnia*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Bordetella*). Частота выявления этого признака бактерий находилась в тесной зависимости от источника выделения микроорганизма и мало коррелировала с его видовой принадлежностью. Штаммы энтеробактерий, выделенные от больных лиц, обладали данным признаком в 90,4—100 % случаев, тогда как среди штаммов, изолированных от здоровых лиц и из внешней среды, этот показатель соответственно был снижен до 16,1 и 1,6 %.

"Антиинтерфероновый" признак — автономное свойство микроорганизмов, предназначенное для целенаправленного, специфического инаktivирования бактерицидной фракции человеческого лейкоцитарного интерферона. Он представлял гистоноподобный термостабильный белок с молекулярной массой 11—11,5 кД, изоэлектрической точкой 10,5—11,0, низким коэффициентом экстинкции и обладал высокой антибактериальной активностью широкого спектра действия, в связи с чем ему и было дано название "Интерцид". АИА изучена у бордетелл и энтеробактерий. Установлена прямая корреляция АИА с вирулентностью у бордетелл. Выявлены различия в частоте встречаемости АИА энтеробактерий (Ефимова и др., 1991).

Кроме интерферона бактериальной деградации подвергается и комплемент, который среди прочих факторов естественной резистентности организма усиливает силу и яркость проявления защитных свойств хозяина в отношении патогена. О способности золотистых стафилококков разрушать комплемент известно из работ Р. Lew с соавторами (1979). Эта способность к деградации комплемента оказалась возможной при наличии у золотистых стафилококков внеклеточной протеазы (Bhakdi et al., 1985).

Антикомплементарная активность была обнаружена у *Cl. histolyticum* (Goldlust et al., 1968) и *P. aeruginosa* (Vaca Pacheco et al., 1988), где бактериальные клетки продуцировали протеолитические ферменты, разрушающие белки системы комплемента.

Ю. А. Брудастов (1992), изучавший антикомплементарную активность бактерий, выявил наличие этого признака у стафилококков, кишечных палочек и клебсиелл. Распространение изучаемого признака, как и его величина, нарастали в ряду окружающей среда — бактерионосители — больные.

Описана антикомплементарная активность у гонококков *Neisseria gonorrhoeae* (Ахунова и др. 1997).

Обнаружена антигистоновая активность бактерий — их способность инаktivировать гистоны (Соколов, 1993), которые, как известно, принимают активное участие в структурно-функциональной организации хроматина и являются регуляторами иммунитета. Биологическое значение этого свойства у бактериальных клеток пока не совсем ясно, тем не менее, к персистенции микроорганизмов оно, по-видимому, может иметь непосредственное отношение.

3. Антигенная мимикрия

Понятие "мимикрия" (от английского *mimicry* — подражательный) перекочевало в микробиологию из биологии, где насекомые и животные успешно пользуются этим адаптационным приемом в целях сохранения вида (Тэннер, 1985). Мимикрия оказалась распространенным явлением в микробном мире.

В 30—40-е годы была проведена серия работ, выявивших антигены, общие для патогенов и клеток млекопитающих. Показано, что наличие у микроба антигенного сходства с тканью хозяина позволяет патогену избежать взаимодействия с иммунной системой организма, который оказывается толерантным к возбудителю. Такая перекрестная реактивность значительно ограничивала природу иммунной реакции и позволяла бактериям персистировать в организме хозяина за счет их "неузнаваемости". Это явление, характеризующееся наличием гетерогенных антигенов, общих для бактерий и организма человека и животных, получило название "антигенной мимикрии".

Широко распространенный в клетках и тканях животных и человека гетерогенный липидный антиген Форсмана был обнаружен как у патогенов (сальмонелл, шигелл, сибиреязвенных бацилл, пневмококков, стрептококков, клостридий и др.), так и у непато-

генных бактерий (ацидофильных лактобацилл, болгарской палочки и др.). Были обнаружены общие антигены для пневмококка 14-го типа и эритроцитов человека, для чумного микроба и эритроцитов (Жуков-Вережников и др., 1972).

В ряде работ описано антигенное тождество В-групповой субстанции эритроцитов человека и антигенов *E. coli* 0,86, общие перекрестно-реагирующие антигены *Str. pyogenes* группы А и ткани сердца. Интересно, что антигены тканей сердечной мышцы выявлялись в различных морфологических структурах стрептококка: капсуле, оболочке, цитоплазме, цитоплазматической мембране.

Явление мимикрии наблюдали не только у интактных бактериальных форм, но и у L-форм, имеющих дефектную клеточную стенку, о чем пойдет речь в следующем разделе. И. М. Лямперт (1972) показала наличие перекрестно-реагирующих антигенов у стабильных L-форм стрептококка группы А и сердечной мышцы млекопитающих.

Таким образом, наличие общих гетерогенных структур у столь далеко отстоящих на эволюционной лестнице видов, как бактерия и человек, вероятно, можно рассматривать, с одной стороны, как свидетельство единства живого мира, а с другой, как "инструмент -маскировки" возбудителя, подлинного подражания хозяину (среде обитания).

4. Образование форм с отсутствием клеточной стенки

Невозможность "замаскировать" пептидогликан бактериальной клетки иногда приводит к тому, что бактерия либо частично, либо полностью теряет его вместе с клеточной стенкой. С точки зрения паразита, это биологически оправданный шаг, так как возбудитель для организма хозяина опять становится неузнаваем и персистенция его в среде обитания продолжается.

Такая способность бактерий к существованию с дефектами или отсутствием клеточной стенки была описана еще в 1984 г. Н. Ф. Гамалея как гетероморфизм. В последующем обнаружение явления L-трансформации бактерий (Klineberger, 1935) послужило основой для изучения L-форм (без клеточной стенки) бактерий. Исследование таких форм различных видов бактерий, проводимое в нашей стране В. В. Сукневым, В. Д. Тимакимом и их последователями, показало, что бесстеночные микроорганизмы — это форма переживания вида в изменившихся условиях существования. Приспособление бактерий к кратковременному переживанию в измененных условиях способствует появлению форм несбалансированного роста: -сферопластов, протопластов, которые по сути являются предшественниками L-форм, или стабильных L-форм.

Рассматривая механизмы L-трансформации, авторы указывают индукторы L-форм, действующие на клеточную стенку: факторы иммунитета — лизоцим, комплемент, иммуноглобулины; ферменты, аутолизины, лизостафин; аминокислоты — глицин, метионин, аргинин, фенилаланин, лейцин; наконец, антибиотики — пенициллин, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин. Наиболее универсальным фактором при L-трансформации патогенов называют пенициллин, для которого, как и для других трансформирующих агентов, точкой приложения в клетке является пептидогликан.

Как стабильные, так и нестабильные L-формы бактерий разных видов могут длительно персистировать в организме, избегая либо подавляя факторы защиты хозяина. На примере кишечной палочки и фекального стрептококка было показано, что L-формы этих микроорганизмов фагоцитируются хуже, чем интактные бактерии. Это обусловлено тем, что L-формы ведут себя как инертные частицы за счет отсутствия у них клеточной

стенки (пептидогликана), что и позволяет им даже размножаться в фагоцитах и выделяться длительное время (Roux, 1977).

L-трансформация возбудителя способствует развитию резидентного бактерионосительства (Прозоровский, 1985). Так, L-формы гонококков часто образуются при торпидных и хронических формах гонореи (Овчинников и др., 1986). L-трансформация бактерий рода *Pseudomonas* рассматривается как один из путей реализации хронического бактерионосительства при данной нозологической форме (Замараев и др., 1987). От брюшнотифозных бактерионосителей выделяли L-формы возбудителя, при хроническом брюшнотифозном бактерионосительстве в мазках костного мозга обнаружены дефектные по клеточной стенке *S. typhi* (Ильинский и др., 1980; Прозоровский и др., 1986).

Образование бесклеточных форм сопровождается изменением метаболизма бактерий. На примере L-трансформации холерного вибриона показано, что бактериальные клетки переходят на более низкий биосинтез органических веществ, что приводит к снижению темпа роста L-форм и их длительной персистенции: возбудитель приобретает способность сохраняться, но не накапливаться до такой степени, чтобы вызвать типичный инфекционный процесс.

