

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**СЕВЕРО-КАВКАЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ**

**МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ КАФЕДРА «БИОЛОГИЯ»**

Д. А. Алиева  
А. Х. Батчаева  
В. В. Смеянов  
Ф. И. Кипкеева

# **МИКРОБИОЛОГИЯ**

Учебно-методическое пособие  
Курс лекций по микробиологии,  
вирусологии обучающихся 2,3 курса по специальностям  
31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.02 «Педиатрия»  
**Часть 1**

Черкесск2024

УДК 579  
ББК 28.4  
А 50

Рассмотрено на заседании кафедры «Биология»  
Протокол 1 от «28» августа 2023 г.  
Рекомендовано к изданию редакционно-издательским советом СКГА.  
Протокол № 26 от «29» сентября 2023 г.

**Рецензенты:** Леванова Людмила Александровна–д.м.н., доцент,  
заведующий кафедрой «Микробиологии и вирусологии» Кемеровский  
Государственный Медицинский Университет Минздрава России

**А50 Алиева, Д.А.** Микробиология: учебно-методическое пособие. Курс лекций по микробиологии, вирусологии обучающихся 2,3 курса по специальностям 31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.02 «Педиатрия». Часть 1 / А.Х. Батчаева, В.В. Смянов, Ф.И. Кипкеева. – Черкесск: БИЦ СКГА, 2024. – 96 с.

Представлен курс лекций по микробиологии, вирусологии предназначенные для студентов 2,3 курса факультетов «Лечебное дело» и «Педиатрия».

Рассмотрены вопросы морфологии и физиологии микроорганизмов, этиологии, патогенеза, иммунитета, лабораторной диагностики, профилактики и этиотропной терапии основных бактериальных, вирусных и грибковых инфекций, приведены сведения об общих, современных иммунологических методах диагностики инфекционных заболеваний.

Пособие может быть использовано для закрепления материала, изученного в курсе микробиологии, вирусологии.

**УДК 579  
ББК 28.4**

## Содержание

1.	<b>Раздел 1. Общая бактериология</b>	4
2.	Лекция 1. Морфология микроорганизмов. Бактериоскопический метод диагностики	4
3.	Лекция 2. Физиология бактерий. Методы культивирования бактерий. Бактериологический метод диагностики	22
4.	Лекция 3. Генетика микробов	34
5.	<b>Раздел 2. Методы диагностики</b>	41
6.	Лекция 4. Диагностические препараты	41
7.	Лекция 5. Серологический метод лабораторной диагностики	44
8.	Лекция 6. Молекулярно-генетический метод лабораторной диагностики инфекционных заболеваний	50
9.	<b>Раздел 3. Общая вирусология</b>	53
10.	Лекция 7. Общая вирусология	53
11.	<b>Раздел 4. Частная вирусология</b>	66
12.	Лекция 8. Частная вирусология	66
13.	<b>Использованная литература</b>	95

## **Раздел 1. Общая бактериология**

### **Лекция 1. Морфология микроорганизмов. Бактериоскопический метод диагностики**

#### **План лекции:**

1. Предмет и задачи медицинской микробиологии. Мир микробов, распространенность микробов. Связь микробиологии с иммунологией.
2. Оснащение и режим работы бактериологической лаборатории.
3. Стерилизация и дезинфекция.
4. Строение микроскопа.
5. Бактериоскопия.
6. Принципы классификации микроорганизмов.
7. Морфология микроорганизмов.
8. Структура бактериальной клетки.
9. Методы окраски микроорганизмов.
10. Приготовление препарата для микроскопии.

#### **1. Предмет и задачи медицинской микробиологии**

Микробиология – фундаментальная биологическая наука со своими разделами, которые отделились в самостоятельные научные дисциплины со своими целями и задачами: это общая микробиология, промышленная, сельскохозяйственная, ветеринарная, космическая и др. Наибольшее значение для человечества имеет медицинская микробиология, которая занимается изучением биологии болезнетворных микробов и особенностей взаимодействия их с организмами человека. Задачей медицинской микробиологии является выяснение этиологии инфекционных заболеваний, разработка специфических методов их диагностики, профилактики и лечения. Здесь достигнуты большие успехи, благодаря бурному развитию иммунологии, вирусологии, иммуногенетики, целью которой является генопрофилактика и генотерапия иммунодефицитов – ВИЧ-инфекций, онкозаболеваний, аллергий.

Микробы обитают в почве, воде, атмосфере, в организме человека, животных, растений даже в космосе. Видовой состав бактерий более 100 000 видов; грибов – до 250 000 видов. В организме человека обитает до  $10^{13-14}$  только бактерий, составляют его микроэкологию, которые играют большую роль как в обеспечении нормальной его жизнедеятельности, так и в патологии человека. Количество микробов в окружающей среде огромно и влияет на биологические и природные процессы на Земле, особенно на санитарное состояние среды обитания человека. Общая биомасса микробов превышает биомассу растений и животных. Между микробами живой и неживой природой существует взаимосвязь – биогеоценоз – в почве, водоемах, атмосфере, организме человека, животных, растений. Вирусы могут существовать только в клетках человека, животных, растений или в клетках бактерий. Поэтому их подразделяют на вирусы человека, вирусы животных, растений или вирусы бактерий. Такое же подразделение

применимо и к бактериям, грибам и простейшим – одни обитают в организме человека другие в организме животных, третьи – в растениях.

Все живые существа делятся на две большие группы: макромир и микромир. Макромир – растения, животные, насекомые, человек, т.е., организмы видимые невооруженным глазом, микромир – представители живого мира, которые можно увидеть лишь с помощью оптических и др. приборов. Это вирусы, бактерии, грибы, простейшие. Размеры их от 0,01 - 0,4 мкм, или 10-400 нм – 10 мкм и более. Их можно объединить словом – «микробы». Термин ввел французский ученый Седийо в конце XIX-в. К микробам относятся одноклеточные и многоклеточные микроорганизмы, имеющие ядро – эукариоты (от греческого *karyon* – орех, ядро); доядерные микроорганизмы, не имеющие оформленного ядра – прокариоты; сложно устроенные вирусы, представляющие собой комплекс нуклеиновых кислот, белков ферментов, инфекционные макромолекулы ДНК и РНК, инфекционные белки – прионы. Микромир имеет сложный геномный состав. Геном бактерий и грибов включает до 5000 генов, вирусов – до 100 генов, простейших 5000-10 000 генов. Для сравнения геном человека включает 35- 40 тысяч генов.

Патогенных для человека микробов насчитывается 3500 видов, из которых ~ 1000 видов являются вирусами. Человека подвержен примерно 10 000 болезней, на долю инфекционных приходится одна треть всех болезней человека.

«Микробиология – наука о строении, жизнедеятельности и экологии микробов – мельчайших форм жизни, не видимых невооруженным глазом» (А.А. Воробьев и др. 1994,1998г.). Разнообразие мира микробов обусловило дифференциацию науки микробиологии на ряд направлений. Медицинская микробиология изучает микробов (бактерий, грибов, вирусов, простейших), патогенных для человека; ветеринарная микробиология изучает микробов, патогенных для животных, с.-х. микробиология изучает микробов вредителей растений; морская микробиология изучает микробов – обитателей морей, океанов и др. водоемов. В последние годы выделилась и космическая микробиология. Биотехнология использует микробов для получения вакцин, диагностикумов, ферментов, антибиотиков и т.д.

Особенно тесно микробиология связана с иммунологией, которая зародилась в недрах микробиологии. Иммунология решает проблемы профилактики, диагностики и лечения как инфекционных, так и неинфекционных болезней, в основе которых лежат нарушения иммунной системы.

## **История развития микробиологии**

Микробы – одни из древнейших живых существ на планете, появившиеся раньше животных и человека. Патогенные микробы существовали и в древние времена, о чем свидетельствуют останки древних захоронений, мумий. Историю микробиологии можно разбить на пять периодов:

- 1) эвристический
- 2) морфологический
- 3) физиологический
- 4) иммунологический
- 5) молекулярно-генетический

1) Эвристический период III-IV в. до нашей эры, еще Гиппократ высказал догадку (эвристика – догадка, домысел) предположение о том, что болезни, передающиеся от человека к человеку, вызываются какими-то невидимыми, неживыми веществами «миазмами». Еще до открытия микробов люди пользовались плодами деятельности микробов – виноделием, пивоварением, сыроделием выпечкой хлеба и т.д.

В XV-XVI в.в. врач и поэт Джералимо Фракасторо (1476-1553) высказал мнение, что болезни вызываются «живыми контагиями, которые передают болезни через воздух или через предметы, что необходима изоляция больного, уничтожение контагий, окуривание можжевельником и т.д. Фракасторо за его работы считают основоположником эпидемиологии, т.к. он впервые высказал, что болезни человека вызываются невидимыми живыми существами.

2) Морфологический период охватывает конец XVII и XVIII вв., когда голландский естествоиспытатель Антоний ван Левенгук (1632-1723) открыл бактерии с помощью микроскопа, который он сконструировал. Микроскоп давал увеличение в 300 раз. Рассматривал различные настои, налет с зубов, кровь, воду и т.д., Левенгук опубликовал свои данные в труде «Тайны природы, открытые Левенгуком» в 1695 г. Открытие Левенгука положило начало морфологическому периоду в развитии микробиологии. Петр I навестил Левенгука, будучи в Голландии, привез микроскоп в Россию. Первый русским микробиологом был врач Тереховский М.М. (1740-1796). С 1695 г. началось победное шествие микробиологии. Открывались все новые бактерии, грибы, простейшие, а в конце XIX-в., были открыты и вирусы. Данила Самойлович (1724-1810) был следующим выдающимся эпидемиологом, который работал с возбудителями чумы, заразил себя чумой. Были и другие выдающиеся исследователи (Мечников И.И., Заболотный Д.К., Гамалея Н.Ф., Чумаков М.П. и др.), которые участвовали в опытах по самозаражению возбудителями инфекционных болезней. В 1892 г. русский ботаник Ивановский Д.И. открыл вирусы. В 1992 г. отмечалось 100 лет со дня открытия вирусов. За последние 20-30 лет открыто около трех десятков новых или измененных вариантов уже известных микробов. Это т.н. эмерджентная группа, т.е. опасных непредсказуемых инфекций. Это вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусы геморрагических лихорадок (Марбург, Эбола, Ласса и др.), патогенные бактерии, вызывающие болезнь

легионеров, лихорадку Лайма, Корона - вирусы, вызывающие атипичную пневмонию и др. Многие бактерии и вирусы в результате генетических трансформаций приобрели новые свойства, стали патогенными для человека (вирус оспы обезьян, хеликобактер пилори, вызывающий язвы желудка и двенадцатиперстной кишки и др.), получили распространение парентеральные гепатиты, туберкулез, хламидиоз. Некоторые микробы исчезли – натуральная оспа, ставится задача ликвидации полиомиелита и др. возбудителей. В будущем человека ожидают новые или измененные возбудители инфекционных болезней – вирусов Т-клеточного лейкоза, вирусов гепатита, хламидий, прионов, онковирусов и др.

3) Физиологический период начался с XIX-в. и продолжается до наших дней. Выдающуюся роль сыграли труды Луи Пастера (1822-1895), химик по образованию, организатор науки, сделал во многих отраслях науки основополагающие открытия.

Л Пастер открыл: а) природу брожения, б) анаэробноз, в) основал принципы стерилизации, г) разработал принципы вакцинации и способы получения вакцин (вакцина против бешенства и др.). Немецкий бактериолог Р.Кох (1843-1910) разработал способ получения чистых культур, ввел в практику твердые питательные среды, окраску бактерий, микрофотосъемку, а также знаменитую триаду, получившую название триада Генля-Коха, по установлению этиологии роли микробов в инфекционном заболевании. Для этого необходимы три условия:

1. чтобы микроб обнаруживался у больного
2. получение чистой культуры микроба
3. микроб должен вызвать аналогичное заболевание у животных при заражении.

Но не всегда болезнь укладывается в эту триаду (ВИЧ-инфекции).

4) Иммунологический период. В конце XIX-в. и начале XXв. микробиология переживала взлет. В этот период работали выдающие ученые: Пастер, Мечников, Кох, Ру Эрлих и многие другие в институте Пастера, показав всему миру пример искреннего сотрудничества, несмотря на разные взгляды на проблемы. Иммунологический период в микробиологии начался со второй половины XIX-в. Еще 200 лет назад английский врач Эдуард Дженнер (1749-1823) нашел способ создания невосприимчивости к натуральной оспе человека путем прививки человеку вируса коровьей оспы, человек не заболел. Это было величайшее открытие, но носило эмпирический характер. И только Л. Пастер в конце XIX-в. научно обосновал принцип вакцинации и способ получения вакцин, показав, что ослабленный различными способами (температурными воздействиями, неблагоприятными условиями для роста, пассажи через невосприимчивый организм) возбудитель холеры кур, бешенства, сибирской язвы, потерявший вирулентные патогенные свойства при введении в организм создает специфическую невосприимчивость к возбудителю. Пастер впервые получил из мозга кроликов больных бешенством собак путем многочисленных пассажей живую аттенуированную вакцину против бешенства, создал прививочные пункты;

распространил способ вакцинации на многие страны. В России пастеровские прививочные станции были созданы в Одессе в 1886 г. и Перми Мечниковым И.И. и его учеником Гамалеей Н.Ф.

В 1886 г благодарное человечество, за сделанные великим французом открытия, на собранные средства, построило в Париже Пастеровский институт, успешно продолжающий работать и в наши дни. Забегая вперед, в 1983г. Люкс Монтанье открыл вирус иммунодефицита человека одновременно с американским ученым Робертом Галло.

В Пастеровском институте работали выдающиеся ученые. И.И. Мечников (26 лет был заместителем Пастера), Э. Ру, А. Кальметт и К. Герен (создал вакцину БЦЖ), А. Лаверан (открыл плазмодии малярии), А.М. Безредка (предложил метод десенсибилизации – уменьшение или устранение повышенной чувствительности – сенсibilизации), Ж. Борде (иммуно – химик), Г. Рамон (получение анатоксинов), Н.Ф. Гамалея (по вакцинации), С.Н. Виноградский (почвенная микробиология). Особо остановлюсь на И.И. Мечникове. Он внес огромный вклад в развитие иммунологии, обосновав учение о фагоцитозе и фагоцитах, доказал, что фагоцитоз – универсальное явление для живых, заложив фундамент теории клеточного иммунитета и процесса иммуногенеза в целом с учетом клеточных и гуморальных факторов. Оппонентом Мечникова был П.Эрлих – автор гуморального иммунитета, полагавший, что только антитела играют роль в процессе иммунитета. Мечников и Эрлих оба удостоены Нобелевской премии в 1908 г. И.И. Мечников, будучи разносторонним ученым, внес вклад в развитие геронтологии, учения о дисбактериозах. В середине XX-в. были открыты основные формы реагирования иммунной системы и основные факторы иммунитета.