Очень близки по форме и структурной организации к L-формам бактерий микоплазмы. Это уникальные прокариоты, имеющие лишь одну липопротеиновую мембрану, которая выполняет функции и клеточной стенки, и цитоплазматической мембраны. Лишенные собственного пептидогликана, эти микроорганизмы с отсутствием клеточной стенки, объединенные в семейство *Mycoplasmataceae*, прекрасно персистируют в организме хозяина. При этом персистирование микоплазм осуществляется с сохранением патогенных потенций в зараженном организме (Тимаков, Каган, 1973). Особо следует подчеркнуть, что персистирование микоплазм, как и L-форм бактерий, имеет неограниченные сроки (исчисляется годами), что, по-видимому, можно рассматривать как высокую степень адаптационных возможностей микроорганизмов.

Совершенно очевидно, что своеобразный "бактериальный стриптиз" — вынужденная мера для паразита, позволяющая освободиться клетке от пептидогликана и перейти в индифферентное состояние, не затрагивающее ее жизнеспособности, в целях сохранения особи как вида в экологической нише.

Не исключено, что в процессе эволюции некоторые облигатные паразиты (возбудитель лихорадки цуцугамуши — *R. tsutsugamushi*) утратили свой пептидогликан и липополисахаридные компоненты (Amano et al., 1987) в своих жизненных интересах, несмотря на внешнее сходство мембран риккетсии и грамотрицательных бактерий.

1.10 Лекция №10 (2 часа).

Тема «Диагностическая значимость персистентного потенциала микроорганизмов в санитарной микробиологии, экологии, медицине и ветеринарии»

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Способ прогнозирования состояния водных биоценозов
2. Способ санации стафилококковых бактерионосителей

1.10.2 Краткое содержание

1. Способ санации стафилококковых бактерионосителей

Проблема профилактики стафилококковой инфекции по-прежнему остается актуальной в современной медицине и практическом здравоохранении. Основными источниками данной инфекции являются бактерионосители, а биотопом стафилококка слизистая оболочка переднего отдела носа. Известны способы санации бактерионосителей путем применения антибиотиков, различных химиопрепаратов, в том числе некоторых дезинфектантов. Однако известные способы не дают длительного положительного эффекта у saniруемых бактерионосителей, наблюдаются рецидивы носительства, привыкание микроорганизмов к данным средствам. Бактерицидные препараты, уничтожая патогенных стафилококков на слизистой оболочке носа, не изменяют степени восприимчивости организма к этим возбудителям. Известны также способы санации бактерионосителей путем применения разнообразных химиотерапевтических средств и биологически активных препаратов: гексахлорофена, фурацилина, риванола, лазоцима, хлорофиллипта, бактериофага и др. Недостатком данных способов является то, что их действие направлено на уничтожение микроорганизма, находящегося вне клетки. Золотистые стафилококки при таких методах сохраняются, после проведения санации разрушают клетки, выходят из них и, не встречая конкуренции со стороны нормальной микрофлоры, погибшей под действием saniрующих средств, размножаются, и вскоре их популяция достигает большой численности. Наиболее близким к заявляемому способу по назначению и совокупности признаков является способ санации стафилококковых бактерионосителей путем воздействия на персистентные характеристики возбудителя масляными растворами витаминов А и Е, являющимися высокоактивными средствами с антиоксидантным действием, способствующим репаративным процессам носового эпителия и подавляющими персистентные свойства микроорганизмов. Важная роль в формировании резидентного стафилококкового бактерионосительства отводится секретлируемым микробным факторам персистенции, обуславливающим внутриклеточное паразитирование возбудителя, антилизотомной, антиинтерфероновой, антикомплементарной. Подавление препаратом персистирующих свойств затрудняет его паразитирование внутри клеток и тем самым повышает эффективность лекарственного воздействия.

Однако известный способ не обеспечивает возможности санирования группы стафилококковых бактерионосителей, страдающих аллергическими заболеваниями, так как встречаются случаи повышенной чувствительности к препаратам данных витаминов у ряда пациентов. Кроме того, данные препараты оказывают лишь местное воздействие, не влияя на состояние антиинфекционной резистентности организма, которая имеет важное значение в патогенезе стафилококкового бактерионосительства.

Поскольку стафилококковые бактерионосители представляют опасность в эпидемиологическом плане как источник стафилококковой инфекции, на повестку дня ставится вопрос об эффективном способе санации и профилактики стафилококковых заболеваний.

Способ осуществляется путем воздействия на персистентные характеристики возбудителя, отличается тем, что бактерионосителя помещают в условия микроклимата спелеошахты на 20-30 мин ежедневно в течение 14-22 дней, а о качестве санации судят по отсутствию стафилококков и (или) по снижению их персистентных характеристик не менее чем на 20%. Достигаемый при осуществлении изобретения технический результат

состоит в том, что заявляемый способ санации за счет исключения проявления аллергических реакций обеспечивает возможность санирования группы стафилококковых бактерионосителей, страдающих аллергическими заболеваниями, а также укрепляет антиинфекционную резистентность организма. Предлагаемый способ позволяет повысить эффективность санации стафилококковых бактерионосителей.

Заявляемый способ решает задачу повышения эффективности санации стафилококковых бактерионосителей за счет исключения проявлений аллергических реакций и укрепления антиинфекционной резистентности организма.

2. Способ прогнозирования состояния водных биоценозов

В поверхностные воды рек, озер, водохранилищ, морей и океанов поступает большое количество разнообразных загрязнителей как химической, так и биологической природы. Мощный приток загрязнений изменяет среду обитания гидробионтов, в результате изменяется их качественный и количественный состав, меняется биоценоз и изменяется качество воды. В связи с этим встает задача разработки принципов оценки качества вод в водоемах и оценки нормального или патологического состояния водоема. Наиболее остро возникает вопрос о возможности ранней индикации ближайших и отдаленных последствий воздействия антропогенных факторов на биоценоз в целом.

Уровень антропогенного воздействия на окружающую среду определяют по разным показателям: химическим, бактериологическим и гидробиологическим, ПДК на отдельные токсиканты. Качество воды формируется всеми водными организмами, их качественным и количественным составом в водном биоценозе, т.е. качество воды является как бы результирующим между гидробионтами и поступающими в водоем веществами. В качестве тестов биоиндикации антропогенного воздействия на водоем большую роль играют бактерии, простейшие, водоросли, беспозвоночные и животные фильтраты.

В биоиндикации антропогенного загрязнения водоема широкое распространение получили методы, основанные на учете общего числа сапрофитных бактерий, выращенных на МПА по методу Коха, заключающиеся в посеве глубинным способом 0,1 мл исследуемой воды в мясопептонный агар и инкубированием этих посевов в термостате при 20-25°C в течение 10 сут с последующим учетом выросших колоний.

Недостатком метода является длительность в получении результатов, а отсюда низкая оперативность в реакции на загрязнение. Оценка состояния биоценоза по этому методу осуществляется по количественным параметрам и не дает представления о качественных изменениях в микроценозе.

В другом весьма распространенном методе оценка качества воды осуществляется на основании коли-титра и коли-индекса.

Кишечная палочка сапрофит, но ее обнаружение в воде свидетельствует о возможности присутствия в ней и патогенных энтеробактерий. Существуют два метода: метод мембранных фильтров и двухфазный бродильный метод. Недостатком обоих методов является их большая трудоемкость (фильтрация, посев, приготовление и окраска мазков), а также использование большого числа сред и красителей (ХЧ лактозы, глюкозы, желчи, основного фуксина, р-ра сульфата натрия, бромтимолового синего, розовой кислоты), что может приводить к удорожанию проводимых исследований. Метод позволяет учитывать лишь изменения в биоценозе, отражающие санитарное состояние воды, и не дает возможности прогнозирования разных экологических изменений в водоеме.

Таким образом, предлагаемые бактериологические анализы характеризуют качество современных поверхностных вод не полно, а значит не дают истинного представления о состоянии биоценоза в данном типе водоема.

Наиболее надежно характеризует качество воды и состояние водного биоценоза гидробиологические показатели, оценивающие пригодность воды для питьевого водоснабжения, а водоема для рыбохозяйственных целей. Одним из гидробиологических способов оценки класса качества воды и водоема является способ, предложенный В. Н. Жукинским. В его основу положена оценка состояния водоема по качественному и количественному составу фитопланктона, позволяющему оценить водоем по степени сапробности. В основу предлагаемого метода авторы положили не только количественные и качественные показатели гидробионтов, но и их физиологическую активность (продукцию фитопланктона, индекс самоочищения и т.д.).

Однако, метод не лишен целого ряда недостатков: длительность и трудоемкость обработки взятых проб, а отсюда и низкая оперативность в регистрации антропогенного воздействия на состояние биоценоза; регистрация уже состоявшегося изменения в биоценозе, а не предсказание его начала; не учитываются механизмы, обеспечивающие функционирование сообщества.