Еще в 1900 г Р.Кох открыл гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ), в 1902-1905 г.г. Ш. Рише, Ж. Портье, Г.П. Сахаров – гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ). В 1950-х годах П. Медовари М. Гашек – открыли толерантность (устойчивость) к антигенам, а Ф. Бернет – иммунологическую память. В середине XX-в. многочисленные исследования были посвящены изучению лимфоцитов, их роли в иммунитете, кооперативным взаимодействиям между Т- и В- лимфоцитами и фагоцитирующими клетками, киллерной функции лимфоцитов и т.д. Была изучена структура иммуноглобулинов, открыты интерфероны (А. Айзекс и Ж. Линдеман), интерлейкины и другие иммуномодуляторы.

5) Молекулярно–генетический период. Развитие биологической науки во второй половине XX-в. дало новый толчок к развитию микробиологии и иммунологии, особенно молекулярных и генетических аспектов этих наук. Была расшифрована молекулярная структура многих бактерий и вирусов, строение и состав их генома, структура антигенов и антител, факторов патогенности бактерий и вирусов, факторов иммунной защиты (комплемент, интерфероны, иммуномодуляторы и др.). достигнуты большие успехи в изучении иммунокомпетентных клеток (Т – и В – лимфоцитов, фагоцитов), механизмов функционирования и взаимодействия между собой и другими факторами иммунной защиты, явления апоптоза лимфоцитов, учение о

стволовых, дендритных клетках и т.д. Расшифровка генов бактерий и вирусов, их синтез позволили искусственно синтезировать рекомбинантные ДНК и получать на их основе с помощью генной инженерии рекомбинантные штаммы бактерий и вирусов, которые нашли широкое применение в биотехнологии для получения различных биологических антибактериальных веществ (интерферонов, интерлейкинов, антигенов, антител, гормонов, лекарств и др.), вакцин. На повестке дня – иммуногенетика, целью которой является генопрофилактика и генотерапия иммунодефицитов, онкозаболеваний. Широко применяется в микробиологии генодиагностика (ПЦР-полимеразная цепная реакция), достигнуты заметные успехи в изучении системы гистосовместимости для решения проблемы преодоления иммунологической несовместимости в трансплантологии.

### **Вклад отечественных ученых в развитие микробиологии и иммунологии**

О многих выдающихся ученых, внесших мировой вклад в развитие микробиологии и иммунологии я уже говорила. Это Мечников И.И. и его ученики: А.М. Безредка, Н.Ф. Гамалея, Л.А. Тарасевич, Н.Г. Габричевский, С.Н. Виноградский, Д.И. Ивановский. Отечественными учеными созданы многие диагностические, профилактические и лечебные иммунобиологические препараты применяемые во всем мире: (это живые вакцины против сибирской язвы, туляремии, полиомиелита, кори, Кулиховрадки, гриппа и др.), а также полианатоксины, вакцины пероральные для массовых способов иммунизации, всего у нас производится до 1000 иммунобиологических препаратов. Ученые, к которым человечество питает благодарность за все это: М.П. Чумаков, Н.Н. Гинзбург, В.Д. Тимаков, Л.А. Зильбер и многие другие, о которых мы вспомним в соответствующих разделах курса.

Зачем врачу нужны знания по микробиологии и иммунологии?

Микробиология и иммунология проникают во все медицинские дисциплины: хирургию, терапию, онкологию, нервные болезни, урологию, эндокринологию, инфекционные болезни и т.д. Почти во всех специальностях используются микробиологические и иммунологические методы для диагностики, лечения и профилактики инфекционных и неинфекционных болезней. Любой врач и медицинский работник должны знать основы микробиологии и иммунологии. Только инфекционные болезни составляют 70% всех болезней человека, так что делайте вывод, будущие врачи.

### **Оснащение и режим работы бактериологической лаборатории**

Микробиологическая лаборатория включает следующие помещения:

- 1) препараторскую для подготовки лабораторной посуды, приготовления питательных сред и др. вспомогательных работ;
- 2) моечную;
- 3) автоклавную, в которой стерилизуют питательные среды и

лабораторную посуду; 4) комнату для взятия материала от больных и носителей; 5) комнаты для микроскопических и микробиологических исследований с 1 или 2 боксами;

б) помещения для обеззараживания отработанных материалов. Для биологических проб отдельные помещения – виварии для животных.

Для посева материала, заражения тканевых культур, эмбрионов используют специальные помещения – боксы, которые до и после работы обрабатывают дезинфицирующими растворами и облучают бактерицидными лампами.

Основное оборудование бактериологической лаборатории: приборы для различных видов микроскопии, нагревательные приборы (газовые и спиртовые горелки, электропечи и др.), холодильники, термостаты, аппараты для стерилизации (стерилизатор – автоклав, печь Пастера, свертыватель и др.), центрифуга, дистиллятор и др., автоматические пипетки или пипетки с резиновой грушей, бактериологические петли, препаровальные иглы, пинцеты и др.

## **Стерилизация и дезинфекция**

**Стерилизация** – обеспложивание, т.е. полное уничтожение вегетативных и споровых форм микроорганизмов в различных материалах. Проводят физическими методами: 1) воздействие высокой  $t$ ; 2) ультрафиолетовым облучением; 3) механически – фильтрованием жидкостей через бактериальные фильтры, а также химическими методами.

### **Физические методы стерилизации**

**1. Прокаливание в пламени спиртовки или газовой горелки.** Для стерилизации бактериологических петель, препаровальных игл, пинцетов.

**2. Стерилизация кипячением.** Стерилизуют шприцы, мелкий хирургический инструмент, предметные и покровные стекла и др. В воду добавляют 1-2% бикарбоната натрия, кипятят не менее 30 мин. Данный метод не обеспечивает полной стерилизации, т.к. некоторые вирусы (н., вирус гепатита) и споры бактерий могут остаться жизнеспособными.

**3. Стерилизация сухим жаром в сушильном шкафу (печи Пастера).** При  $t$  165-180<sup>0</sup>С стерилизуют стеклянную посуду: чашки Петри, пробирки, пипетки и др. При более высокой  $t$  ° обугливаются ватные пробки и бумага, в которую завернута посуда.

**4. Стерилизация паром под давлением в автоклаве.** Стерилизуют питательные среды, перевязочный материал, белье при давлении 1 атм. В течение 15-20 мин, питательные среды с углеводами – при 0.5 атм в течение 15 мин; обеззараживание инфицированного материала проводят при 1,5-2 атм в течение 20-25 мин.

**5. Стерилизация текучим паром в аппарате Коха или в автоклаве.** Применяется для стерилизации питательных сред с витаминами, углеводами, погибают вегетативные клетки. Для полного обеспложивания применяют дробную стерилизацию, т.е. стерилизуют материал при 100<sup>0</sup>С (или 80-90<sup>0</sup>С) в

течение 20-30 мин. 3 дня подряд. Вегетативные клетки погибают, а споры сохраняются и за сутки прорастают. Двукратное прогревание обеспечивает надежную стерильность материала.

**6. Тиндализация.** Дробная стерилизация при 56-58°C в течение часа 5-6 дней подряд; применяется для легко разрушающихся при высокой t веществ (сыворотка крови, витамины и др.).

**7. Пастеризация.** Нагревание материала производится при t 50-65°C в течение 15-30 мин или 70-80°C в течение 5-10 мин с последующим быстрым охлаждением. Погибают вегетативные клетки. Пастеризуют напитки и пищевые продукты (молоко, вино, пиво, соки и др.).

**8. Стерилизация УФ – лучами.** УФ – лучи длиной волны 260-300 нм используют для стерилизации воздуха в операционных, боксах, детских учреждениях и др.

**9. Стерилизация ионизирующим излучением.** («холодная стерилизация») – наиболее перспективный способ стерилизации. Стерилизацию проводят в товарной упаковке. Установка представляет собой бетонную камеру с толстыми стенами для защиты персонала от излучения. Этим способом стерилизуют хирургический инструментарий, изделия из пластмасс (шприцы), вакцины, лечебные сыворотки, лекарства.

**10. Фильтрование.** Для стерилизации жидкостей используют фильтры из коллодия, диаметр пор которых меньше размеров вирусов. Этот метод применяют в биотехнологии при изготовлении вакцин, иммунных сывороток, растворов антибиотиков, бактериофагов и других материалов, не пригодных для тепловых или других методов стерилизации. Фильтрование через бактериальные фильтры (асбестовые, целлюлозные) не является в строгом смысле стерилизующим, т.к. через их поры могут проходить вирусы и фильтрующиеся формы бактерий.

### **Химические методы стерилизации**

Стерилизация растворами химических средств, является вспомогательным для изделий, которые нельзя стерилизовать др. методами. Пример: 6% р-р  $H_2O_2$  в течение 6 часов для полимерных материалов; 4,8% р-р первомура (для лигатурного шовного материала) в течение 15 мин. Изделия полностью погружаются в р-р, затем все манипуляции проводятся с соблюдением асептики. Если изделия используются не сразу, хранят их в условиях стерильности (не более 3 суток).

### **Дезинфицирующие вещества:**

Хлорсодержащие препараты (хлорная известь, хлорамин и др.)  
Окислители ( $H_2O_2$ ,  $KMnO_4$ );

Фенолы (карболовая кислота, лизол); Йод и йодофоры;

Соли тяжелых металлов (сулема, диоцид);

ПАВ – поверхностно активные вещества (сульфанол); Четвертичные аммониевые соединения;

Спирты (70% этанол); Формальдегид (формалин);

Красители (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий); Кислоты (борная, салициловая и др.);

Альдегиды (глутаровый).

Выбор метода дезинфекции определяется устойчивостью конкретных микроорганизмов, контаминировавших объект, а также свойствами самого объекта. Выделяют 5 групп возбудителей инфекций: вирусных, бактериальных, туберкулеза, кандидоза, дерматомикозов по устойчивости к действию дезинфицирующих средств. От этого зависит выбор вещества, его концентрация и время экспозиции.

**Газовая стерилизация.** Применяется для обработки оптики, сложной техники (кардиостимуляторов, аппаратов искусственного кровообращения), изделий из полимеров, металла, стекла. Используют окись этилена (окись этилена с бромистым калием), озон, пары раствора формальдегида в этиловом спирте, которыми наполняют стационарные газовые стерилизаторы или портативные анаэроостаты. Ведут контроль стерилизации (с помощью биотестов).

**Дезинфекция** – это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение в объектах окружающей среды патогенных микробов. Используют физические и химические методы дезинфекции.

Физические методы: 1) механические (вытряхивание, проветривание, влажная уборка, стирка); 2) действие высокой  $t$  (глажение, кипячение, пастеризация); 3) УФО (облучение бактерицидными лампами).

От дезинфекции следует отличать асептику и антисептику.

**Асептика** – это система профилактических мероприятий, направленных на предотвращение попадания микроорганизмов в рану, лекарственные препараты, питательные среды и др. объекты. Она включает стерилизацию материалов, обработку рук, использование стерильных халатов, масок, перчаток, исключение разговоров, влажную уборку с дезинфицирующими средствами и др.

**Антисептика** – это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микробов, попавших в рану, лекарственный препарат или др. объект. Различают антисептику:

1. механическую (удаление из раны инфицированных и некротизированных тканей);
2. физическую (наложение повязок, использование сухого тепла, УФО, лазера и т.д.);
3. химическую (применяют химические в-ва, бактерицидные и бактериостатические);
4. биологическую (применяют антибиотики, бактериофаги, иммуноглобулины, средства, стимулирующие защитные силы организма).

### **Строение микроскопа**

Микроскоп состоит из механической (подсобной) и оптической (главной) частей.

Механическая часть – это штатив, предметный столик и тубус (труба). Штатив в виде подковы имеет колонкутубусодержатель в форме дуги.

Для регуляции положения тубуса есть макровинт для предварительной ориентировочной установки изображения объекта и микровинт для четкой

установки на фокус.

Предметный столик – служит для размещения на нем препарата; столик вращается во взаимно перпендикулярных плоскостях с помощью винтов. Для закрепления препарата имеются клеммы – зажимы; в центре столика круглое отверстие для освещения препарата снизу.

Тубус (труба) – оправа, в которой заключены элементы оптической системы микроскопа. В нижней части тубуса объективодержатель – револьвер с гнездами для объективов, в верхней части – окуляры.

Оптическая часть микроскопа состоит из объектива и окуляра и вспомогательной осветительной системы – зеркала и конденсора.

Зеркало и конденсор располагаются под предметным столиком.

Зеркало отражает падающий на него свет в конденсор.

Конденсор, состоящий из 2-3 короткофокусных линз, собирает лучи, идущие от зеркала, и направляет их на объект. Линзы конденсора вмонтированы в металлическую оправу и перемещаются вверх и вниз специальным винтом. Интенсивность освещения регулируется ирисовой (лепестковой) диафрагмой, состоящей из стальных пластинок. Конденсор необходим при работе, прежде всего с иммерсионной системой.

Объектив – наиболее важная часть микроскопа, от него зависит изображение объекта. В гнездах револьвера располагаются объективы с обозначениями на их оправе величины увеличения объекта (8х, 40х, 90х).

Исследование препарата начинают с малого увеличения (8х), затем меняют объектив на 40х или 90х.

Объективы рассчитаны на работу с покровным стеклом толщиной  $0,17 \pm 0,1$  мм.

Окуляр служит непосредственным продолжением «линз» (хрусталиков) глаз человека.

Окуляр состоит из двух линз – верхней и нижней, заключенных в металлическую оправу. Нижняя линза собирает лучи, идущие от объектива, и они проходят через маленькое отверстие глазной линзы.

Назначение окуляра – прямое мнимое увеличение изображения, которое дает объектив.

Увеличение окуляра выгравировано на его оправе. Рабочее увеличение в пределах от 4х до 15х. окуляры бывают разных типов. Бинокулярные насадки более удобны в работе.

Кратность увеличения объекта определяется умножением показателя объектива на увеличение окуляра.

### **Бактериоскопия**

Для микробиологической диагностики инфекций используют различные методы:

Бактериоскопические – изучают возбудителя по морфологическим признакам в нативных или окрашенных препаратах;

Бактериологические – предполагают культивирование возбудителя, изучение его культуральных и физиологических свойств, выделение чистой культуры, идентификацию и типирование возбудителя;

Биологические – изучают особенности взаимодействия микроба с экспериментальными животными;

Серологические – основаны на изучении антигенных свойств возбудителя и реакций макроорганизма на эти антигены (серологическая и аллергологическая диагностика; антигенная идентификация микроорганизмов или их компонентов);

Молекулярно – генетические – обнаружение фрагментов генома возбудителя при помощи молекулярной гибридизации ДНК или РНК и ПЦР.

Метод бактериоскопического исследования приобретает особое значение, если микроб имеет морфологические и тинкториальные особенности или особую локализацию в тканях, клетках организма. Иногда бывает достаточно морфологического исследования для диагностики. Но для большинства инфекций микроскопия имеет лишь ориентировочное значение.

Применяются не только обычные методы оптической микроскопии в проходящем свете, но и специальные: в темном поле зрения, фазово – контрастная, люминесцентная и электронная.

**Световая микроскопия.** Световой микроскоп имеет сухой и иммерсионный объективы. Сухой объектив применяется для изучения относительно крупных биологических объектов. При изучении микроорганизмов используют иммерсионный «погружной» объектив (увеличение 60х – 100х). В качестве иммерсии используют масло-кедровое, персиковое, «иммерсиол» и др., в которое погружают объектив. Разрешающая способность иммерсионного объектива около 0,2 мкм. Максимальное увеличение 2000х-3000х.

**Микроскопия в темном поле зрения.** Используется для обнаружения в неокрашенных (нативных) препаратах возбудителей сифилиса, лептоспироза, возвратного тифа и др. болезней, а также для изучения подвижности микроорганизмов. Используют сухой объектив (40х).

**Фазово-контрастная микроскопия.** Помогает выявить детали структуры живых микроорганизмов, влияние на них различных факторов (в-в, антибиотиков и др.).

**Люминесцентная микроскопия.** Люминесценция или флюоресценция

– способность некоторых объектов и красителей при попадании ультрафиолетовых или других коротковолнистых лучей света испускать лучи видимой части спектра (зеленые, желтые, оранжевые). Препараты готовят обычным способом, фиксируют 5 – 10 мин. в этаноле или ацетоне и наносят на 20-30 мин. флюорохром, промывают, накрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Преимущества люминесцентной микроскопии: цветное изображение, контрастность, обнаружение бактерий, вирусов и их антигенов и др.

**Электронная микроскопия.** Вместо света используется поток электронов – источник электронная пушка. Вместо линз – электромагниты. Электронные микроскопы дают возможность видеть частицы величиной

0,2-2,0 нм (вирусы), исследовать срезы тканей, клеток, микроорганизмов, полученных с помощью ультрамикротомы.

### **Принципы классификации микроорганизмов**

Микробы, как и все другие организмы, систематизированы по их сходству, различиям и взаимоотношениями между собой. Раздел систематики, изучающий принципы классификации, называется таксономией (от греческого *taxis* – расположение, порядок). В основу таксономии микроорганизмов положены их морфологические, физиологические, биохимические и молекулярно-биологические свойства. Различают таксономические категории: царство, подцарство, отдел, класс, порядок, семейство, род, вид, подвид и др.

В категории выделяют таксоны – группы организмов, объединенные по определенным свойствам. Название микроорганизмов регламентируется Международным кодексом номенклатуры (зоологической, ботанической номенклатуры бактерий, вирусов). К Царству прокариот относят бактерии; к Царству *vira* – вирусы. Грибы и простейшие являются эукариотами. Основная таксономическая категория – вид (*spesies*). Вид – это совокупность особей, объединенных по близким свойствам, но отличающихся от других представителей рода. Совокупность однородных микроорганизмов, выделенных на питательной среде, характеризующихся сходными морфологическими, тинкториальными, культуральными, биохимическими и антигенными свойствами называется чистой культурой. Чистая культура микроорганизмов, выделенных из разных источников, объектов, и отличающихся от других представителей вида, называется штаммом: (например, кишечная палочка, выделенная из разных объектов). Штамм – более узкое понятие, чем вид или подвид. К штамму более близко понятие клона. Клон – это совокупность потомков, выращенных из одной клетки. Совокупности микроорганизмов могут отличаться по тем или иным свойствам, тогда употребляется суффикс *var* - (разновидность) – морфовары (отличаются морфологически), резистентовары – (отличаются по устойчивости к антибиотикам), серовары – (отличие по антигенам), фаговары

– (отличие по чувствительности к бактериофагам), биовары – (отличие по биологическим свойствам), хемовары – (отличие по биохимическим свойствам), и т.д.

Для бактерий применяют таксономические категории: тип, класс, порядок, семейство, род, вид. Название вида соответствует бинарной номенклатуре, т.е., состоит из двух слов, например, возбудитель сифилиса *Treponema pallidum*, первое слово – название рода, пишется с прописной буквы, второе слово обозначает вид – пишется со строчной буквы. При повторном написании вида родовое название сокращается до начальной буквы, например, *T* – *pallidum*. Бактерии относятся к прокариотам, т.е., доядерным организмам, у них примитивное ядро без оболочки, ядрышка, гистонов, органелл (митохондрий, аппарата Гольджи, лизосом и др.).

Согласно 2-му изданию (2001 г) Определителя Берджи, бактерии делятся на два домена («империи»): «*Bacteria*» (эубактерии) и «*Archaea*» (архебактерии).

Архебактерии – одна из древних форм жизни, не содержат пептидогликанов в клеточной стенке, имеют особые рибосомы и рибосомы РНК (р РНК), среди них нет возбудителей инфекционных болезней.

В домене «*Bacteria*» следующие бактерии:

1. грациликуты – бактерии с тонкой клеточной стенкой (гр-)
2. фирмикуты – бактерии с толстой клеточной стенкой (гр+)
3. тенерикуты – бактерии без клеточной стенки - микоплазмы – *Mollicutes*

### **Морфология микробов**

(бактерий, риккетсий, хламидий, микоплазм, актиномицетов, нокардий).

Основные формы бактерий – кокковидные, палочковидные, извитые и ветвящиеся. Кокковидные бактерии (кокки) – шаровидные клетки размером 0,5-1,0 мкм, которые в зависимости от расположения делятся на микрококки, диплококки, стрептококки, тетракокки, сарцины и стафилококки.

Микрококки – отдельно расположенные клетки.

Диплококки – парные кокки (пневмококк, гонококк, менингококк), после деления не расходятся.

Стрептококки – (от греческого *streptos* – цепочка) – клетки округлой или вытянутой формы, клетки после деления не расходятся, образуя цепочки.

Сарцины – (от лат. *sarcina* – связка, тюк) располагаются в виде пакетов из 8 кокков и более, образуя при делении клетки в трех взаимноперпендикулярных плоскостях.

Стафилококки – (от греческого *staphyl* – виноградная кисть) – кокки располагаются в виде грозди винограда в результате деления в разных плоскостях.

Палочковидные бактерии (палочки) – различаются по размерам, форме концов клетки и взаимному расположению клеток. Длина клеток 1,0-8,0 мкм, толщина 0,5-2,0 мкм.

Правильной формы (кишечная палочка) и неправильной формы (коринебактерии), ветвящиеся (актиномицеты). Очень мелкие палочки – риккетсии. Концы палочек – обрезанные (сибиреязвенная бацилла), закругленные (кишечная палочка), заостренные (фузобактерии), утолщенные похожие на булаву (коринебактерии дифтерии). Слегка изогнутые палочки называются вибрионами (холерный вибрион), имеют один изгиб. Большинство палочковидных бактерий располагаются беспорядочно, т.к. после деления расходятся. Клетки после деления могут не расходиться, тогда они располагаются под углом друг к другу (коринебактерии дифтерии) или образуют цепочку (сибиреязвенная бацилла). К этой группе могут относиться и вибрионы.

Извитые формы – спиралевидные бактерии, спираиллы, штопоровидные извитые клетки. Представитель: возбудитель содоку (болезнь укуса крысы); кампилобактерии и хеликобактерии с изгибами как у крыла летящей чайки, (число завитков от 2-3).

К извитым бактериям относятся и спирохеты. Спирохеты – тонкие, длинные, извитые спиралевидной формы бактерии, подвижные. Число завитков (до 12 и более). Примеры: возбудитель сифилиса, в полости рта возбудитель кариеса, возбудитель лептоспироза.

Риккетсии – мелкие гр(-) палочковидные бактерии размером 0,35-2,0 мкм, облигатные внутриклеточные паразиты. У человека риккетсии вызывают сыпной тиф (*Rickettsia prowazekii*).

Хламидии – облигатные внутриклеточные кокковидные гр(-) бактерии.

У человека хламидии вызывают трахому, орнитоз, пневмонию и др.

Микоплазмы – мелкие бактерии без клеточной стенки, окружены ЦПМ. Патогенные микоплазмы вызывают хронические инфекции (*Mycoplasma pneumoniae*).

Актиномицеты – ветвящиеся гр(+) бактерии (от греч. *actis* – луч, *mykes* – гриб) – лучистые грибы. Образуют в пораженных тканях друзы из переплетенных нитей в виде лучей от центра и заканчиваются колбовидными утолщениями. Актиномицеты подобно грибам образуют мицелий – переплетающиеся нити. На субстрате образуют воздушный мицелий. Актиномицеты могут делиться путем фрагментации мицелия на палочковидные или сферические клетки. На воздушных гифах образуют споры, которые размножаются.

Нокардии – относятся к актиномицетам (нокардиоподобные), но менее дифференцированы. Воздушный мицелий у них отсутствует или развит слабо, способны септироваться на палочковидные фрагменты, переходящие в дальнейшем в палочки, чаще в кокки.

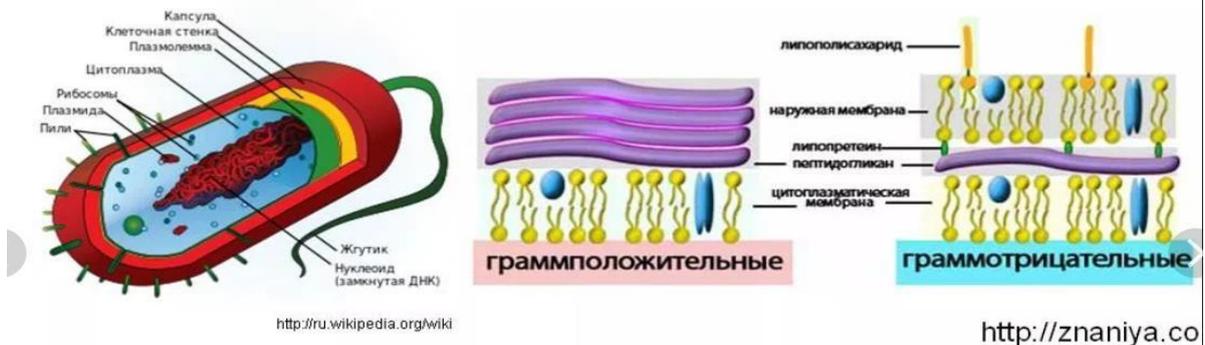
### **Структура бактериальной клетки**

Бактериальная клетка состоит из клеточной стенки, ЦПМ, цитоплазмы включениями и нуклеоида.

Клеточная стенка придает форму бактериальной клетке, вместе с ЦПМ сдерживает высокое осмотическое давление в клетке, участвует в делении и транспорте метаболитов. Толщина стенки гр (-) бактерий 15-20нм, гр(+) – 50нм и более. В клеточной стенке гр (+)бактерий содержится небольшое количество полисахаридов, белков, липидов. (Рис. 1).

# Прокариотическая клетка

## Строение клеточной стенки



- Клеточные стенки бактерий состоят из пептидогликана и бывают двух типов: грамположительного и грамотрицательного.
- У грамотрицательных бактерий слой пептидогликана существенно тоньше, а снаружи клетка окружена еще одной мембраной

Рисунок 1–Строение бактериальной клетки

Основной компонент клеточной стенки гр (+) бактерий полимер пептидогликан (муреин), составляет 40-90% массы клеточной стенки, а также тейхоевые кислоты (от греч. *teichos* – стенка). Гр(-) бактерии содержат меньше пептидогликана (5-10% массы кл. стенки). При окраске бактерий по Граму гр(+) бактерий окрашиваются в сине-фиолетовый цвет; это связано со способностью многослойного пептидогликана взаимодействовать с красителем генциановым фиолетовым и удерживать краску. Гр (-) бактерии неспособны удерживать краситель генциановый фиолетовый из-за меньшего количества пептидогликана, поэтому они окрашивается в цвет дополнительной краски - фуксина – красный. В состав клеточной стенки (гр-) бактерий входит наружная мембрана, основным компонентом этих мембран служит бимолекулярный (двойной)слой липидов. С внешней стороны наружной мембраны расположен липополисахарид ЛПС, с которым связаны представления об О-антигене, по которому дифференцируют бактерий (при изменении биосинтеза компонентов ЛПС появляются R-формы колоний). R-колонии шероховатые и неровные, в отличие от «гладких» S-форм колоний. При нарушении синтеза клеточной стенки бактерий под влиянием лизоцима, пенициллина, защитных факторов организма и др. соединений образуются клетки с измененной, часто шаровидной формой: протопласты – полностью лишённые клеточной стенки; сферопласты – с частично сохранившейся клеточной стенкой. После устранения ингибитора измененные клетки могут реверсировать, т.е. восстанавливают полноценную клеточную стенку и исходную форму. Сферопласты и протопласты, утратившие способность к синтезу пептидогликана под влиянием ингибиторов (антибиотики и др. факторы) и способные размножаться, называются L-формами (от названия института имени Листера). L-формы могут возникнуть и в результате мутаций. L-формы образуют многие патогенные микробы.

Цитоплазматическая мембрана, окружающая наружную часть цитоплазмы бактерий, представляет собой четырехслойную мембрану, состоит из двойного слоя фосфолипидов, пронизанного белками. Часть белков – пермеазы – участвующие в транспорте веществ ЦПМ – мобильная структура, регулирует осмотическое давление, участвует в транспорте веществ и энергетическом метаболизме клетки (за счет ферментов).

При избыточном росте (по сравнению с ростом клеточной стенки), ЦПМ образует инвагинаты (впячивания) – мезосомы. Менее закрученные структуры ЦПМ называются внутрицитоплазматическими мембранами. Эти структуры являются энергетическими центрами клетки.

**Цитоплазма** занимает основной объем клетки и состоит из белков, рибонуклеиновых кислот, включений и рибосом, ответственных за синтез (трансляцию) белков, размер их 20нм и коэффициент седиментации 70 S в отличие от 80 S – рибосом эукариотов. Поэтому некоторые антибиотики, связываясь с рибосомами бактерий, подавляют синтез бактериального белка, не влияя на синтез белка эукариотов. Рибосомы бактерий диссоциируют на 50 S и 30 S. В цитоплазме имеются различные включения – гликоген, полисахариды, полифосфаты (волютин) – запасные вещества. У дифтерийной палочки характерное расположение зерен волютина по полюсам клетки.

**Нуклеоид** – эквивалентен ядра у бактерий, расположен в центре клетки в виде двунитевой цепочки ДНК, замкнутой в кольцо – не имеет ядерной оболочки, ядрышка и гистонов (белки). В бактериальной клетке обычно одна хромосома, представленная замкнутой в кольцо молекулой ДНК. Кроме нуклеоида, представленного одной хромосомой, имеются внехромосомные факторы наследственности – плазмиды, представляющие замкнутые кольца ДНК.

**Капсула** слизистая структура, связанная с клеточной стенкой, обнаруживается чаще из патологического материала, в чистых культурах – реже. Состоит из полисахаридов, иногда из полипептидов (*Bac. anthracis*); она гидрофильна и препятствует фагоцитозу бактерий. Многие бактерии образуют микрокапсулу. От капсулы следует отличать слизь из мукоидов.

**Жгутики** – органы передвижения, представляют собой тонкие длинные нити, длиннее самой бактериальной клетки. Длина их 3-12 мкм, толщина – 12-20 нм. Бактерия с одним жгутиком – монотрих, с пучком жгутиков на одном конце – лофотрих, если на обоих концах – амфитрих, по всему периметру – перитрих. Жгутики состоят из белка – флагеллина, обладают антигенной специфичностью.

**Ворсинки**, или пили ( фимбрии) – более короткие и тонкие, состоят из белка пилина, обладают антигенной активностью, адгезивными свойствами, т.е. способностью закрепляться на пораженной клетке; половые (F- пили) или конъюгационные пили.