В связи с этим целью изобретения является биоиндикация ранних изменений в водном сообществе, повышение точности прогнозирования состояния биоценоза.

Решение поставленной цели осуществляется путем использования в качестве тестов биоиндикации титра лизоцимактивных (ЛА) и антилизоцимактивных (АЛА) микроорганизмов с последующим определением отношения ЛА/АЛА.

С целью индикации ранних изменений в водном биоценозе проводят определение титра лизоцимактивных и антилизоцимактивных микроорганизмов с последующим определением индекса при этом, если индекс меньше 1 (ЛП), прогнозируется ухудшение в состоянии водного биоценоза, если больше или равен 1 (ЛП), стабилизация и изменение в сторону улучшения в состоянии биоценоза. Изобретение относится к вопросам экологии и охране окружающей среды и может быть использовано для контроля антропогенного загрязнения водной среды, в частности для индикаций и прогнозирования состояния биоценозов. Изобретение предназначено для использования в работе областных и республиканских санитарно-эпидемиологических станций, специализированных лабораторий и НИИ, занимающихся вопросами оценки степени экологического неблагополучия водной среды природных водоемов.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

2.1 Практическое занятие №1 (2 часа).

Тема: «Секретируемые факторы персистенции: антилизоцимная активность».

2.1.1 Цель работы: Изучить методы определения антилизоцимной активности.

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить чашечный метод определения антилизоцимной активности
2. Изучить фотометрический метод антилизоцимной активности

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри с питательной средой, культуры микроорганизмов, термостат, холодильник, планшеты, бактериальная суспензия, фотометр.

2.1.4 Описание (ход) работы:

Антилизоцимная активность (Бухарин, Усвятцов, 1982) - способность микроорганизмов инактивировать лизоцим.

Антилизоцимная активность в 88-100% встречается у грамотрицательных микроорганизмов как палочковидных, так и кокковых форм (шигеллы, сальмонеллы, кишечные палочки, иерсинии, гонококки, менингококки, пневмококки и др.), у грамположительных кокков (стафилококки, стрептококки) антилизоцимный признак является значительно реже (Усвятцов, 1987).

Фотометрический метод (О.В. Бухарина с соавт., 1999). Бактериальную массу исследуемых культур стандартной бактериологической петлёй засеивали в 3 мл жидкой питательной среды и культивировали в термостате при температуре 37⁰С в течение 24 часов. На спектрофотометре СФ-46 (длина волны 540 нм) измеряли оптическую плотность (ОП) бульонной культуры против питательного бульона (У). Супернатант отделяли от бактериальных клеток центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для определения АЛА в качестве тест-штамма использовали суточную агаровую культуру *Micrococcus luteus* АТТС 15307. Выросшие бактериальные клетки тест-штамма обрабатывали хлороформом в течение 60 минут, смывали, фильтровали через крупнопористый фильтр, дважды отмывали 1/15 М фосфатным буфером с трилоном Б и один раз 1/15 М фосфатным буфером (РН = 6,2), после чего оптическую плотность суспензии микрококка доводили до 0,300. На 1/15 М фосфатном буфере (РН = 6,2) готовили раствор лизоцима. Супернатант исследуемых культур микроорганизмов, объёмом 0,9 мл, смешивали с 0,1 мл приготовленного раствора лизоцима и инкубировали 60 – 120 минут при температуре 37⁰С. 0,5 мл смеси супернатанта и лизоцима добавляли к 2,0 мл суспензии тест-штамма микрококка и измеряли оптическую плотность полученной смеси через 30 и 150 с на спектрофотометре СФ-46 (длина волны 540 нм) против 1/15 М фосфатного буфера. В качестве контроля использовали смесь питательного бульона с лизоцимом в соотношении 9:1. По степени лизиса суспензии тест-культуры рассчитывали антилизоцимную активность исследуемой культуры по формуле:

$$A = \frac{V_1 C (1 - \Delta D_0 / \Delta D_k)}{V_2 Y},$$

где A – антилизотимная активность в микрограммах инактивированного лизотима/мл супернатанта; V_1 – объём (0,1 мл) раствора лизотима исходной концентрации (20 мкг/мл); V_2 – объём (0,9 мл) супернатанта бульонной культуры исследуемого штамма; C – исходная концентрация лизотима (20 мкг/мл); Y – оптическая плотность бульонной культуры исследуемого штамма, ед. оптической плотности; $\Delta D_0 - D_0$ – изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в опыте между 30 и 150 с;

Определение антилизотимного признака микроорганизмов осуществляется при помощи чашечного и фотометрического методов.

Чашечный метод. Готовят ряд чашек Петри с питательным агаром, содержащим лизотим в различных концентрациях (от 0 до 10 мкг/мл). К 9 мл

расплавленного 1,5 %-го питательного агара добавляют 1 мл раствора лизотима в стерильном изотоническом (0,85 %) растворе хлорида натрия. Тщательно высушивают открытые перевернутые чашки Петри в течение 1 ч при температуре 37 °С. На поверхность приготовленных сред "пятачками" засевают исследуемые суточные агаровые культуры микроорганизмов. После инкубации в термостате при заданных режимах выросшие колонии убивают парами хлороформа. Для этого, держа чашки перевернутыми, вкладывают в их крышки кусочки бумаги ватман площадью 8-10 см², пропитанные 0,3-0,5 мл хлороформа. Чашки держат закрытыми 30-40 мин. Затем переворачивают чашки и сверху на колонии настилают 3-4 мл полужидкого (0,6-0,7 %) агара, смешанного с 0,1 мл взвеси агаровой индикаторной культуры *Micrococcus luteus* (lysodeikticus) ATCC 15307. Мутность взвеси соответствует 10 ед. оптического стандарта мутности (ГИСК им. Л. А. Тарасевича). Через сутки инкубации в термостате при температуре 37 °С проводят учет результата опыта по наличию роста микрококка на поверхности и вокруг колоний исследуемых культур, инактивировавших известную концентрацию лизотима, внесенного в питательную среду. На поверхности и вокруг неактивных культур рост микрококка отсутствует, так как оставшийся в среде лизотим лизирует индикаторный штамм.

За уровень антилизотимной активности исследуемых культур принимают максимальное значение концентрации лизотима в среде, при которой еще наблюдается рост микрококка. АЛА микроорганизмов выражают в микрограммах инактивированного лизотима.

$\Delta D_0 - D_k$ – изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в контроле между

Работа

Задача. Рассчитать АЛА разных микроорганизмов. Используя значения оптической плотности приведенные в табл. 1, заполнить табл. 2 в тетради. Сравнить выраженность АЛА разных микроорганизмов. Сделать вывод.

Значение ОП

	1	30с	150с	2	30с	150с	3	30с	150с	4	30с	150с
	Candida			E.coli			S. aureus			Klebsiella		
A	K	0,392	0,275	K	0,415	0,305	K	0,373	0,28	K	0,369	0,278
B	1	0,392	0,371	1	0,404	0,388	1	0,376	0,351	1	0,3	0,231
C	2	0,409	0,393	2	0,403	0,389	2	0,372	0,36	2	0,281	0,21
D	3	0,429	0,427	3	0,337	0,288	3	0,292	0,179	3	0,291	0,231
E	4	0,414	0,398	4	0,411	0,397	4	0,385	0,369	4	0,292	0,224
F	5	0,4	0,387	5	0,348	0,292	5	0,327	0,231	5	0,265	0,18
G	6	0,418	0,412	6	0,416	0,403	6	0,317	0,218	6	0,273	0,19
H	K	0,373	0,258	K	0,410	0,300	K	0,38	0,26	K	0,405	0,300

Ячейки		Оптическая плотность		ΔКонтроль	ΔОпыт	АЛА (мкг/мл)	АЛА±Δ
		через 30 с	через 150 с				
Candida							
A	Контроль						
B	1						
C	2						
D	3						
E	4						
F	5						
G	6						
H	Контроль						

Контрольные вопросы: 1. Что такое антилизотимная активность? 2. В чем заключается суть чашечного метода определения АЛА? 3. В чем заключается суть фотометрического метода определения АЛА? 4. В каких единицах измеряется АЛА? 5. Какой микроорганизм является индикаторным при определении АЛА? 6. Как интерпретируются результаты чашечного метода определения АЛА?

2.2 Практическое занятие №2 (2 часа).

Тема: «Секретируемые факторы персистенции: антикарнозиновая активность».

2.2.1 Цель работы: Изучить метод определения антикарнозиновой активности микроорганизмов.

2.2.2 Задачи работы:

1. Научиться рассчитывать антикарнозиновую активность микроорганизмов.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри с питательной средой, культуры микроорганизмов, термостат, холодильник, планшеты, бактериальная суспензия, фотометр.

2.2.4 Описание (ход) работы:

Для определения антикарнозиновой активности необходимо:

- 1) Исследуемые культуры микроорганизмов выращиваются на мясопептонном агаре при 37°C в течение 24 часов.
- 2) Из выросших культур готовят одномиллиардную взвесь, отбирают 0,1 мл, добавляют 1,7 мл мясопептонного бульона и 0,2 мл карнозина (разведение карнозина готовят таким образом, чтобы его конечная концентрация в МПБ с тест-штаммом составляла 1 мг/мл).
- 3) Параллельно с опытной готовят 3 контрольные пробы: а) контроль 1. К 0,2 мл карнозина в указанном выше разведении добавляют 0,1 мл физиологического раствора и 1,7 мл мясопептонного бульона, б) контроль 2. К 0,2 мл физиологического раствора добавляют 0,1 мл одномиллиардной взвеси испытуемой культуры и 1,7 мл мясопептонного бульона. в) контроль 3. К 0,3 мл физиологического раствора добавляют 1,7 мл мясопептонного бульона.
- 4) Опытную и контрольные пробы инкубируют в течение 24 часов при T 37°C.
- 5) Во все пробы добавляют по 0,1 мл хлороформа и выдерживают в течение 40 минут.
- 6) Все пробы центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 минут.
- 7) Из опытной и контрольных проб отделяют супернатант (по 0,6 мл), добавляют к нему 1,1 мл мясопептонного бульона и 0,1 мл взвеси тест-культуры *M.luteus* (способ приготовления взвеси: 16-18-часовую агаровую культуру *M.luteus* смывают физиологическим раствором и готовят одномиллиардную взвесь по стандарту мутности. Полученную взвесь разводят физиологическим раствором в 10 раз и используют).
- 9) Все пробы инкубируют 24 часа при 37°C.
- 10) Замеряют оптическую плотность взвесей на фотоэлектроколориметре и рассчитывают антикарнозиновую активность исследуемой культуры по

формуле

$$C-C \cdot \left(\frac{OD_2 - OD}{OD_3 - OD_1} \right),$$

где C - исходная концентрация карнозина; OD - оптическая плотность взвеси в опыте;

OD₁ - оптическая плотность взвеси в контроле 1;

OD₂ - оптическая плотность взвеси в контроле 2;

OD₃ - оптическая плотность взвеси в контроле 3.

Антикарнозиновая активность выражается в мг/гл.

Работа

Задание: Рассчитать значение антикарнозиновой активности для следующих микроорганизмов: *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*.

Значение ОП

	1			2			3			4		
	C. albicans			E.coli			S. aureus			K. pneumoniae		
A	OD ₁	0,392	0,275	OD ₁	0,415	0,305	OD ₁	0,373	0,28	OD ₁	0,369	0,278
B	OD ₂	0,392	0,371	OD ₂	0,404	0,388	OD ₂	0,376	0,351	OD ₂	0,3	0,231
C	OD ₃	0,409	0,393	OD ₃	0,403	0,389	OD ₃	0,372	0,36	OD ₃	0,281	0,21
D	OD	0,429	0,427	OD	0,337	0,288	OD	0,292	0,179	OD	0,291	0,231
E	OD	0,414	0,398	OD	0,411	0,397	OD	0,385	0,369	OD	0,292	0,224
F	OD	0,4	0,387	OD	0,348	0,292	OD	0,327	0,231	OD	0,265	0,18
G	OD	0,418	0,412	OD	0,416	0,403	OD	0,317	0,218	OD	0,273	0,19
H	OD	0,373	0,258	OD	0,410	0,300	OD	0,38	0,26	OD	0,405	0,300

Контрольные вопросы: 1. Что такое антикарнозиновая активность? 2. В чем заключается суть метода определения АКрА? 3. В каких единицах измеряется АКрА? 5. Как рассчитывают АКрА?

2.3 Практическое занятие №3 (2 часа).

Тема: «Секретируемые факторы персистенции: антилактоферриновая активность».

2.3.1 Цель работы: Изучить метод определения антилактоферриновой активности.

2.3.2 Задачи работы:

1. Научиться определять антилактоферриновую активность микроорганизмов

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри с питательной средой, культуры микроорганизмов, термостат, холодильник, планшеты, бактериальная суспензия, фотометр.

2.3.4 Описание (ход) работы:

Для определения антилактоферриновой активности микроорганизмов используют метод И.В. Вальшевой с соавт. (2005) на основе иммуноферментного анализа. Исследуемые культуры микроорганизмов выращивают на плотной питательной среде при 37⁰С в течение 18-24 ч, из выросшей агаровой культуры готовят взвесь микроорганизмов (10 ед. по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича) в жидкой питательной среде. Параллельно готовят раствор лактоферрина (200нг/мл) на забуференном физиологическом растворе. Взвесь исследуемых культур микроорганизмов объемом 150 мкл вносят в лунки стерильного полистиролового планшета и смешивают со 150 мкл приготовленного раствора лактоферрина. Параллельно с опытной готовят контрольную пробу: в лунки планшета вносят 150 мкл раствора лактоферрина и 150 мкл жидкой питательной среды. Пробы инкубируют при 37С в течение 24ч. После инкубации содержимое лунок переносят в пластиковые пробирки, центрифугируют при 3000-8000

об/мин в течение 20 минут на холоде, отбирают 50 мкл супернатанта в опытной и контрольной пробирках.

Пробы разводят в 5 раз (до объема 250 мкл) рабочим раствором фосфатно-солевого буфера с твином. Для достоверности получаемых результатов опыт и контроль проводят в трех дублях.

Концентрацию лактоферрина в пробах определяют с использованием реагентов ЗАО Вектор-Бест (рис.1.). В лунки первого ряда планшета с иммобилизованными антителами к лактоферрину вносят по 100 мкл раствора калибровочных образцов. В остальные лунки вносят по 100 мкл анализируемых образцов. Планшет выдерживают в течение 30 мин при 37⁰С, после чего содержимое лунок удаляют энергичным встряхиванием в кювету с дезинфицирующим раствором.

Лунки промывают 3 раза рабочим буферным раствором и дважды дистиллированной водой. Далее во все лунки добавляют по 100 мкл раствора конъюгата антител с пероксидазой хрена и выдерживают в течение 30 мин при температуре 37⁰С, после чего содержимое лунок удаляют встряхиванием, лунки промывают 3 раза рабочим буферным раствором и дважды дистиллированной водой. Затем в лунки добавляют по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Стрипы выдерживают в течение 10-20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. По истечении указанного времени во все стрипы добавляют 100 мкл стоп-реагента.

Регистрацию результатов в лунках с опытной и контрольной пробами проводят на фотометре ИФА-ОЭП при длине волны 450 нм. По результатам измерения строят график в координатах: ось абсцисс - концентрация лактоферрина в калибровочных образцах (нг/мл), ось ординат- соответствующее значение оптической плотности. Концентрацию лактоферрина в опытных и контрольных пробах определяют по калибровочному графику.

Найденные по графику значения концентрации лактоферрина умножают на коэффициент разведения проб, выражают результат в нг/мл.

АЛФА рассчитывают по формуле:

$$C = (C_k - O_o) \times 4$$

C - антилактоферриновая активность микроорганизмов - нг инаktivированного лактоферрина/ мл супернатанта;

C_к – концентрация лактоферрина в контроле, нг/мл;

O_o – концентрация лактоферрина в опыте, нг/мл;

4-коэффициент разведения.

Работа

Задача. Рассчитать АЛФА разных микроорганизмов. Используя значения оптической плотности приведенные в табл. 1, заполнить табл. 2 в тетради. Сравнить выраженность АЛФА разных микроорганизмов. Сделать вывод.