**Споры** – образуются в покоящихся клетках, в неблагоприятных условиях, способствуют сохранению вида. Аэробные бактерий, образующие споры, у которых размер споры не превышает диаметр клетки, называют – бациллами. Спорообразующие анаэробные клетки, у которых размер споры превышает диаметр клетки, называются – клостридиями (от лат. clostridium – веретено). Спорообразование, форма и расположение спор в клетке (вегетативной) являются видовым признаком бактерий. По форме – овальные, шаровидные, по расположению в клетке – терминальное, т.е. на конце палочки (возбудитель столбняка), субтерминальное – ближе к концу палочки (возбудитель ботулизма, газовой гангрены) и центральное (сибиреязвенная бацилла). Стадии прорастания споры: активация, инициация, вырастание. Из 1-ой споры образуется 1-бактерия. Активация – готовность к прорастанию при  $t$  60-80<sup>0</sup>С. Инициация прорастания – несколько минут, стадия вырастания – быстрый рост, оболочка разрушается и выходит проросток. (Рис. 2).

### Споруляция бактерии

#### Расположение спор у бактерий.

##### ■ центральное



##### ■ субтерминальное



##### ■ терминальное



#### Стадии споруляции

1. Подготовительная стадия
2. Стадия предспоры
3. появление оболочки
4. Стадия созревания

Рисунок 2– Расположение спор

#### Методы окраски микроорганизмов

Препараты микроорганизмов окрашивают красителями. Окраска бактерий – сложный физико – химический процесс. Отношение микроорганизмов к красителям называют тинкториальным свойством.

**Простые методы окраски** позволяют определить наличие бактерий в препарате, их форму, размеры, взаиморасположение.

Наиболее широко применяются следующие красители: красные (фуксин основной, фуксин кислый, конго красный, сафранин нейтральный красный); синие (метиленовый синий); фиолетовые (генциановый); желтокоричневые (везувин, хризоидин).

**Простые методы окраски.** Фиксированный мазок окрашивают каким

– либо одним красителем, например, фуксином водным (1-2 мин) или метиленовым синим (3-5 мин), промывают водой, высушивают и микроскопируют.

**Сложные методы окраски.** Используют несколько красителей. К ним относят окраску по Граму, Цилю – Нильсену, Нейссеру, Романовскому – Гимзе и др. Дифференцирующий метод, используемый для классификации бактерий – метод окраски по Граму. Все бактерии подразделяются на гр (+) и гр (-), это облегчает диагностику и выбор средств антимикробной терапии. Все болезнетворные кокки, кроме гонококка и менингококка, являются гр (+); вибрионы, трепонемы, кампилобактеры и энтеробактерии – гр (-), все патогенные бациллы и клостридии – гр (+).

### **Другие методы сложной окраски**

**Окраска по Романовскому – Гимзе.** Препараты из исследуемого материала (кровь, гной, тканевая жидкость и др.), культуры клеток окрашиваются красителем Р. – Г., состоящим из метиленового синего, эозина и азура. цитоплазма простейших окрашивается в голубой цвет, ядра – в красный; элементы крови: эритроциты в розовый, ядра лейкоцитов – в фиолетовый, цитоплазма – в голубой, базофильная зернистость – в синий, эозинофильная – в красный, нейтрофильная – в сиреневый.

**Окраска по Цилю – Нильсену.** Для кислотоустойчивых микробактерий (возбудит. туберкулеза, лекры, микобактериозов), актиномицетов и др. Используют две краски – фуксин и метиленовый синий. Кислотно-устойчивые окрашиваются в красный цвет, неустойчивые – в сине-голубой цвет.

**Окраска спор по методу Ожешко** (в основе метод Циля - Нильсена). Препараты протравливают кислотой, затем окрашивают. Споры окрашиваются в красный цвет, вегетативные клетки – в синий.

**Окраска по методу Нейссера.** Зерна волютина окрашиваются в темно синий цвет, цитоплазма – в желтый цвет.

**Окраска по методу Бури – Гинса.** Используются две краски – черная тушь и фуксин. Капсула не окрашивается, образуется ореол вокруг красной клетки. По методу Бури используют тушь. На темном фоне неокрашенные капсулы.

**Окраска по Морозову методом серебрения.** Метод применяется для выявления путем импрегнации серебром спирохет, вирусов и микроструктур бактерий (жгутиков, включений).

## **7. Приготовление препарата для микроскопии**

Для световой микроскопии микроорганизмов готовят препараты – мазки из культуры бактерий, выращенных на плотной и жидкой питательной среде, из исследуемого материала – гноя, мокроты, крови, препараты – отпечатки из внутренних органов, мяса. Соответствующим образом для

каждого случая приготовленные препараты высушивают, фиксируют, окрашивают и микроскопируют с иммерсионной системой.

Изучение микроорганизмов в живом состоянии используют для определения их подвижности, т.е. жгутиков. Препараты готовят методами раздавленной или висячей капли и микроскопируют с сухим или иммерсионным объективом. Более четкие результаты получают при микроскопировании в темном поле им фазово-контрастной микроскопии.

### **Контрольные вопросы к лекции**

1. Оснащение бактериологической лаборатории
2. Стерилизация и дезинфекция. Физические и химические методы стерилизации. Асептика и антисептика
3. Бактериоскопия
4. Принципы классификации микроорганизмов
5. Морфология микроорганизмов
6. Структура бактериальной клетки
7. Методы окраски микроорганизмов
8. Приготовление препарата для микроскопии.

## **Лекция 2. Физиология бактерий. Методы культивирования бактерий. Бактериологический метод диагностики**

### **План лекции**

1. Питательные среды, классификация и требования, предъявляемые к ним.
2. Материалы для бактериологического исследования и правила его забора.
3. Выделение и идентификация чистой культуры бактерий. Принципы культивирования аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных бактерий.
4. Факторы агрессии.
5. Методы определения чувствительности к лекарственным препаратам.
6. Применение антибиотиков.

### **1. Питательные среды, классификация и требования, предъявляемые к ним**

Бактериологическое исследование основано на культивировании бактерий на питательных средах, выделении чистой культуры возбудителя и ее идентификации.

Бактерии нуждаются в питательных веществах: источниках С, N, витаминах, минеральных и других веществах. Питание бактерий осуществляется через всю ее поверхность. Автотрофы используют CO<sub>2</sub> и другие неорганические соединения. Гетеротрофы – питаются за счет готовых

органических соединений. Сапрофиты питаются остатками отмерших организмов. Патогенные и условно-патогенные бактерии являются гетерохемоорганотрофами, питаются по законам осмоса.

Питательные среды готовят из продуктов животного или растительного происхождения в зависимости от потребностей группы бактерий.

Питательные среды должны отвечать следующим требованиям:

а) содержать основные питательные вещества в легкоусвояемой форме;

б) иметь опр. рН и окисл.-восстан.(ред-окс)потенциал;

в) обладать буферными свойствами; г) быть влажными;

д) быть стерильными; е) быть прозрачными.

Среды различают: по консистенции (жидкие, полужидкие, плотные); по составу (простые, сложные); по назначению (основные, накопительные, селективные, дифференциально-диагностические, специальные, обогащенные, для хранения, консервирующие, транспортные), среды для анаэробов.

Основные среды: Мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), простые по составу для культивирования, большинства бактерий. Содержат: пептон, мясной экстракт, хлорид натрия. Для получения плотных сред к жидким добавляют агар-агар (2-3%) или желатин (10-15%).

Сложные среды включают дополнительные компоненты к простым: кровь, гемин, сыворотку, асцитическую жидкость и др. Это обогащенные среды.

Селективные (элективные) среды – для избирательного культивирования определенных следов бактерий при подавлении роста других.

Дифференциально-диагностические среды используют для дифференциации бактерий по их биохимической активности и др. признакам. (среды Эндо, Гиса, Левина, Рассела, Клигера и др.). Часто являются плотными, полужидкими.

Транспортные и консервирующие среды – для временного сохранения микроорганизмов после взятия исследуемого материала и при транспортировке его в лабораторию. Должны быть буферными, содержат соли.

Среды для хранения культур должны длительно поддерживать жизнеспособность микроорганизмов без изменения свойств культур.

## **2. Материал для бактериологического исследования и правила его забора**

При взятии материала для бактериологического исследования учитывать следующее:

а) брать материал из очага инфекции или соответствующее отделяемое (гной, мочу, желчь); при отсутствии локальных очагов – кровь;

б) брать материал до начала антибактериальной терапии или через определенное время после выведения препарата из организма;

в) брать материал во время наибольшего содержания возбудителя (например в начале озноба);

- г) соблюдать правила асептики;
- д) отбор материала производить стерильно;
- е) в случае выделения строгих анаэробов материал получают путем пункции шприцем, из которого удален воздух, при исследовании тканей берут из глубины очага;
- ж) кол-во материала должно быть достаточным (учитывать повторения);
- з) доставку материала осуществляют в короткие сроки в специальных биксах, пеналах и т.д.; если нет такой возможности – хранят в холодильнике;
- и) при транспортировке анаэробов материал защищают от воздействия воздуха; материал можно транспортировать в шприце, на кончик которого надета стерильная резиновая пробка;
- к) прилагается сопроводительный документ (материал, Ф.И.О., название учреждения, номер истории болезни, предполагаемый диагноз, предшествующая антимикробная терапия, дата, время взятия образца, подпись врача, направляющего материал).

### **3. Выделение и идентификация чистой культуры бактерий. Принципы культивирования аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных бактерий**

**а) Аэробные и факультативно-анаэробные бактерии.** На I этапе из исследуемого материала готовят мазки, микроскопируют их, сеют материал на плотную среду в чашки Петри шпателем или бактериологической петлей. Получается рост в виде изолированных колоний. Иногда исследуемый материал сеют в жидкую накопительную среду, а затем пересевают на плотную в чашки Петри. Чашки с посевами инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup>С 18-24ч.

На II этапе изучают культуральные свойства бактерий (характер роста на питательной среде).

Макроскопическое изучение колоний. Если колонии разные, их нумеруют и описывают каждую в отдельности выделяя свойства: величину колоний (крупным > 4 мм, средние 2-4 мм, мелкие – 1-2 мм, карликовые – менее 1мм); форму колоний (округлые, резюидная, розеткообразная и др.); степень прозрачности (непрозрачная, полупрозрачная, прозрачная); цвет колоний; поверхность (гладкая, блестящая, сухая, матовая, морщинистая); рельеф (выпуклые, погруженные в среду, плоские, с валиком по краю, с куполообразным центром и т.д.).

Микроскопическое изучение колоний. Чашку устанавливают вверх дном на столике микроскопа и при объективе 8х изучают колонии, фиксируя в протоколе их структуру (гомогенная, аморфная, волокнистая и др.) и характер краев (ровные, зубчатые, бахромчатые и др.).

Из части колоний готовят мазки, окрашивают по Грамму и микроскопируют. При наличии однородных бактерий остаток колоний пересевают на скошенный агар для получения в достаточном количестве чистой культуры. Выращивают при 37<sup>0</sup>С 18-24 часа.

На III этапе из выросшей на скошенном агаре культуры делают мазки, окрашивают по Граму. О чистоте культуры судят по однородности роста, формы, размера и окраски бактерий. Для идентификации выделенной чистой культуры, кроме морфологических, тинкториальных и культуральных особенностей микроорганизмов, необходимо определить их ферментативные и антигенные свойства, фагочувствительность и бактериочувствительность, токсигенность и другие признаки их видовой специфичности.

Ставят тест ОФ (тест окисления / ферментации). Культуру засевают уколом в две пробирки с полужидкой средой, содержащей глюкозу и бромтимоловый синий; в одну вносят вазелиновое масло (для создания анаэробноза) и инкубируют обе пробирки при 37<sup>0</sup>С. При образовании кислоты среда в обеих пробирках желтеет, что свидетельствует о ферментативной реакции. Образование кислоты в пробирке без масла свидетельствует об окислении глюкозы. Отсутствие кислоты в обеих пробирках свидетельствует о том, что тестируемые микроорганизмы относятся к «неферментирующим» видам.

Для выявления нитратредуктазы ставят тест на восстановление нитрата в нитрит. Для определения каталазы используют 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (наливают на поверхность культуры на скошенном агаре; при положительной реакции появляются пузырьки).

Для выявления ферментов, расщепляющих глюкозу, используют диф.-диагн. среды Гиса. При ферментации углеводов с образованием кислоты цвет среды меняется за счет индикатора, что создает впечатление пестроты («пестрый» ряд). В зависимости от рода и вида бактерий подбирают среды с моносахарами и дисахарами (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза и др.), полисахаридами (крахмал, гликоген, инулин и др.), высшими спиртами (глицерин, маннит и др.), в процессе ферментации которых образуются альдегиды, кислоты, газы (СО<sub>2</sub>, Н<sub>2</sub>, СН<sub>4</sub>).

Протеолитические ферменты обнаруживают при посеве в столбик с желатином и через несколько дней выдержки при комнатной t (20-22<sup>0</sup>С) определяют наличие разжижения, его характер (послойно, в виде гвоздя, елочки и т.д.).

Показателем более глубокого расщепления белков является образование индола, аммиака, H<sub>2</sub>S и др. соединений.

Биохимические св-ва бактерий изучают с помощью специальных микротестсистем и микробиологических анализаторов (пластины с лунками, содержащими высушенные дифференциально – диагностические среды). При внесении испытуемой суспензии чистой культуры среда в лунках восстанавливается. При использовании анализаторов многие процессы автоматизированы (учет, посев, изменение мутности и цвета среды в лунке), (встроен спектрофотометр).

Антигенные свойства выделенной культуры изучают с помощью реакции агглютинации РА.

Вирулентность определяют путем выявления факторов патогенности, заражения экспериментальных животных, культур ткани или на

экспериментальных моделях.

Определяют чувствительность к антимикробным средствам высевом на жидкие и плотные среды.

В отдельных случаях для выделения чистой культуры применяется биологическая проба (чума, сибирская язва, туляремия).

Видовую принадлежность аэробных бактерий определяют путем сравнения морфологических, культуральных, биохимических, антигенных и других свойств выделенной культуры со свойствами бактерий известных видов и вариантов.

На IV этапе проводят учет результатов, анализ их и дают ответ по результатам посевов.

### **б) Анаэробные бактерии**

Основное требование при культивировании анаэробных бактерий – создание анаэробной атмосферы, удаление  $O_2$  из питательной среды и снижение ее редокс – потенциала. Создают эти условия следующими методами:

применением спец. сред с редуцирующими веществами (среда Китта – Тароцци с кусочками печеночной ткани);

связыванием или замещением  $O_2$  в герметически закрытых сосудах: эксикаторах, анаэроstats, специальных пластиковых мешках;

изоляция анаэробов в питательной среде от воздействия атм.  $O_2$  (посев высоким столбиком в пробирку, заливка вазелинового масла на поверхность питат. среды, метод Перетца и др);

использованием специальных анаэробных боксов;

метод Фортнера – совместное выращивание аэробных и анаэробных бактерий.