Значение ОП

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,376	0,212	0,179	0,194	0,082	0,073	0,083	0,083	0,11	0,094	0,238	0,218
B	0,151	0,688	0,874	0,926	0,081	0,08	0,08	0,08	0,337	0,345	0,217	0,226
C	0,521	0,268	0,27	0,271	0,114	0,108	0,112	0,112	0,492	0,711	0,151	0,18
D	0,758	4,444	4,438	4,467	0,189	0,202	0,19	0,19	0,842	1,163	0,177	0,102
E	1,469	0,471	0,421	0,333	0,075	0,071	0,072	0,072	1,177	2,125	0,26	0,244
F	2,289	1,588	1,957	2,862	0,082	0,075	0,078	0,078	0,516	0,643	0,095	0,097
G	3,21	0,189	0,161	1,048	0,074	0,078	0,079	0,079	0,101	0,084	0,096	0,092
H	1,595	0,532	0,32	0,291	0,079	0,074	0,074	0,074	0,13	0,081	0,116	0,117

№ штамма		Ячейки	Оптическая плотность			АлфА	АлфА±Δ
			1	2	3		
Candida							
1		A					
2		B					
3		C					
4		D					
5		E					
6		F					
7		G					
8		H					
K	C	Candida	E.coli		S. aureus		Klebsiella

Контрольные вопросы: 1. Что такое антилактоферриновая активность? 2. В чем заключается суть фотометрического метода определения АЛФА? 3. В чем заключается суть работы набора реагентов для определения концентрации лактоферрина? 4. В каких единицах измеряется АЛФА? 5. Как рассчитывают АЛФА?

2.4 Практическое занятие №4 (2 часа).

Тема: «Секретируемые факторы персистенции: антикомплементарная активность».

2.4.1 Цель работы: Изучить метод определения антикомплементарной активности микроорганизмов.

2.4.2 Задачи работы:

1. Научиться рассчитывать антикомплементарную активность микроорганизмов.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри с питательной средой, культуры микроорганизмов, термостат, холодильник, планшеты, бактериальная суспензия, фотометр.

2.4.4 Описание (ход) работы:

Для обнаружения АКА необходимо произвести:

1 день Посев культур на плотную питательную среду

2 день Суточную бульонную культуру засеваем в 3 мл МПБ. Инкубируем взвесь 18-24 часа при 37 °С.

3 день

1. Замеряем оптическую плотность против бульона (СФ 492)

2. Центрифугируем пробы 3000 об/мин – 15 минут

3. Супернатанты храним при 4°С, либо замораживаем. Контроль: 3 мл МПБ

4. 100 мкл супернатанта + 100 мкл комплемента

Инкубируем в планшете 30 мин при 37 °С.

5. 100 мкл из смеси (пункт 4) переносим в 2,7 мл VBS (охлажденного)

6. Замеряем скорость лизиса эритроцитов на спектрофотометре при 800 нм и красном фильтре

(фиксируем максимальное значение, 4-5 минут)

Замер скорости лизиса эритроцитов

Все делаем при 37 °С. На каждые пять проб - 1 контроль. Первый замер – контроль.

Пробу в течение трех минут нагреваем на водяной бане. К опытной или контрольной пробе (2,8 мл) + 200 мкл сенсibilизированных эритроцитов перемешиваем, помещаем в кювету, замер осуществляется против VBS- контроль.

АКА определяем по формуле:

$$АКА = \frac{ОД_k - ОД_{оп}}{ОД_{культуры}} * 60 = X * 10^6 \text{ Анти/лек с.}$$

где $ОД_k$ – оптическая плотность в контроле;

$ОД_{оп}$ – оптическая плотность в опыте;

$ОД_{культуры}$ – оптическая плотность взвеси микроорганизмов.

Работа

Задание: Рассчитать значение антикомплементарной активности для следующих микроорганизмов: *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*.

Значение ОП

	1			2			3			4		
	C. albicans			E.coli			S. aureus			K. pneumoniae		
A	ОД _к	0,39	0,27	ОД _к	0,41	0,30	ОД _к	0,37	0,28	ОД _к	0,36	0,27
B	ОД _к	0,39	0,37	ОД _к	0,40	0,38	ОД _к	0,37	0,35	ОД _к	0,3	0,23
C	ОД _{оп}	0,40	0,39	ОД _{оп}	0,40	0,38	ОД _{оп}	0,37	0,36	ОД _{оп}	0,28	0,21
D	ОД _{оп}	0,42	0,42	ОД _{оп}	0,33	0,28	ОД _{оп}	0,29	0,17	ОД _{оп}	0,29	0,23
E	ОД _{оп}	0,41	0,39	ОД _{оп}	0,41	0,39	ОД _{оп}	0,38	0,36	ОД _{оп}	0,29	0,22
F	ОД _{оп}	0,4	0,38	ОД _{оп}	0,34	0,29	ОД _{оп}	0,32	0,23	ОД _{оп}	0,26	0,18
G	ОД _{оп}	0,41	0,41	ОД _{оп}	0,41	0,40	ОД _{оп}	0,31	0,21	ОД _{оп}	0,27	0,19
H	ОД _{оп}	0,37	0,25	ОД _{оп}	0,41	0,30	ОД _{оп}	0,38	0,26	ОД _{оп}	0,40	0,30

Контрольные вопросы: 1. Что такое антикомплементарная активность? 2. В чем заключается суть метода определения антикомплементарной активности? 3. В каких единицах измеряется антикомплементарная активность? 5. Как рассчитывают АКА?

2.5 Практическое занятие №5 (2 часа).

Тема: «Секретируемые факторы персистенции: IgA-протеазная активность».

2.5.1 Цель работы: Изучить метод определения IgA-протеазной активности микроорганизмов.

2.5.2 Задачи работы:

1. Научиться рассчитывать IgA-протеазную активность микроорганизмов.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри с питательной средой, культуры микроорганизмов, термостат, холодильник, планшеты, бактериальная суспензия, фотометр.

2.6.4 Описание (ход) работы:

IgA-протеазную активность микроорганизмов необходимо определять по методике О.В. Бухарина с соавт. (2004).

В лунки стерильного полистиролового планшета вносили по 20 мкл 1 млрд. взвеси тест-культур микроорганизмов и раствора иммуноглобулина («Иммуноглобулин человека нормальный», Микроген, Россия) в соответствии с требованиями инструкции по работе с реагентами ИФА.

В контрольную пробу, вместо микробной взвеси вносили 20 мкл забуференного физиологического раствора. Через 24 часа инкубации при 37 °С пробы переносили в пластиковые пробирки типа «эппендорф» и центрифугировали 20 минут при 8 тыс. оборотов в минуту, при +5 °С.

Остаточную концентрацию иммуноглобулинов в опытной и контрольной пробах определяли иммуноферментным анализом с использованием набора «IgA общий-ИФА-БЕСТ» (Вектор-БЕСТ, Россия) в соответствии с инструкцией использования данных реагентов.

Измерение оптической плотности опытной и контрольной проб проводили на фотометре STAT FAX 2100 (США) при 492 нм. IgA-протеазную активность рассчитывали по формуле (3):

$$AI_{IgA} = \frac{C_k - C_o}{C_k} \times 100\%, \quad (3)$$

где C_k – концентрация иммуноглобулина в контроле, мкг/мл;

C_o – концентрация иммуноглобулина в опыте, мкг/мл.

Работа

Задание: Рассчитать значение IgA-протеазной активности для следующих микроорганизмов: *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*.

Значение ОП

	1			2			3			4		
	C. albicans			E.coli			S. aureus			K. pneumoniae		
A	Ск	0,39	0,27	Ск	0,41	0,30	Ск	0,37	0,28	Ск	0,36	0,27
B	Со	0,39	0,37	Со	0,40	0,38	Со	0,37	0,35	Со	0,3	0,23
C	Со	0,40	0,39	Со	0,40	0,38	Со	0,37	0,36	Со	0,28	0,21
D	Со	0,42	0,42	Со	0,33	0,28	Со	0,29	0,17	Со	0,29	0,23
E	Со	0,41	0,39	Со	0,41	0,39	Со	0,38	0,36	Со	0,29	0,22
F	Со	0,4	0,38	Со	0,34	0,29	Со	0,32	0,23	Со	0,26	0,18
G	Со	0,41	0,41	Со	0,41	0,40	Со	0,31	0,21	Со	0,27	0,19
H	Со	0,37	0,25	Со	0,41	0,30	Со	0,38	0,26	Со	0,40	0,30

Контрольные вопросы: 1. Что такое IgA-протеазная активность? 2. В чем заключается суть метода определения IgA-протеазной активности? 3. В каких единицах измеряется IgA-протеазная активность? 5. Как рассчитывают IgA-протеазную активность?

2.6 Практическое занятие №6 (2 часа).

Тема: «Факторы патогенности микроорганизмов: структурные компоненты бактериальной клетки»

2.6.1 Цель работы: Изучить структурные компоненты бактериальной клетки, являющиеся факторами патогенности

2.6.2 Задачи работы: Освоить методы изучения капсулы, споры – как факторов патогенности бактериальной клетки.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри с питательной средой, культуры микроорганизмов, термостат, холодильник, бактериальная суспензия, красители, предметные стекла, спиртовки, бактериологические петли.