На I этапе производят посев материала в среду Китта – Тароцци (концентрированный МПБ или бульон Хоттингера – Мартена, с кусочками печени или фарша), посеvy заливают вазелиновым маслом и инкубируют.

На II этапе отмечают изменения в среде накопления (помутнение, газообразование). Готовят мазки, окрашивают по Грамму, делают пересев из среды накопления на специальные плотные среды для анаэробов. Получают изолированные колонии (метод Цейслера – посев на чашки с кровавым агаром) или метод последовательных разведений Вейнберга).

На III этапе изучают выросшие изолированные колонии и из типичных делают мазки. Остатки колоний высевают на среду Китта – Тароцци, инкубируют при  $37^{\circ}C$ .

На IV этапе выросшую на среде Китта – Тароцци и культуру проверяют на чистоту и идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим, антигенным и др. свойствам. Иногда для идентификации выделенных культур (или прямого обнаружения анаэробов в исследуемом материале) определяют газожидкостной хроматографией характерные метаболиты анаэробного «дыхания» - летучие жирные кислоты.

На V этапе учитывают результаты исследования и анализируют их.

## **Факторы агрессии**

Под факторами агрессии понимают приспособительные механизмы возбудителей инфекционных болезней к условиям макроорганизма. Для существования в макроорганизме микробы должны обладать адгезией, колонизацией, инвазивностью и агрессивностью, вызывать повреждения тканей и органов.

Инфекционный процесс начинается с адгезии и колонизации. Адгезия обуславливает чувствительность хозяина к микробу и органотропность микробов. За прилипание к клеткам хозяина ответственны структуры микроба – адгезины. У гр (-) бактерий функцию адгезинов выполняют фимбрии (пили 1 или общего типа), а также основные белки наружной мембраны. У гр (+) бактерий адгезины представляют собой белки и тейхоевые кислоты клеточной стенки; у микоплазм – макромолекулы выростов цитоплазматической мембраны. Колонизация зависит от дозы микробов и количества рецепторов на поверхности клеток макроорганизма. Если нет адгезинов и рецепторов, инфекционный процесс не развивается.

Инвазивность – способность микробов проникать через кожные покровы и слизистые оболочки в организм хозяина и распространяться в нем. Агрессивность – способность противостоять защитным факторам организма и размножаться в нем, благодаря ферментам агрессии и инвазии.

К ним относятся:

- **гиалуронидаза** – фермент, разрушает гиалуриновую кислоту - основное межклеточное вещество соединительной ткани, помогая микробам проникнуть в глубь тканей макроорганизма;

- **нейраминидаза** (сиалидаза) – фермент, расщепляет нейраминовою (сиаловую) кислоту на поверхностных рецепторах клеток слизистых оболочек, делая их доступными микробам и их токсинам;

- **фибринолизин** – фермент, растворяет сгусток фибрина, образующийся в процессе воспаления и препятствующий проникновению микробов в органы и ткани;

- **коллагеназа** – фермент, разрушает коллаген мышечных волокон, расплавляет мышечные ткани;

- **лецитиназа С** – фермент, действует на лецитин мембран мышечных волокон, эритроцитов и др. клеток;

- **коагулаза** – фермент, свертывает плазму крови;

- **ДНК –аза** – дезоксирибонуклеаза – фермент, деполимеризует ДНК;

- **протеазы** – ферменты, разрушают белки – иммуноглобулины.

Данные ферменты, расщепляя высокомолекулярные соединения на низкомолекулярные, выполняют трофическую функцию, истощают макроорганизм. Жгутики бактерий также способствуют проникновению микробов в макроорганизм.

Попав в макроорганизм, микробы, размножаясь, должны противостоять фагоцитозу.

Клетки, фагоцитирующие микробы, могут мигрировать, способствуя распространению микробов по организму. Антифагоцитарной активностью обладают капсульные полисахариды и полипептиды микробов, К- и Vi-

антигены микрокапсул энтеробактерий и др. структуры, которые создают механический барьер фагоцитозу. Антифагоцитарные свойства микробов проявляются также в синтезе ими веществ, подавляющих фагоцитоз, а также антигенная мимикрия, т.е. сходство антигенных детерминант у микроба и организма хозяина, когда микроб не распознается иммунной системой как чужеродный и остается в организме, а также способность микробов в процессе размножения в организме изменять свою антигенную структуру и «уходить» от действия специфических факторов иммунной системы.

Наиболее важная роль в развитии инфекционного процесса принадлежит токсинам, экзотоксинам и эндотоксинам.

**Экзотоксины** – белки бифункциональные – имеют транспортную группу, взаимодействующую со специфическим рецептором клеток, и токсическую группу (активатор), которая проникает внутрь клетки и блокирует жизненно важные процессы.

Есть бактерии (*Clostridium botulinum*), которые образуют протоксины – нетоксичные, но под действием протеолитических ферментов превращаются в токсичную бифункциональную структуру.

**Экзотоксины по степени связи с бактериальной клеткой делятся на 3 класса:**

**Класс А** – токсины, секретируемые во внешнюю среду (н., *Corynebacterium diphtheriae* продуцирует гистотоксин, *Bac. Anthracis* – отечный и летальный токсины).

**Класс В** – токсины, частично секретируемые и частично связанные с бактериальной клеткой ( н., тетаноспазмин *Clostridium tetani*, нейротоксин *Clostridium botulinum*).

**Класс С** - токсины, связанные с микробной клеткой и попадающие в окружающую среду при аутолизе клетки ( н., цито-, энтеро-, нейро- и нефротоксины *Shigella dysenteriae*).

По механизму действия белковые токсины делят на 5 групп:

- 1) повреждающие клеточные мембраны;
- 2) ингибирующие синтез белка;
- 3) активирующие метаболизм;
- 4) протеазы;
- 5) суперантигены – активизирующие иммунный ответ макроорганизма. Экзотоксины термолabile.

Если микроб остается в месте входных ворот инфекции, такие инфекции называются токсинемическими (дифтерия, столбняк, ботулизм, газовая анаэробная инфекция). Клинические проявления связаны с действием белкового токсина. Для лечения применяют анатоксины и антитоксические сыворотки.

Эндотоксины имеются только у гр (-) бактерий, представлены белково-липополисахаридным ЛПС комплексом клеточной стенки, выделяются в окружающую среду при лизисе бактерий. Термостабильны, неспецифичны, оказывают воспалительное и пирогенное действия, индуцируют синтез биологически активных веществ (более 20), обуславливающие нарушения в различных органах и тканях. Обладают антигенными свойствами, повышая неспецифичную резистентность организма (активизируют синтез интерферона, систему комплемента – обладают свойствами адьювантов).

## Методы определения чувствительности к лекарственным препаратам

### а) Определение фаготочувствительности.

Для определения видовой и родовой принадлежности бактерий используют чувствительность фагов к бактериям как один из признаков для их идентификации. Для этого чашки Петри с плотной питательной средой засевают газоном исследуемую культуру, посев подсушивают и на его поверхность наносят петлей или пастеровской пипеткой капли фага определенного разведения. Ставят в термостат на 12-18 часов. Литическое действие фага учитывают по появлению прозрачных «негативных» пятен, что позволяет исследуемые бактерии отнести к соответствующему виду или роду. (Рис. 3).

Определение фаговаров бактерий. Проводится для эпидемиологического анализа и установление источников инфекции (при кишечных, стафилококковых, дифтерийных и других инфекциях).



Рисунок 3– Фаготипирование

Чашки с МПА расчерчивают с обратной стороны на квадраты по количеству фагов и маркируют. Чашку засевают 3-4 часовой бульонной культурой бактерий газоном, подсушивают, на каждый квадрат наносят копию соответствующего фага в тест – разведении и инкубируют в термостате 12-18 часов. Учитывают чувствительность бактерий к определенному фагу по литическому действию. Это фаготипирование.

Определение титра бактериофага. Количество фаговых частиц в исследуемом материале определяют методом агаровых пластинок по Грациа. Присутствие бактериофагов в материале является косвенным показателем наличия соответствующих бактерий. Чашку с агаром засевают смесью разведенного фага и индикаторных бактерий в расплавленном агаре. Негативные колонии фага соответствуют количеству фаговых частиц.

Таким образом бактериофаги применяют в лабораторной диагностике для идентификации бактерий с целью выявления источника инфекции (эпидемиологическое маркирование).

Кроме диагностических бактериофагов, имеются лечебно – профилактические, применяемые для лечения и профилактики заболеваний (дизентерия, холера и др.).

### **б) Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.**

Для определения чувствительности культур возбудителей к антимикробным препаратам применяют диско – диффузионный метод, метод серийных разведений, метод Е-тестов, пограничных концентраций и др.

Часто используют резистограмму штаммов – по их устойчивости / чувствительности к химиопрепаратам для оценки идентичности штаммов, выделенных из разных источников.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и др. ХТП (химиотерапевтическим препаратам) необходимо определять в каждом случае инфекции – в начале болезни и периодически – в ходе лечения. Наиболее обширную группу составляют противобактериальные антибиотики.

Главным показателем чувствительности является минимально ингибирующая концентрация – МИК (минимально ингибирующая концентрация) мкг/мл, т.е. концентрация антибиотика, задерживающая рост микроба – возбудителя в стандартном опыте.

Микроорганизм считается чувствительным, если есть хороший терапевтический эффект.

Устойчивым, если возбудитель имеет механизмы резистентности к данному антибиотику и нет клинического эффекта при лечении даже максимальными фазами. Микроорганизм умеренно устойчивый, если по своей чувствительности занимает промежуточное положение между чувствительными и устойчивыми штаммами и хороший эффект достигается при использовании высоких доз препарата.

Метод серийных разведений – МИК определяют по минимальной концентрации антибиотика, задерживающей рост, содержащих убывающие концентрации антибиотика.

Диско – диффузионный метод.

Чистую культуру возбудителя засевают «газоном» на питательный агар стандартизированной суспензией. Затем на поверхность агара укладывают

стандартные бумажные диски, пропитанные антибиотиками ( на чашку диаметром 90 мм – 6 дисков). По диаметру зоны определяют степень чувствительности к антибиотику: чувствительны S, умеренно-устойчивые J и устойчивые R. Для S – достаточно трехкратного превышения МИК; для J – максимальные дозы, для R - данный антибиотик неэффективен. ( Рис. 4).

► **Определение чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом.**



Рисунок 4– Диско-диффузионный метод чувствительности к антибиотикам

Метод E – тестов – используют бумажные полосы, пропитанные рядом убывающих концентраций определенного антибиотика (128, 64, 32, 16...мк/мл), укладывают на поверхности питательного агара, заселенного культурой в виде «газона». Зона задержки роста сужается в области малых концентраций и пересекает полосу на уровне МИК . ( Рис. 5).

Определение чувствительности микроорганизма с помощью Е-теста проводится аналогично тестированию диско-диффузионным методом. Отличие состоит в том, что вместо диска с антибиотиком используют полоску Е-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной. В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

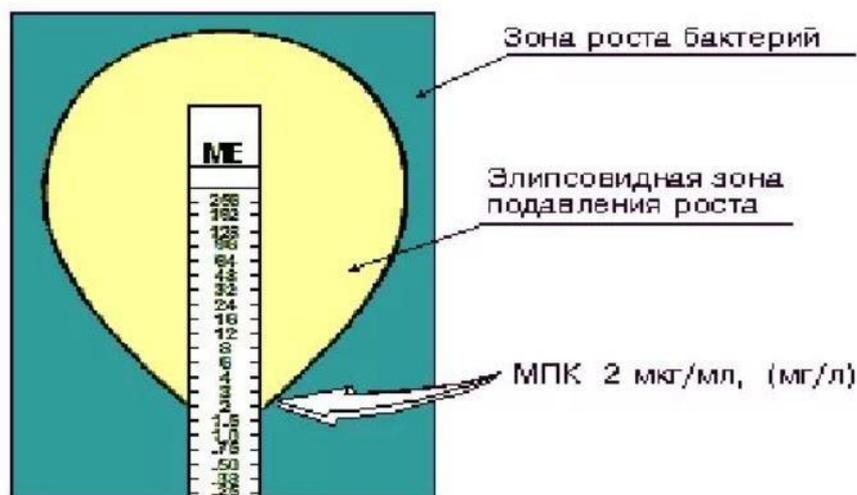


Рисунок 5–Метод Е-тестов

При массовых исследованиях используют автоматизированные методы определения чувствительности к антибиотикам (чаще – методы серийных разведений в планетах и пограничных концентраций – микрометоды).

### Применение антибиотиков

Химиотерапевтические средства – антибиотики – действуют на микробы, известны также противоопухолевые антибиотики, синтетические химиопрепараты – действуют на микробы и вирусы.

Основоположник химиотерапии немецкий ученый П.Эрлих, лауреат Нобелевской премии (НП), получил первый химиотерапевтический препарат против сифилиса «Сальварсал», соединение мышьяка безвредное для макроорганизма.

Другой выдающийся английский ученый А.Флеминг открыл пенициллин в 1928г., который продуцирует гриб *p.Penicillium*. Очищенный пенициллин был получен в 1940 г., Г.Флори и Э.Чейн. В 1945 г. А.Флеминг, Э.Чейн и Г.Флори получили НП. У нас в стране антибиотиками занимались З.В. Ермольева и Г.Ф.Гаузе, ими получены ряд антибиотиков.

Основными продуцентами антибиотиков являются микроорганизмы. Антибиотики для них – средство борьбы за существование в себе подобными.

**Различают 6 групп антибиотиков в зависимости от происхождения:**

1–антибиотики, полученные из грибов *p.Penicillium*, *p.Cephalosporium* и др.

2- антибиотики, полученные из актиномицетов; представители р.

*Streptomyces* являются продуцентами стрептомицина, левомицина, эритромицина, нистатина и др. 80% антибиотиков получено из актиномицетов.

- 3 - антибиотики бактериального происхождения, р. *Bacillus* и р. *Pseudomonas*;
- 4 – антибиотики животного происхождения;
- 5 – антибиотики растительного происхождения (фитонциды чеснока и лука)
- 6 синтетические антибиотики.

### **3 способа получения антибиотиков:**

1) Биологический синтез – используют штаммы микроорганизмов, продуцирующие наибольшее количество антибиотика, и специальные питательные среды.

2) Химический синтез – получены все синтетические антибиотики этим способом.

3) Комбинированный способ – сочетает биологические и химические синтезы. Антибиотики, полученные этим способом, называются полусинтетическими, они более экономичны, к ним более длительное время чувствительны микроорганизмы, устойчивы к природным антибиотикам.

Побочное действие антимикробных препаратов в том, что они действуют как на микроорганизмы, так и на макроорганизмы:

а). Осложнения антибиотикотерапии со стороны макроорганизма: I группа –осложнений – токсические реакции (поражения печени, почек, крови);

II группа – вызывает дисбиозы (макроорганизм становится более чувствительным к инфекциям);

III группа – отрицательно воздействует на иммунитет (возникают аллергические реакции; анафилактический шок; иммунодепрессивное действие – подавляются синтез антител, фагоцитоз).

б). Изменения микроорганизмов, вызванные антибиотиками, могут нежелательны для человека изменения самих микроорганизмов:

I – появление атипичных форм образоваться L – формы бактерий – такие микробы трудно идентифицировать, а следовательно, сложно поставить диагноз больному.