2.6.4 Описание (ход) работы:

Выявление эндоспор в клетках микроорганизмов

Спорообразующие бактерии широко используются в биотехнологии. Например, с помощью аэробных бактерий рода *Bacillus* получают ферменты, антибиотики, энтомопатогенные препараты и т. д. Анаэробные бактерии рода *Clostridium* используются для получения ацетона, бутанола, масляной кислоты. При этом спорообразующие прокариоты могут быть и вредителями биотехнологических процессов.

Бактериальные эндоспоры— это особый тип покоящихся клеток грамположительных бактерий, формирующихся эндогенно, т. е. внутри цитоплазмы «материнской» клетки, обладающих специфическими структурами (многослойными белковыми покровами, наружной и внутренней мембранами, кортексом) и повышенной устойчивостью к повреждающим факторам внешней среды (к высокой и низкой температурам, обезвоживанию, высокой кислотности среды, радиации, механическим воздействиям).

Поскольку эндоспоры обладают многослойными, труднопроницаемыми для молекул основных красителей оболочками, при простом окрашивании клеток метиленовым синим, фуксином и генциановым фиолетовым, они не окрашиваются и обнаруживаются в окрашенной цитоплазме в виде бесцветных включений. Все имеющиеся специальные способы окраски спор основаны на том, что первоначально сильным красителем с подогреванием красят одновременно клетку и спору, а затем обесцвечивают протоплазму, оставляя спору окрашенной. После этого протоплазму красят дополнительно в другой цвет.

Примером дифференциального способа окраски спор является окраска по методу Ожешки:

1. На высушенный нефиксированный препарат наливают несколько капель 0,5% раствора соляной кислоты и подогревают 1 - 2 минуты над пламенем горелки до закипания, после чего остатки кислоты сливают.
2. Остывший препарат промывают водой.
3. Окрашивают карболовым фуксином Циля (фуксин наливают на фильтровальную бумажку) с подогреванием до появления паров. По мере испарения, краситель периодически подливают.
4. Препарат вновь промывают и обесцвечивают 1% раствором серной кислоты в течение 2 минут.
5. Препарат промывают водой и докрашивают раствором метиленового синего (1:40) в течение 10 - 20 минут.
6. Краситель смывают водой, высушивают. Препараты микроскопируют с иммерсионным объективом.

Наблюдаемая микрокартина: споры, окрашенные фуксином, имеют рубиново-красный цвет, вегетативные тела микробных клеток при докрасивании метиленовым синим - синий цвет.

Выявление капсул микроорганизмов

Клетки многих микроорганизмов, особенно при росте на средах, богатых углеводами, образуют слизистый внешний слой – капсулу. Капсулы разных видов бактерий имеют неодинаковый химический состав и могут состоять из гомо- и гетерополисахаридов, полипептидов, нуклеиновых кислот. Капсула не является обязательным структурным элементом клетки, но может выполнять ряд полезных функций: защищать клетку от неблагоприятных условий (высушивания, ультрафиолетовых лучей, химических агентов), от бактериофагов и простейших. Слизистые покрытия многих бактерий определяют их вирулентность и патогенность, обеспечивают прикрепление к различным поверхностям и связь между соседними клетками. Слизеобразующие бактерии широко используются в биотехнологии. Например, с помощью бактерий *Leuconostoc mesenteroides* и *Leuconostoc dextranicum* получают гомополисахарид декстран, который используется при изготовлении заменителей плазмы крови, различных лекарственных форм, косметических средств, сефадексов и т.д. Фитопатогенные бактерии *Xanthomonas campestris* образуют гетерополисахарид ксантан. Благодаря способности сгущать водные растворы, служить в качестве диспергирующего агента, стабилизировать эмульсии и суспензии он нашел применение в пищевой, фармацевтической, нефтяной, горнодобывающей, текстильной и других областях промышленности.

Капсулы часто имеют консистенцию геля и плохо видны при микроскопировании живых клеток, поэтому для их выявления применяют способ негативного контрастирования с помощью жидкой туши.

Выявление капсул по методу Бури.

На предметное стекло наносят каплю туши, и петлю с исследуемым материалом. Смесь перемешивают тщательно петлей. Второе предметное или покровное стекло ставят на первое под углом 45° и подводят к капле туши до соприкосновения с ней. После того, как тушь растечется по шлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя тушь по всей поверхности стекла тонким слоем (рис.24). Толщина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет одинаковую толщину на всем своем протяжении. Препарат высушивают на воздухе и, не фиксируя, микроскопируют с иммерсионной системой. Фон препарата окрашивается в темно-дымчатый цвет, микробные тела и их капсулы не окрашиваются тушью и остаются бесцветными.

Окраска капсул по методу Гинса.

1. Готовят негативно окрашенный препарат по способу Бурри.
2. Фиксируют любым химическим способом: метиловым спиртом, смесью Никифорова или другими смесями.
3. Промывают водой.
4. Окрашивают карболовым фуксином Циля, введенным 1:3, в течение 3-5 мин.
5. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой.

При микроскопировании на темном фоне препарата контрастно выделяются неокрашенные капсулы, внутри которых находятся бактерии ярко-малинового цвета.

Работа 1.

Задание.

Приготовить фиксированные препараты бактерий рода *Bacillus* и окрасить их метиленовым синим. Промикроскопировать с иммерсионным объективом. Зарисовать.

Работа 2.

Задание.

Приготовить фиксированные препараты спорообразующих бактерий и окрасить их по методу Ожешки. Промикроскопировать с иммерсионным объективом. Зарисовать микропрепарат.

Работа 3.

Задание.

Выявить капсулы бактерий *Azotobacter vinelandii* по методам Бурри и Гинса. Результаты микроскопии оформить в виде рисунка.

Контрольные вопросы: 1. Капсулы: их строение и биологическое значение. 2. Методы выявления капсул бактерий. 3. Споры: их строение и биологическое значение. 4. Методы выявления спор.

2.7 Практическое занятие №7 (2 часа).

Тема: «Факторы патогенности микроорганизмов: секретируемые факторы».

2.7.1 Цель работы: Изучить секретируемые факторы патогенности микроорганизмов

2.7.2 Задачи работы:

1. Научиться определять секретируемые факторы патогенности бактерий (лизоцима, гиалуронидазы, гемолизина, плазмокоагулазы, лецитиназы).

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: чашки петри, кровяной агар, бактериологические петли, спиртовки, культуры микроорганизмов, плазма, пробирки, желточно-солевой агар.

2.7.4 Описание (ход) работы:

Лизоцим (микробный). Для определения лизоцимной активности на поверхность агара с засеянным в него тест-микробом (микрококком) наносится в виде бляшек исследуемая культура. Появление зон лизиса микрококка вокруг культуры свидетельствует о лизоцимной активности микроорганизмов (рис. 3.5 на вклейке).

Гиалуронидаза. Для определения гиалуронидазы в опытную пробирку вносят бульонную исследуемую культуру бактерий, гиалуроновую кислоту, в контрольную — только гиалуроновую кислоту. После 20-минутной инкубации в термостате в обе пробирки добавляют 15 %-ю уксусную кислоту. При наличии у микробов гиалуронидазы

жидкость в опытной пробирке остается гомогенной, при отсутствии — появляется сгусток муцина. В контрольной пробирке сгусток муцина образуется всегда в результате взаимодействия гиалуроновой и уксусной кислот.

Лецитиназа (лецитовителлаза). Выявляется путем посева чистой культуры на чашку с желточно-солевым агаром (ЖСА) штрихом или бляшкой. Чашки инкубируют в термостате при 37 °С в течение суток. При положительном результате вокруг колоний образуется радужный венчик.

Гемолизины. Для выявления гемолизинов делают посев чистой культуры на 3-5 %-й кровяной агар и после суточной инкубации при 37 °С определяют зоны гемолиза вокруг выросших колоний.

Плазмокоагулаза. Выявляется путем посева чистой культуры в цитратную плазму крови. Реакцию ставят в двух узких пробирках. В каждую наливают по 0,5 мл цитратной плазмы. В опытную пробирку вносят петлю агаровой культуры микробов. В контрольную пробирку культура не вносится. Пробирки ставят в термостат при 37 °С на 24 часа. При положительном результате в пробирке с культурой появляется сгусток, в контроле плазма остается жидкой.

Работа

Задание. Ознакомиться с методиками определения факторов патогенности микроорганизмов. Оценить наличие факторов патогенности у культур микроорганизмов. Заполнить таблицу.

	Фактор вирулентности				
	Гиалуронидаза	Лизоцим	Лецитиназа	Гемолизин	Плазмокоагулаза
РИСУНОК С ОБОЗНАЧЕНИЯМИ					
ФУНКЦИЯ ФАКТОРА					

Контрольные вопросы. 1. Дайте определение понятию патогенность? 2. Дайте определение понятию вирулентность? 3. Как измеряется вирулентность? 4. Какую функцию выполняет фермент гиалуронидаза? 5. Какую функцию выполняет фермент лецитовителлаза? 6. Какую функцию выполняет экзотоксин гемолизин? 7. Какую функцию выполняет плазмокоагулаза?

2.8 Практическое занятие №8 (2 часа).

Тема: «Внутриклеточный паразитизм микроорганизмов»

2.8.1 Цель работы: Ознакомиться с механизмами внутриклеточного паразитизма микроорганизмов

2.8.2 Задачи работы: Изучить методы определения микроорганизмов – внутриклеточных паразитов

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
стерильные ватные тампоны, красители, предметные стекла, микроскоп.

2.8.4 Описание (ход) работы:

Бактерионосительство – одна из распространенных форм функционирования биологической системы «паразит-хозяин».

С биологических позиций, бактерионосительство – эволюционно прогрессивная форма симбиоза, определяющая развитие и взаимоадаптацию живых систем (Л.Маргелис, 1983; E.Gotschlich, 1983). В экологическом аспекте бактерионосительство – расширение диапазона расселения патогена со сменой фаз паразитизма и сапрофитизма (Ю.Одум, 1986; Г.П.Сомов, В.Ю.Литвин, 1988). С медицинской точки зрения, бактерионосительство – осуществление цикла развития популяции паразита в популяции хозяина, переход от фазы резервации патогена к фазе эпидемического распространения возбудителя и наоборот (В.Д.Беляков и др., 1987). Все три подхода имеют право на существование, но, естественно, преследуют разные цели.

В патогенетическом плане бактерионосительство – одна из форм инфекционного процесса, при которой наступает динамическое равновесие между микро- и макроорганизмом на фоне отсутствия патологических изменений, но с развитием иммуноморфологических реакций и антительного ответа (О.В.Чахава, Е.М.Горская, 1984).

Для бактерионосительства характерна взаимная адаптация паразита и хозяина в целях симбиоза и возможной персистенции патогена. При этом с одной стороны, происходит селекция биоваров носительских штаммов с комплексом факторов колонизации, персистенции и патогенности, а с другой, имеет место перестройка механизмов защиты хозяина с формированием его иммунокомпрометированного статуса. В конечном счете, создаются условия для персистенции (выживания) возбудителя, что и приводит к бактерионосительству (О.В.Бухарин и др., 1996).

При оценке бактерионосительства как разновидности инфекционного процесса, вероятно, следует опираться на пять стадий, описанных для патогенеза инфекции. По мнению Н.Smith (1984), это прикрепление возбудителя к слизистым оболочкам, пенетрация в клетки хозяина, ингибирование защиты хозяина, рост в тканях и поражение хозяина.

Феномен бактерионосительства как одна из форм паразитизма отражает возможности выживания, сохранения тех паразитов, которые не приводят к гибели своих естественных хозяев. С биологической точки зрения, это, безусловно, прогрессивная эволюция: селекция малопатогенных видов микроорганизма и высокоиммунных видов макроорганизма. Персистирующий возбудитель поддерживает иммунитет против эндогенной инфекции и суперинфекции, в то же время инфекционный иммунитет при

бактерионосительстве направлен на сохранение патогена, а не на его устранение (А.А.Сохин, 1988). Вот почему следует признать, что этот феномен встречается значительно чаще, чем болезнь, и является универсальным явлением в инфекционной патологии (В.Д.Беляков и др., 1987), в основе которого лежит персистенция патогена в организме хозяина. Расшифровка патогенеза этого состояния создает предпосылки для управления механизмами его формирования, а, следовательно, разработки эффективных способов диагностики и осуществления профилактики бактерионосительства.

Классификация бактерионосителей по длительности

- ❖ Постоянные (резидентные) носители – лица, у которых длительно и в значительных количествах выделяются микроорганизмы одного и того же типа
- ❖ Временные (транзиторные) – лица, у которых патогенные стафилококки персистируют временно с последующим полным их исчезновением
- ❖ Лица, свободные от патогенных стафилококков

Критерии диагностики стафилококкового бактерионосительства

- Показатель микробной обсемененности – 10^3 и более микробных клеток на тампон, выделение *S.aureus* на протяжении 30 дней, одного и того же фаготипа
- Показатель внутриклеточного паразитирования – 20% и более эпителиоцитов с микроколониями стафилококка
- Показатель персистенции: Антилизозимная активность (*S. aureus* «+»; *S. epidermidis* более 4 мкг/мл)

Работа

Задание. Провести цитоскопическое исследование на стафилококковое бактерионосительство

Сухим стерильным тампоном со слизистой оболочки переднего отдела носа снимают клетки слущенного эпителия и наносят на предметное стекло. Слизистая оболочка должна быть свободна от секрета, и по ней следует тщательно провести тампоном, вращая его вдоль оси. Микропрепарат готовят путем «перекатывания» тампона на поверхности предметного стекла. Затем препарат фиксируют в этиловом спирте 3 – 4 мин и окрашивают синькой Мансона в течение 1 – 2 секунд, после чего промывают водой и высушивают. Под иммерсией проводят подсчет 10 – 30 эпителиоцитов на обнаружение в них микроколоний стафилококка. Микроколонией называется скопление конгломерата из четырех и более коков внутри клетки. Обследуемый является бактерионосителем при обнаружении 20% и более эпителиоцитов с микроколониями стафилококка

Контрольные вопросы. Дайте определение понятию бактерионосительство? Как классифицируют бактерионосителей по длительности? Назовите критерии диагностики стафилококкового бактерионосительства? Охарактеризуйте механизмы адаптации системы «паразит-хозяин» при бактерионосительстве? Охарактеризуйте этапы формирования бактерионосительства?

2.9 Практическое занятие №9 (2 часа).

Тема: «Диагностическая значимость персистентного потенциала микроорганизмов в санитарной микробиологии, экологии».

2.9.1 Цель работы: Изучить диагностически значимые критерии персистентного потенциала микроорганизмов

2.9.2 Задачи работы: Освоить практическое применение диагностически значимых критериев персистентного потенциала микроорганизмов

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: раздаточный материал.

2.9.4 Описание (ход) работы:

В последнее время клиницисты сумели по достоинству оценить персистентные свойства микроорганизмов для ранней диагностики или прогнозирования как осложнений на фоне основного патологического процесса, так и формирования реконвалесцентного бактерионосительства.

Изучение антилизоцимного теста урофлоры как критерия воспалительного процесса в тубулоинтерстициальной ткани почек показало его пригодность в качестве дополнительного признака при определении характера течения пиелонефрита и для дифференциальной диагностики пиелонефрита и цистита в работах педиатрического профиля.

О. Л. Заикиной (1995) отмечено, что сохраняющаяся в течение длительного времени в период клинико-лабораторной ремиссии антилизоцимная активность возбудителя служит прогностическим признаком формирования латентных форм хронического пиелонефрита у детей. При этом АЛА-тест может быть использован не только для прогнозирования течения пиелонефрита (выявление латентных форм заболевания), но и для отбора больных пиелонефритом в соответствующую группу диспансерного наблюдения. Чем выраженнее персистентные качества урофлоры, тем длительнее течет активная фаза и затягиваются сроки выделения возбудителя, а следовательно, и выход в ремиссию.

Рецидивирующее течение хронического пиелонефрита зависело от выраженности антилизоцимной активности возбудителя, а именно, наиболее частые обострения наблюдались у 38,9 % больных, из мочи которых выделялись возбудители с высокой АЛА, реже — у 33,3 % детей при среднем ее уровне и лишь у 17,9 % больных в группе с низкой антилизоцимной активностью возбудителя.

Выявлена также зависимость частоты формирования стертых малосимптомных форм заболевания от уровня антилизоцимной активности. В группе больных с высокой антилизоцимной активностью в 65,4 % случаев при остром и в 61,1 % при хроническом пиелонефрите формировалось латентное течение заболевания, при котором обострения проявлялись минимальным мочевым синдромом с выделением прежнего высокоантилизоцимного возбудителя.