II – формирование антибиотико-устойчивости – приобретенной в результате терапии антибиотиками, в отличие от врожденной, видовой устойчивости.

Наиболее антибиотико-резистентны – стафилококки, шигеллы, кишечная палочка. Антибиотико-устойчивость отсутствует у стрептококков и гонококков. Иногда образуются антибиотико-зависимые формы.

Антибиотико-устойчивые бактерии появляются вне зависимости от

применения антибиотика. Возникновение резистентности к антибиотикам связано либо со спонтанными мутациями в бактериальной клетке, либо с приобретением бактериальной клеткой R – плазмид. В обоих случаях резистентность передается другим клеткам в результате размножения или генетического обмена. Через 1-3 года после создания нового антибиотика появляются устойчивые к нему бактерии, а через 10-20 лет формируется полная резистентность к антибиотику. Устойчивость возникает к каждому антибиотику. В результате мутаций бактерия приобретает устойчивость к одному антибиотику; в случае с R–плазмидой – возникает устойчивость к 5-6 антибиотикам, а если бактериальная клетка имеет несколько R – плазмид, возникают полирезистентные штаммы.

### **Контрольные вопросы к лекции**

1. Питательные среды, классификация и требования, предъявляемые к ним.
2. Материалы для бактериологического исследования и правила его забора.
3. Выделение и идентификация чистой культуры бактерий. Принципы культивирования аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных бактерий.
4. Бактериологический метод диагностики инфекционных заболеваний.
5. Методы выделения чистой культуры.
6. Идентификация микроорганизмов.
7. Методы изучения биохимической активности бактерий.
8. Факторы агрессии.
9. Методы определения чувствительности к лекарственным препаратам.
10. Антибиотики, их применение, получение.
11. Принципы рациональной химиотерапии.

### **Лекция 3. Генетика микробов План лекции**

1. Строение и репликация генома бактерий
2. Изменчивость генома бактерий: а) Мутации у бактерий, б) Рекомбинация у бактерий (конъюгация, трансдукция, трансформация)
3. Особенности генетики вирусов
4. Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней
5. Генная инженерия. Методы генной инженерии. Практическое применение

#### **1. Строение и репликация генома бактерий**

Наследственную функцию у бактерий выполняет ДНК; молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей. Каждый нуклеотид состоит из

азотистого основания (пуриновые – аденин, гуанин, пиримидиновые – тимин, цитозин), сахара дезоксирибозы и фосфатной группы. Каждый нуклеотид – полярный, у него дезоксирибозный 3' -конец и фосфатной 5' -конец. Нуклеотиды соединены в полинуклеотидную цепочку фосфодиэфирными связями между 5' – концом одного нуклеотида и 3' - концом другого. Цепочки соединены водородными связями комплементарных азотистых оснований: аденин-тимин, гуанин-цитозин.

Размеры двуцепочечной ДНК характеризуются числом пар нуклеотидов (н.п.). Наследственная информация хранится в последовательности нуклеотидов ДНК: их последовательность определяет последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка. Каждому белку соответствует свой ген, т.е. дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов.

Совокупность все генов называется геномом (генотип). Внешнее проявление генома называется фенотипом.

Геном состоит из генетических элементов, способных к самостоятельной репликации, репликонов. Репликация – создание себе подобной структуры: синтез на каждый из нитей молекулы ДНК (РНК) парной ей нити лежит в основе передачи наследственной информации. Репликонами являются бактериальная хромосома и плазмиды.

Бактериальная хромосома представлена одной двуцепочечной молекулой ДНК. Размеры её разные у различных представителей Procaruotae от  $3 \times 10^8$  до  $2,5 \times 10^9$  н.п. бактериальная хромосома имеет гаплоидный набор генов, кодирует функции клетки.

Плазмиды бактерий – двухнитевые молекулы ДНК размером от 103 до 106 н. п. Плазмиды сообщают бактериальной клетке устойчивость к антибиотикам, способствуют расщеплению сложных органических соединений, помогают продуцировать факторы патогенности. Количество плазмид в бактериальной клетке от 1 до 200. Некоторые плазмиды могут встраиваться в бактериальную хромосому и функционировать как единый репликон, такие плазмиды называются интегративными. Другие плазмиды способны перемещаться из одной бактериальной клетки в другую – их называют трансмиссивными – конъюгативными.

Многие R – плазмиды придают бактериям устойчивость к антибиотикам, благодаря ферментам которые разрушают антибиотики. Бактериальные штаммы, несущие R-плазмиды, являются факторами «госпитальных инфекций» (хирургические отделения, родильные дома и т.д., но не инфекционные отделения).

Есть Ent – плазида – определяет развитие инфекционного процесса при сибирской язве, чуме, кишечном иерсиниозе и др. – связана с плазмидами патогенности, синтезирует энтеротоксины.

Плазмиды используются в генной инженерии.

Подвижные генетические элементы входят в состав бактериального генома, бактериальной хромосомы и плазмиды. Они содержат гены только

для перемещения, перемещаются только с одного участка репликона на другой, а так же между репликонами; они обеспечивают: 1- синтез специфических молекул (н, токсинов); 2- обеспечивают устойчивость к антибиотикам.

В состав бактериального генома, бактериальной хромосомы и плазмиды, входят подвижные генетические элементы. Вставочные последовательности

– это участки ДНК, перемещаются от одного участка репликона в другой и между репликонами. Они содержат гены перемещения. Транспозоны – это сегменты ДНК, обладают теми же свойствами, что и вставочные последовательности, но имеют гены, обеспечивающие синтез молекул (токсинов) или обеспечивают устойчивость к антибиотикам.

Подвижные генетические элементы, перемещаясь по репликону или между репликонами, вызывают:

- 1) инактивацию генов в участках ДНК, куда встроились;
- 2) повреждения генетического материала;
- 3) слияние репликонов, т.е. встраивание плазмиды в хромосому;
- 4) распространение генов в популяции бактерий, изменяя их биологические свойства, смену возбудителя инфекции; эволюцию среди микробов.

Воспроизведение генетического материала бактерий осуществляется в процессе репликации по полуконсервативному механизму. Каждая из двух цепочек ДНК хромосомы или плазмиды является матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепочки ДНК при участии комплекса ферментов. Репликация начинается с расплетения двухцепочечной ДНК; формируются две репликативные вилки, которые двигаются в противоположных направлениях, пока встретятся. Формирование новой дочерней цепи происходит при участии фермента ДНК-полимеразы она присоединяет комплементарные матрице нуклеотиды к свободному 3' -концу (дезоксирибозному) растущей цепочки. Для реакции полимеризации нуклеотидов на матрице родительской цепочки ДНК-полимеразе требуется праймер (затравка), представляющий собой короткую нуклеотидную цепочку, комплементарную матричной со свободным 3' -концом. На этом свойстве ДНК-полимеразы основан новый диагностический метод ПЦР полимеразная цепная реакция; позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале по наличию ДНК микроба без выделения этого микроба в чистую культуру.

### **Изменчивость генома бактерий**

Изменения генома бактерий, а следовательно свойств бактерий, могут происходить в результате мутаций и рекомбинаций.

### **а) Мутации у бактерий.**

Мутации – это изменения в последовательности нуклеотидов ДНК, которые приводят к появлению дефектных, т.е. не свойственных микробу белков или к отсутствию их синтеза.

Фенотипические изменения в форме мутаций могут быть связаны с морфологией бактериальной клетки, появляется потребность в факторах роста, т.е. ауксотрофность; в устойчивости к антибиотикам; изменяется чувствительность к  $t_0$ ; снижается вирулентность (аттенуация).

Мутации бывают спонтанными, возникающими самопроизвольно, без воздействия извне, и индуцированными. Спонтанные мутации появляются в результате ошибок репликации (повторения) ДНК и вследствие перемещения подвижных генетических элементов в популяции бактерий. Индуцированные мутации возникают под влиянием мутагенов-факторов воздействия, это физические (УФ-лучи, радиация), химические и биологические (транспозоны).

Мутации бывают точковыми, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, и протяженными, т.н. абберации, когда выпадает несколько пар нуклеотидов. Это явление выпадения нескольких пар нуклеотидов называется делецией; добавление нуклеотидных пар дупликация.

### **б) Рекомбинации у бактерий.**

Генетическая рекомбинация – это взаимодействие между двумя геномами, т.е. ДНК, обладающими различными генотипами; оно приводит к образованию рекомбинаций ДНК, дочернего генома с генами обоих родителей.

В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки – доноры, которые передают клеткам - реципиентам генетический материал. В клетку реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки – донора, один или несколько генов. Образуется только один рекомбинант, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента с включениями одного или нескольких генов донора.

Рекомбинация гомологичная, если участки ДНК обладают высокой степенью гомологии. Есть еще сайт - специфическая рекомбинация, она происходит в определенных участках – сайтах генома и не требует высокой степени гомологии ДНК; имеет место при включении плазмиды в хромосому бактерии.

Рекомбинация – конечный этап передачи и обмена генетического материала между бактериями, осуществляется конъюгацией, трансдукцией и трансформацией.

Конъюгация – передача генетического материала от клетки – донора в клетку – реципиент при контакте клеток.

Трансдукция – это передача бактериальной ДНК посредством бактериофага. В процессе репликации фага внутри бактерий фрагмент бактериальной ДНК проникает в фаговую частицу и переносится в бактерию

– реципиент во время фаговой инфекции.

**в) Трансформация** – передача генетической информации через выделенную из клетки – донора ДНК, в природе может происходить самопроизвольно у некоторых видов бактерий (чаще gr<sup>+</sup>) – суть её в том, что выделенная из погибших клеток ДНК захватывается реципиентными клетками. Трансформация широко применяется в генной инженерии.

## **2. Особенности генетики вирусов**

Наследственная информация генома вирусов может быть записана как в ДНК, так и РНК. Мутации у вирусов могут происходить спонтанно, а также индуцировано под влиянием тех же факторов, мутагенов, что и у бактерий.

Фенотипические мутации вирусного генома – это изменения в антигенной структуре, неспособность вызывать продуктивную информацию в чувствительной клетке, чувствительность к t<sup>0</sup>, изменения формы и размеров бляшек в культуре клеток под агаровым слоем.

Свойства вирусов изменяются при одновременном заражении несколькими вирусами чувствительной клетки, как в результате обмена генетическим материалом (генетическая рекомбинация и генетическая реактивация), так и без него (комплементация и фенотипическое смешивание).

Генетическая рекомбинация имеет место чаще у ДНК – содержащих вирусов. Среди РНК содержащих вирусов у тех, которые обладают фрагментированным геномом (вирус гриппа). При рекомбинации происходит обмен между гомологичными участками генома. Генетическая реактивация наблюдается между геномами родственных вирусов, имеющих мутации в разных генах. При перераспределении генетического материала формируется полноценный дочерний геном.

Комплементация – наблюдается в том случае когда один из двух вирусов, инфицирующих клетку, в результате мутации синтезируют нефункциональный белок. Другой вирус, немутантный, синтезирует полноценный белок, восполняет его отсутствие у мутантного вируса.

Фенотипическое смешивание возникает при смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами – часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам, но генотип их не изменяется.

## **3. Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней**

**а) Метод молекулярной гибридизации позволяет выявить степень сходства различных ДНК;**

основан на способности двуцепочечной ДНК при определенных условиях (при пов. t 90<sup>0</sup> С), в щелочной среде денатурировать, т.е. расплетаться на две нити, а при понижении t<sup>0</sup> на 100<sup>0</sup>С вновь восстанавливаться в двухнитевую структуру. Используют меченые зонды. Зондом называется одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты,

меченная радионуклидами, с которой сравнивают исследуемую ДНК. Применяют для идентификации микробов.

**б) Полимеразная цепная реакция ПЦР** – позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале по наличию в нем ДНК без выделения микроба в чистую культуру. Применяют для диагностики вирусных и бактериальных инфекций. ПЦР основана на амплификации, т. е. увеличении количества копий специфического (маркерного) гена возбудителя. Для этого двухнитевую ДНК, выделенную из исследуемого материала, денатурируют («расплетают» при нагревании) и достраивают (при охлаждении) к расплетенным нитям ДНК новые комплементарные нити. В результате из одного гена образуется два. Этот процесс копирования генов повторяется многократно. Достраивание новых комплементарных нитей ДНК происходит при добавлении к искомым генам праймеров (затравки из коротких однонитевых ДНК, комплементарных 3<sup>1</sup>- концам ДНК искомого гена), ДНК – полимеразы и нуклеотидов.

#### **Генная инженерия. Методы генной инженерии. Практическое использование.**

В основе генной инженерии лежит процесс получения рекомбинантных ДНК, содержащих, помимо присущего «хозяйской» ДНК набора природных генов, «чужой» ген или гены, взятые из другой ДНК. Напомним: генетическая рекомбинация – перегруппировка генетического материала (ДНК) родительских генетических структур (хромосом, плазмид и др.), приводящая к появлению новых сочетаний генов у потомства. Основной механизм генетической рекомбинации – кроссинговер (перекрест хромосом), т. е. происходит разрыв участков двух генетических структур, их обмен и восстановление. У микроорганизмов генетическая рекомбинация осуществляется в результате обмена участками двух молекул ДНК либо их фрагментов.

#### **Получение рекомбинантных ДНК состоит из нескольких этапов:**

1. выделение ДНК из организма;
2. получение гибридных (рекомбинантных) молекул ДНК путем встройки в исходную ДНК «чужого гена», выделенного из другой ДНК или полученного химическим синтезом;
3. введение рекомбинантной ДНК в живую клетку (бактерий, дрожжей, растительных или животных клеток, клеток человека);
4. создание клеток для проявления (экспрессии) генов рекомбинантной ДНК в живой клетке и секреции нового продукта, кодируемого «чужим» геном.



Рисунок 6–Технология рекомбинантных ДНК.

Клонированный, т.е. выделенный из ДНК клетки природный или химически синтезированный ген целевого продукта (н., инсулина, интерферона) встраивается в ДНК (н., в плазмиду бактерии или в ДНК вируса) после расщепления ДНК ферментами рестриктазами. Вставленный в расщепленную ДНК ген «сшивается» с этой ДНК ферментами лигазами. Полученная рекомбинантная ДНК бактерий или вируса вводится в эту же бактерию или вирусную частицу, из которой была взята, и таким образом получают рекомбинантный штамм бактерий или вирусов. При культивировании такого штамма он синтезирует не свойственный ему продукт, кодируемый встроенным чужеродным геном (н., инсулин, интерферон). На этом принципе получены сотни рекомбинантных штаммов бактерий, дрожжей, вирусов, продуцирующие различные бав: антигены, антитела, ферменты, гормоны, иммуномодуляторы и др. Культивированием штаммов занимается биотехнология. На основе генной инженерии получены сотни препаратов: гормоны, антикоагулянты, тромболитики, вакцины (дрожжевая вакцина против генотипа В), иммуномодуляторы (интерфероны  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , интерлейкины 1,2 и др., фактор некроза опухолей, пептиды тимуса, миелопептиды), ферменты (уреаза), моноклональные антитела, диагностические препараты ( на ВИЧ – инфекцию, вирусные гепатиты и др).

**Генная инженерия оправдана в тех случаях, когда:**

1. вещество не возможно получить другим способом;
2. технология более эффективна и экономична;
3. экологически более безопасна.

За генной инженерией большое будущее. В будущем позволит получить поливалентные живые (векторные) вакцины, более эффективные лекарственные препараты, регуляторные белки, осуществить генодиагностику и генотерапию. Большое будущее генной инженерии открывает расшифровка генома человека, которая позволит решить проблему генотерапии, генопрофилактики и генодиагностики инфекционных и

неинфекционных болезней. Программа «Геном человека» разрабатывается во многих странах, особенно в США, Японии, России. Из 100000 генов, содержащихся в хромосомах человека, расшифровано около 5000 генов и уже это позволило приступить к успешной генотерапии некоторых болезней.

### **Контрольные вопросы к лекции**

1. Строение и репликация генома бактерий
2. Изменчивость генома бактерий: а) Мутации у бактерий, б) Рекомбинация у бактерий(конъюгация, трансдукция, трансформация)
3. Особенности генетики вирусов
4. Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней
5. Генная инженерия. Методы генной инженерии. Практическое применение

## **Раздел 2. Методы диагностики**

### **Лекция 4. Диагностические препараты** План лекции

1. Диагностические препараты.
2. Антигены микроорганизмов.
3. Получение и использование антигенов для диагностики.
4. Получение и использование сывороток для диагностики.

#### **1. Диагностические препараты**

Диагностические препараты относятся к иммунобиологическим препаратам, их действие основано на иммунобиологических принципах и реакциях. Диагностические препараты, системы, наборы широко используют для диагностики инфекционных и неинфекционных болезней, индикации и идентификации бактерий, вирусов, грибов и простейших, для определения иммунного статуса, аллергий, иммунопатологий, иммунологической совместимости тканей, иммунных взаимоотношений матери и плода и т. д.

Диагностикумы применяют для определения специфических антигенов и антител, аллергенов, сенсibilизированных иммунокомпетентных клеток ( В-, и Т- лимфоцитов), факторов естественной резистентности (комплемента, интерферона, белков, сыворотки крови) иммунорегуляторов.

В зависимости от назначения диагностические препараты содержат специфические антигены, антитела, аллергены, факторы естественного иммунитета и т.д., которые используют для выявления в реакциях или тест-системах. Иммунологические методы специфичны, высокочувствительны и достоверны, находят широкое применение в медицине. Эффективность этих методов возросла благодаря использованию моноклональных антител, очищенных и концентрированных антигенов.

## 2. Антигены микроорганизмов

Антигены – полимеры органической природы, содержащиеся в микроорганизмах и других клетках или выделяемые ими, которые несут признаки генетически чужеродной информации и при введении в организм вызывают развитие специфических иммунных реакций.

Под антигенами понимают вещества, вызывающие появление антител, и вещества, реагирующие с антителами. Это разные характеристики антигена. Важнейшее качество антигена – индуцировать образование антител (и другие формы иммунного ответа), т.е. антигенность определяется чужеродностью. Все антигены обладают специфичностью.

Для медицинской микробиологии наибольший интерес представляют антигенные свойства бактерий, токсинов и вирусов. Их используют в практике для получения высокоэффективных иммуногенных препаратов, а также для идентификации возбудителей болезней. Бактериальная клетка представляет собой целый комплекс антигенов. Антигенными свойствами обладают жгутики, капсула, клеточная стенка, ЦПМ (цитоплазматическая мембрана), рибосомы и др. компоненты цитоплазмы, а также различные белки, выделяемые бактериями во внешнюю среду, токсины, ферменты. Основные антигены: соматические О-антигены; жгутиковые Н-антигены; поверхностные или капсульные К-антигены.

Соматические О- антигены в основном термостабильны, выдерживают нагревание до 80-100°C. Антигенную специфичность гр(-) бактерий определяют полисахариды, содержащиеся в ЛПС (липополисахарид) клеточной стенки. По О- антигенам вид бактерий подразделяется на подвиды.

Жгутиковые Н- антигены, имеющие белковую природу (состоят из белка флагеллина) термолабильны, разрушаются при 60-80 °С. Также отличаются высокой специфичностью. Позволяют выделить различные серологические варианты. Например, группа сальмонелл на основании особенностей строения О- и Н- антигенов подразделяется на 2200 сероваров.

Капсульные К- антигены располагаются на поверхности клеточной стенки, встречаются у бактерий, образующих капсулу, состоит из полисахаридов. Капсульным антигеном является Vi – антиген - антиген вирулентности (на поверхности многих энтеробактерий, обладающих высокой вирулентностью).

Антигенными свойствами обладают бактериальные белковые токсины, ферменты и др. вещества, которые секретируются бактериями в окружающую среду (например, туберкулин). При взаимодействии со специфическими антителами токсины, ферменты и др. биологически активные молекулы бактериального происхождения теряют свою активность. Столбнячный, дифтерийный и ботулинический токсины относятся к сильным полноценным антигенам, поэтому их используют для получения анатоксинов для вакцинации людей.

Протективные антигены – антигены, с сильно выраженной

иммуногенностью, могут обеспечивать иммунитет макроорганизма ко всему инфекционному агенту ( пример, возбудитель сибирской язвы).

Перекрестно реагирующие антигены – установлено наличие общих антигенов у человека и возбудителей инфекционных болезней., т.н. антигенная мимикрия. Макроорганизм тогда не способен вырабатывать иммунитет, и болезнь протекает более тяжело. Возможно, длительное носительство и неэффективность вакцинации являются следствием общности антигенов микроба с антигенами тканей человека.

Суперантигены – активизируют Т- лимфоциты с секретированием избыточного количества интерлейкина – 2, который вызывает отравление. Избыток Т –лимфоцитов может привести к различным аутоиммунным заболеваниям и подавлению иммунной системы.

### **Получение и использование антигенов для диагностики**

Биологическая промышленность выпускает различные биологические препараты: вакцины, лечебно- профилактические иммунные сыворотки и иммуноглобулины, диагностические антигены и аллергены, бактериофаги. Принцип и методика получения диагностических антигенов аналогичны приготовлению инактивированных вакцин. Антигены содержат убитые целые микробные клетки или экстракты, полученные из соответствующих микроорганизмов.

Аллергены в качестве диагностических препаратов представляют собой экстракты из бактериальной массы. Их используют при аллергической диагностике туберкулеза (туберкулин), бруцеллеза (бруцеллин) туляремии (тулярин), сибирской язвы (антраксин).

### **Получение и использование сывороток для диагностики**

Диагностические иммунные сыворотки получают или от иммунизированных животных (гетерологичные сыворотки), или переболевших, а также вакцинированных людей (гомологичные сыворотки). Гетерологичные сыворотки готовят путем гипериммунизации лошадей и др. животных, т.е. многократного введения животным больших доз антигена по схеме и на пике антителообразования у иммунных животных забирают кровь, освобождают её от форменных элементов и фибрина, фильтруют, стандартизируют по концентрации антител (антитоксинов, агглютининов, вируснейтрализующих антител и т. д.), содержанию белка и др. свойствам. Такая нативная сыворотка содержит много балластных белков и имеет низкую концентрацию антител. Из нее получают иммуноглобулины путем выделения, очистки и концентрирования их ферментативным способом в сочетании с диализом, осаждением, хроматографией.

Для получения гомологичных иммуноглобулинов и их активных фрагментов используют кровь иммунных (вакцинированных, переболевших) людей или специально вакцинированных доноров, плацентарную и абортную

кровь.

Иммунные сыворотки, иммуноглобулины, их фрагменты подразделяются на антитоксические, антибактериальные и противовирусные. К антитоксическим относятся сыворотки против дифтерии, столбняка, газовой гангрены, ботулизма, т.е. сыворотки, содержащие в качестве антител антитоксины, нейтрализующие специфические токсины. Антибактериальные сыворотки содержат агглютинины, преципитины, комплементсвязывающие и др. антитела к возбудителям болезней (дизентерия, коклюш, чума). Противовирусные сыворотки (гриппозная, коревая, антирабическая и др.), содержат вируснейтрализующие, комплементсвязывающие и др. противовирусные антитела.

### **Контрольные вопросы к лекции**

1. Диагностические препараты.
2. Антигены микроорганизмов, получение и использование для диагностики.
3. Получение и использование сывороток для диагностики

## **Лекция 5. Серологический метод лабораторной диагностики**

### **План лекции**

1. Реакции антиген-антитело и их практическое применение. Виды серологических реакций.
2. Реакции агглютинации, их применение.
3. Реакции преципитации, их виды, применение.
4. Реакция нейтрализации.
5. Реакции лизиса (РЛ) и связывания комплимента (РСК), их применение.
6. Реакции иммунофлюоресценции.
7. Иммуноферментный анализ.

### **Реакции антиген-антитело и их практическое применение. Виды серологических реакций**

Взаимодействие антигена с антителом проявляется в форме различных иммунных, или серологических (от лат. *Serum* — сыворотка) реакций. В связи с их высокой чувствительностью и специфичностью они нашли широкое применение в диагностике болезней. Серологические реакции применяют для двух целей. Во-первых, по известному антигену — диагностикуму, определяют в исследуемой сыворотке наличие и количественное содержание специфических к данному антигену антител

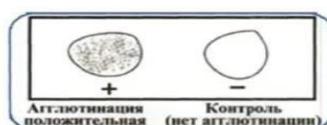
титрованием. Титр иммунной сыворотки – максимальное разведение, которое дает положительную реакцию. Во-вторых, с помощью известного антитела, т.е. диагностической иммунной сыворотки, определяют наличие в исследуемом материале специфического микробного антигена или осуществляют серологическую идентификацию выделенного возбудителя.

### Реакции агглютинации (РА), их применение

При РА происходит склеивание антителами корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов, частиц латекса и др.). Образуется осадок (агглютинат) или хлопья. В РА участвуют антитела, относящиеся к IgG и IgM. РА используют для определения антител в сыворотке крови или бруцеллезе (реакция Райта, Хеддельсона), брюшном тифе и паратифах (реакция Видаля) и др. инфекционных болезнях, а также для определения возбудителя, выделенного от больного, для определения групп крови.

## РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

(от лат. *agglutinatio* - склеивание)  
-склеивание (соединение)  
антигеннесущих  
корпускулярных частиц  
молекулами специфических  
антител в присутствии  
электролитов, которое  
заканчивается образованием  
видимых невооруженным  
глазом хлопьев или осадка  
(агглютината).



Реакция агглютинации на предметном стекле в капле сыворотки - ориентировочная



Развернутая реакция агглютинации

Рисунок 7– Реакция агглютинации

Варианты реакции агглютинации: развернутая, ориентировочная, непрямая и др.

Развернутая РА – для определения у больного антител: к разведениям сыворотки крови больного добавляют диагностикум (взвесь убитых микробов), инкубируют при 37<sup>0</sup>С и отмечают наибольшее разведение (титр) сыворотки, при котором произошла агглютинация, т.е. образовался осадок. (Рис. 7).

Характер и скорость агглютинации зависят от вида антигена и антител. Реакция не прямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА) основана на использовании эритроцитов (или латекса) с адсорбированными на их поверхности антигенами и антителами, взаимодействие которых с соответствующими антителами или антигенами сыворотки крови больных вызывает склеивание и выпадение эритроцитов в осадок (в пробирке или ячейке). Эритроциты участвуют пассивно.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) основана на блокаде, подавлении вирусов антителами иммунной сыворотки и вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты. РТГА применяют для диагностики вирусных болезней, вирусы которых (вирусы гриппа, краснухи и др.) могут агглютинировать эритроциты различных животных. (Рис. 8).

## **Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)**

**Принцип:** блокирование антигенов вирусов антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты.

**Применение:** диагностика многих вирусных болезней, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита и др.) могут агглютинировать эритроциты различных животных.

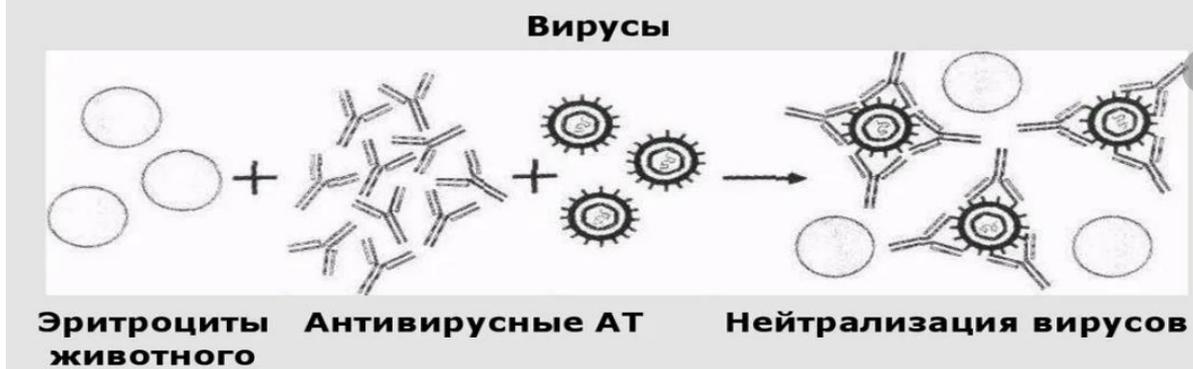


Рисунок 8–Реакция торможения гемагглютинации

## **Реакции преципитации (РП), их виды, применение**

Преципитация процесс, когда происходит агрегация с растворимыми антигенами; если же антиген представлен корпускулами, специфическая агрегация таких антигенов называется агглютинацией.

В РП осадок комплекса антиген-антитело называется преципитатом. Реакцию проводят в пробирках, наслаивая растворимый антиген на иммунную сыворотку. На границе двух растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата (реакция кольцепреципитации). Если в качестве антигенов в реакции кольцепреципитации используют прокипяченные и профильтрованные водные экстракты органов или тканей, такая реакция называется реакцией термопреципитации (реакция Асколи). (Рис 9).



Рисунок 9-Реакция кольцепреципитации

Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони выполняется на агаровых пластинках, в лунках которых диаметром 2-3 мм отдельно помещают антигены и иммунные сыворотки, они диффундируя в агар, в месте «встречи» образуют преципитат в виде полосы.

При постановке реакции радиальной иммунодиффузии вносится сыворотка в агаровый гель. В лунки геля коллоидный раствор антигена, который диффундируя в гель, образует кольцевые зоны преципитации вокруг лунок. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена. Используют для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента и др.

Иммуноэлектрофорез – сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации: смесь антигенов разделяется в геле электрофорезом, затем параллельно зонам электрофореза вносят иммунную сыворотку, антитела которой диффундируют в гель и в месте «встречи» с антигеном образуют линии преципитации.

Реакция флоккуляции (по Рамону) – появляется опалесценция или хлопьевидная масса (иммунопреципитация) при реакции токсин-антитоксин или анатоксин-антитоксин. Применяется для определения активности анатоксина или антитоксической сыворотки.