Таким образом, исследования позволили установить взаимосвязь течения заболевания с уровнем антилизоцимной активности выделенных возбудителей, что в свою

очередь открывает возможность для применения этого теста в качестве прогностического критерия развития хронического рецидивирующего и латентного пиелонефрита.

АЛА возбудителя была использована в прогнозировании течения гонококковой инфекции (Воронина, 1997) у пациентов со свежей и рецидивирования — с хронической гонореей. Выявлены различия в частоте и уровне антилизосимной активности у культур *N. gonorrhoeae*, изолированных от лиц с различными формами и стадиями течения гонококковой инфекции. Из 150 штаммов от больных свежей гонореей этот признак не определялся у 33 культур ($22,0 \pm 3,4$ %), большинство которых (27 штаммов) были изолированы при свежей острой форме. Соответственно в группе *N. gonorrhoeae*, полученных от больных свежей острой гонореей, антилизосимная активность регистрировалась только у $18,2 \pm 6,7$ % культур при минимальном уровне выраженности данного признака — $1,7 \pm 0,2$ мкг. В то же время 107 культур, выделенные у больных свежей подострой и торпидной гонореей, проявляли антилизосимную активность значительно чаще — в 92,3 и 96,9 % соответственно, однако абсолютные значения признака и в этом случае оставались сравнительно невысоки (соответственно $2,3 \pm 0,3$ и $2,7 \pm 0,3$ мкг).

По мнению Л. Г. Ворониной (1997), высокий уровень антилизосимной активности гонококка — прогностически неблагоприятный показатель, позволяющий при свежей гонорее (3-4 мкг) ожидать хронизацию процесса, а в случаях хронической формы инфекции (8-12 мкг) наблюдать упорное течение воспалительного процесса.

В работе С. Б. Фадеева (1998) отчетливо прозвучал прогностический аспект возникновения гнойно-септических осложнений. На больных с острой хирургической инфекцией мягких тканей различной локализации показано, что высокий уровень бактериальной обсемененности очагов хирургической инфекции, видового разнообразия возбудителей и высокие значения их биологических свойств (антибиотикорезистентности, антилизосимной активности и способности к инаktivации бактерицидной активности сыворотки крови) способствуют увеличению продолжительности течения острой хирургической инфекции мягких тканей и возникновению в ходе заболевания гнойно-септических осложнений.

Изучение корреляционной зависимости между клиническими и бактериологическими показателями при гнойно-септической инфекции мягких тканей показало, что уровень антилизосимной активности возбудителей и их способности к инаktivации БАС, а также видовое богатство ассоциаций возбудителей наиболее информативны в плане прогнозирования длительного течения заболевания и возникновения гнойно-септических осложнений (обострения инфекционного процесса), требующих повторного оперативного вмешательства.

Наличие данной зависимости позволило разработать способ прогнозирования неблагоприятного течения гнойно-воспалительных заболеваний микробной этиологии. Способ основан на определении количества различных видов возбудителей, выделенных из очага хирургической инфекции. В случае выявления двух и более возбудителей производят определение у них антилизосимной активности и способности к инаktivации БАС. Количественную оценку данных показателей делают относительно порогов прогнозирования АЛА (для энтеробактерий — 5 мкг и более, для стафилококков — 3 мкг и более, для стрептококков и псевдомонад — 1 мкг и более хотя бы у одного возбудителя) и СИБАС (60 % и более хотя бы для одного возбудителя). В случае выявления двух и более возбудителей с величиной АЛА выше порога прогнозирования хотя бы у одного

возбудителя и уровнем СИБАС ниже прогностического у всех выделенных микроорганизмов прогнозируют длительное течение заболевания без возникновения гнойно-септических осложнений. При определении двух и более возбудителей с уровнем АЛА выше порога прогнозирования хотя бы у одного возбудителя и показателем СИБАС выше прогностического уровня хотя бы у одного возбудителя прогнозируют длительное течение заболевания с возникновением гнойно-септических осложнений. Обнаружение двух и более возбудителей с уровнем АЛА ниже порога прогнозирования у всех возбудителей и уровнем СИБАС выше прогностического хотя бы у одного возбудителя обещает непродолжительное течение заболевания с возникновением гнойно-септических осложнений. При одном или двух возбудителях с уровнями АЛА и СИБАС ниже прогностических у всех возбудителей прогнозируют благоприятное течение заболевания.

Предлагаемый способ прогнозирования позволяет своевременно выявлять больных с потенциально неблагоприятным течением хирургической инфекции, его эффективность составляет 90,6 %.

Достаточно информативным оказался “антиинтерфероновый” признак уропатогенов для прогнозирования вторичных осложнений при пиелонефрите у детей (Зыкова и др., 1990).

Информативным оказался антилизосимный признак у микроорганизмов, выделяемых при хроническом и остром холециститах из стенки желчного пузыря, пузырьной, а при холангите из протоковой желчи (Зак, Швецов, 1990), где повышение уровня антилизосимной активности штаммов сопровождалось обострением процесса.

Пригодной для целей прогнозирования различного рода бактериальных осложнений при заболеваниях хирургического профиля оказалась антикомплементарная активность выделяемых микроорганизмов. Исследование этого признака у кишечных палочек, выделенных от больных холециститом (Брудастов, 1992), выявило корреляционную связь признака с вероятностью возникновения послеоперационных осложнений), на основании чего рекомендовано использовать этот тест для прогнозирования послеоперационных осложнений у больных холециститом в хирургической практике.

Учитывая, что антикомплементарный признак бактерий контролирует их выживаемость в организме, т. е. ответствен за бактериальную персистенцию, и установив связь этого свойства с выживаемостью возбудителя в инфицированных мочевых путях при хроническом пиелонефрите, Ю. А. Брудастов (1992) предложил применять этот диагностический тест персистенции в качестве критерия длительности бактериурии. По мнению автора, использование этого теста персистенции возбудителя, определяющего срок бактериурии, надежно контролирует выживание эшрихий в инфицированных мочевых путях и имеет определенные преимущества по сравнению с рутинными методами.

Достаточно высокая информативность факторов бактериальной персистенции патогенов была отмечена и при постинъекционных абсцессах различной локализации при прогнозировании затяжного течения гнойно-воспалительного процесса (Дерябин и др., 1996; Дерябин, 1997).

Была установлена связь биологических особенностей возбудителя постинъекционного абсцесса (*S. aureus*) с особенностями клинического течения.

Наиболее выраженные и множественные взаимосвязи установлены между плеядой “длительности течения заболевания” и способностью возбудителя к инаktivации ФЕР.

Пролонгирование сроков исчезновения гнойного отделяемого и воспалительного инфильтрата коррелировало с высоким уровнем антикомплементарной активности *S. aureus* и его способностью к инаktivации бактерицидного компонента интерферона и в меньшей степени — со способностью стафилококков к инаktivации иммуноглобулинов путем их Fc-рецепторного связывания белком А. Антилизосимная активность возбудителей ассоциировалась с клиническими проявлениями постинъекционных абсцессов через корреляцию данного признака с “антиинтерфероновой” активностью.

Подводя итог материалам по прогнозированию осложнений инфекционного процесса следует отметить, что факторы персистенции микроорганизмов, контролирующие длительность пребывания возбудителя в организме на уровне фермент-субстратных взаимоотношений в системе “паразит — хозяин”, являются методическим ключом для построения математических моделей прогнозирования этих состояний.

Работа

Задание. Ознакомиться с текстом, проанализировать информацию. Выделить ключевую идею и определить главные положения текста, выстроить связи между ними. Представить собственные идеи в форме графического организатора (кластера), отражающего оригинальный, созданный с творческим воображением продукт мыслительной деятельности.

Кластер называют «схемой размышления». Форма кластера может быть различной: и «гроздь», когда наибольшее развитие получает одна из идей, и равномерное «разбрасывание» идей вокруг темы. По ходу набрасывания идей устанавливаются связи и взаимосвязи между ними. Очень важно при этом выявить как можно больше связей. Кластер дает возможность представить свою схему размышления по теме или проблеме. Кластер можно составлять как в свободном виде, когда набрасываются все возникающие идеи и устанавливаются взаимосвязи между ними (простой кластер), так и усложнить эту процедуру, т.е. выделить сначала категории, а затем располагать предлагаемые идеи по выделенным категориям (сложный кластер).

Контрольные вопросы: Дайте определение терминам: инфекционный процесс, реконвалесцентное бактерионосительство. С помощью каких факторов персистенции прогнозируют течение инфекционного заболевания? Какие заболевания прогнозируют под контролем факторов персистенции?