### Реакция нейтрализации (РН)

Ее проводят путем введения смеси антиген-антитело животным или чувствительным тест – объектам (эмбрионам, культуре клеток). Отсутствие повреждающего действия у них свидетельствует о специфичности взаимодействия комплекса антиген-антитело, о нейтрализующем действии иммунной сыворотки. (Рис. 10).

## Реакции нейтрализации вирусов

В сыворотке крови переболевших лиц циркулируют АТ, нейтрализующие вирусы.

Их наличие выявляют:

1) смешиванием культуры возбудителя с сывороткой с последующим введением

лабораторному животному



2) заражением культуры клеток (КК)

Размножение вирусов вызывает гибель клеток, т.е. цитопатогенный эффект

На эффективность нейтрализации указывает:

- выживание животного -
- отсутствие гибели клеток в КК.



Рисунок 10– Реакция нейтрализации

## **Реакции лизиса (РЛ) и связывания комплемента (РСК), их применение**

Лизирующее действие проявляется в реакциях лизиса и связывания комплемента. В основе РЛ – взаимодействие антигенов со специальными антителами.

Иммуноглобулины при содействии комплемента разрушают эритроциты, выходит гемоглобин и смесь из мутной становится прозрачной. Реакция называется реакцией гемолиза. Могут лизироваться и бактерии.

Реакции с участием комплемента основаны на активации комплемента комплексом антиген – антитело.

В РСК при соответствии друг другу антигенов и антител образуется иммунный комплекс ИК, к которому через Fc фрагмент антител присоединяется комплемент С, т.е. происходит связывание комплемента комплексом антиген-антитело, комплемент остается свободным. РСК проводят в две фазы: 1ф- инкубация смеси антиген+антитело+комплемент; 2ф- (индикаторная)-выявление в смеси свободного комплемента добавлением к ней гемолитической системы из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним. В 1ф при образовании комплекса антиген-антитело происходит связывание ими комплемента, и тогда во 2ф не произойдет гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов (реакция +). Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исслед. образ. нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2ф присоединится к комплексу эритроцит – антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз (реакция -). РСК применяют для диагностики многих инфекционных болезней (сифилис, реакция Вассермана).

Реакция радиального гемолиза - ставят в лунках геля из агара, содержат эритроциты барана и комплемент. При внесении в лунки гемолитической сыворотки вокруг них образуется зона гемолиза в результате радиальной диффузии. Таким образом определяют активность комплемента и гемолитической сыворотки, а также антитела в сыворотке крови больных гриппом, краснухой, клещевым энцефалитом. Для этого на эритроцитах адсорбируют соответствующие антигены вируса, а в лунки геля с данными эритроцитами добавляют сыворотку крови больного. Противовирусные антитела взаимодействуют с вирусными антигенами, адсорбированными на эритроцитах, образуют комплекс, к которому присоединяются компоненты комплемента и наступает гемолиз. ( Рис. 11).

Реакция иммунного прилипания основана на активации системы комплемента корпускулярными антигенами (бактериями, вирусами), обработанными иммунной сывороткой. Активизируется третий компонент комплемента С3б, который присоединяется к корпускулярному антигену в составе иммунного комплекса. На эритроцитах, тромбоцитах, макрофагах имеются рецепторы, для С3б и при смешивании этих клеток с иммунными комплексами, несущими С3б, происходит их соединение и агглютинация.

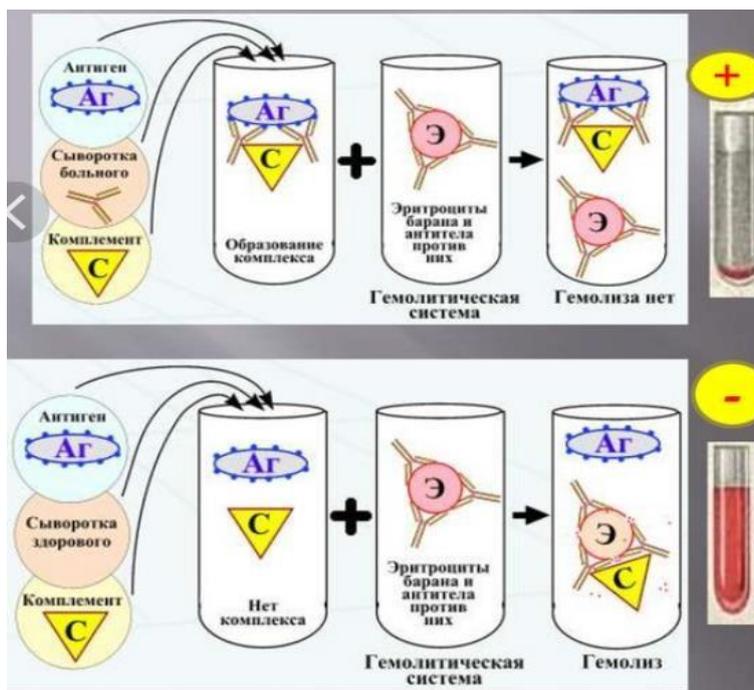


Рисунок 11– Реакция связывания комплемента

### 3. Реакции иммунофлуоресценции РИФ- (метод Кунса)

Она основана на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными флуорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминисцентного микроскопа (прямой метод). ( Рис. 12).

Обработанные специфической сывороткой бактерии светятся по периферии клетки в виде зеленой каймы. Разновидности метода: прямой, непрямой, с комплементом.

Метод Кунса является экспресс- диагностикой для выявления антигенов микробов или определения антител.

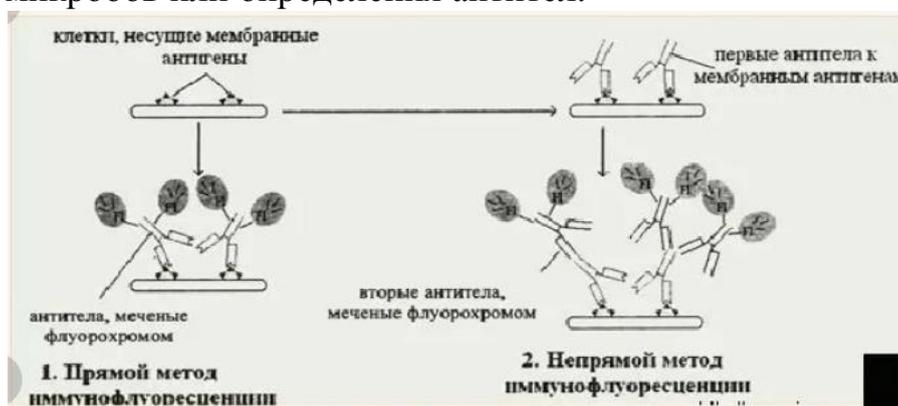


Рисунок 12- Реакция иммунофлуоресценции

### Иммуноферментный анализ (ИФА)

Это выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных ферментом-меткой (пероксидазой, щелочной фосфатазой). После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь д расщепления изменяют цвет хромогена – интенсивность окраски

прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

ИФА применяют для диагностики бактериальных, вирусных и паразитарных болезней (ВИЧ, гепатита В и др.), определения БАВ (биологически активных веществ) в очень низких концентрациях.

Радиоиммунологический анализ (РИА) - высокочувствительный метод, основанный на реакции антиген-антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом ( $^{125}\text{J}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  и др.).

Иммуноблоттинг – высокочувствительный метод, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА.

### **Контрольные вопросы к лекции**

1. Реакции антиген-антитело и их практическое применение. Виды серологических реакций.
2. Реакции агглютинации, их применение.
3. Реакции преципитации, их виды, применение.
4. Реакции нейтрализации.
5. Реакции лизиса (РЛ) и связывания комплемента (РСК), их применение.
6. Реакции иммунофлюоресценции.
7. Иммуноферментный анализ.

## **Лекция 6. Молекулярно-генетический метод лабораторной диагностики инфекционных заболеваний**

### **План лекции**

1. Метод молекулярной гибридизации.
2. Этапы постановки ПЦР. Применение ПЦР в диагностике бактериальных и вирусных инфекций.
3. Современные методы Саузерн- и Нозерн- блоттинг.

### **Метод молекулярной гибридизации**

Позволяет выявить степень сходства различных ДНК. Применяется для идентификации микробов для их точного таксономического положения. Основан на способности двуцепочечной ДНК при  $t\ 90^{\circ}\text{C}$  в щелочной среде денатурировать, т.е. расплетаться на две нити, а при понижении  $t$  на  $10^{\circ}\text{C}$  вновь восстанавливать исходную двухнитевую структуру. Метод требует наличия зонда, т.е. одноцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, меченной радионуклидами, с которой сравнивают исслед. ДНК.

Молекулярную гибридизацию проводят так. Расплетают молекулу исслед. ДНК, одну нить закрепляют на специальном фильтре, который

помещают в раствор с радиоактивным зондом. Образуются двойные спирали. При наличии комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют двойную спираль. (Рис.13)



Рисунок 13–Метод молекулярной гибридизации.

### Этапы постановки ПЦР. Применение ПЦР в диагностике бактериальных и вирусных инфекций

Полимеразная цепная реакция ПЦР позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале по наличию в нем ДНК без выделения микроба в чистую культуру. Применяется для диагностики вирусных и бактериальных инфекций. (Рис. 14)

ПЦР основана на амплификации, т.е. увеличении количества копий специфического (маркерного) гена возбудителя. Для этого двунитевую ДНК, выделенную из материала, денатируют («расплетают» при нагревании 94°C 1 мин – стадия «плавления») и достраивают (при охлаждении 45-65°C в течение 1-1,5 мин) к расплетенным нитям ДНК новые комплементарные нити. Используют праймеры, комплементарные определенному участку ДНК возбудителя. Праймеры получают из известных генов различных возбудителей в аппаратах -синтезаторах, сост. из 20-30 аминокислотных остатков. Нужно знать нуклеот. последовательность объекта исследования (вирус, бактерия и т.д.). Имеются данные о геноме различных патогенных микробов и ими пользуются при постановке ПЦР. Для ПЦР необходимо два праймера, каждый из которых комплементарен одной из цепей двуцепочечной молекулы ДНК. Присоединение («отжиг») праймеров происходит так: к образовавшимся в результате денатурации одноцепочечным ДНК присоединяются праймеры – один к 3' – концу выбранного для удвоения участка, второй – к 5' – концу. Этот этап называют «отжигом». Поддерживается температура 72°C оптим. t для полимеразы, применяемой в ПЦР. Фермент достраивает

комплементарные цепи ДНК, начиная с 3'- концев праймеров навстречу друг другу. Этот этап называется «элонгация» (удлинение). С каждым циклом количество ДНК удваивается.

Цикл повторяется при указанных t режимах (94°, 45-65° и 72°) автоматически с помощью амплификаторов (термоциклеров). Проводится 30 циклов, что позволяет получить  $2^{30}$  копий участка ДНК возбудителя.

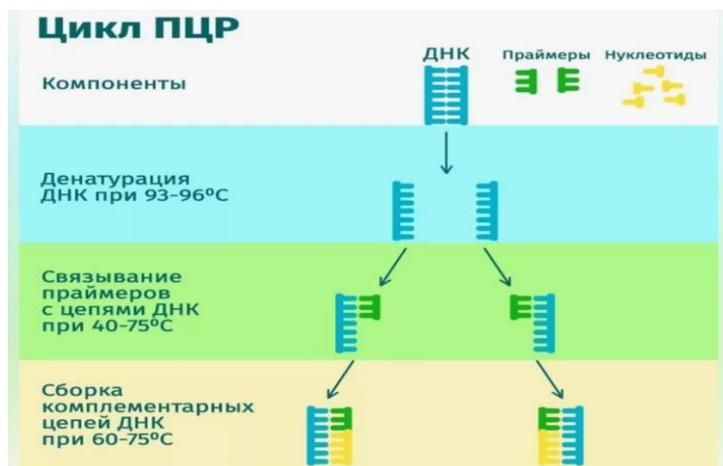


Рисунок 14— Полимеразно-цепная реакция.



Рисунок 15 Амплификатор.

### **Современные методы Саузерн- и Нозерн- блоттинг**

Высококчувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА. Используют как диагностический метод при ВИЧ-инфекции и др. (Рис.16)

Антигены возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят их (блоттинг) из геля на активированную бумагу или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с

помощью ИФА. Есть такие бумажные полоски с «блотами» антигенов. На эти полоски наносят сыворотку больного. Инкубируют, затем отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом. Образовавшийся на полоске комплекс (антиген+антитело больного+антитело против Ig человека) выявляют с помощью субстрата хромогена, изменяющего окраску под действием фермента.



Рисунок 16– Саузерн блоттинг.

### Контрольные вопросы к лекции

1. Метод молекулярной гибридизации.
2. Этапы постановки ПЦР. Применение ПЦР в диагностике бактериальных и вирусных инфекций.
3. Современные методы Саузерн- и Нозерн- блоттинг.

### Раздел 3. Общая вирусология Лекция 7. Общая вирусология План лекции

1. Строение и классификация вирусов.
2. Основные методы диагностики вирусных инфекций.
3. Вирусологический метод лабораторной диагностики
  - а) Клеточные культуры: первичные клеточные культуры; перевиваемые (пассажные) клеточные культуры; полуперевиваемые (диплоидные) культуры.
  - б) Взятие и подготовка материала для вирусологической диагностики; инфицирование культуры клеток, куриных эмбрионов и животных.
  - в) Выявление (индикация) вирусов: в культуре клеток, куриных эмбрионах, в организме лабораторных животных.
4. Методы идентификации вирусов (ПЦР, электронная микроскопия). Серологические методы (ИФА, РИФ).

## Строение и классификация вирусов

Вирусы открыл выдающийся русский ученый Д.И.Ивановский в 1892г. Вирусы относятся к царству *Vira* – это мельчайшие микробы («фильтрующиеся агенты»), не имеющие клеточного строения, белоксинтезирующей системы, содержащие только один тип нуклеиновой кислоты ДНК или РНК. Вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, размножаются в цитоплазме или ядре клетки. Они являются автономными генетическими структурами и отличаются особым разобщенным (дизъюнктивным), способом размножения (репродукции): в клетке отдельно синтезируются нуклеиновые кислоты вирусов и их белки, затем происходит их сборка в вирусные частицы, т.е. вирионы. Размеры вирусов очень малы, их структуру изучают с помощью электронной микроскопии. Форма вирусов может быть различной: палочковидной (вирус табачной мозаики), пулевидной (вирус бешенства), сферической (вирус полиомиелита, ВИЧ), нитевидной (филовирусы), в виде сперматозоидов (многие бактериофаги). Размеры вирусов определяют с помощью электронной микроскопии, методом ультрафильтрации через фильтры с известным диаметром, ультрацентрифугированием. Наиболее мелкие вирусы парвовирусы (18нм) и вирусы полиомиелита (20нм), наиболее крупный - вирус натуральной оспы (350нм). Различают ДНК и РНК содержащие вирусы, они гаплоидны, т.е. имеют один набор генов (за исключением ретровирусов с диплоидным набором хромосом). Геном вирусов содержит от 6 до нескольких сотен генов и представлен различными видами нуклеиновых кислот: двунитевые, одонитевые, линейные, кольцевые, фрагментированные. ( Рис. 17).

Среди РНК – вирусов есть

1) плюс - нить РНК – выполняет наследственную (геномную) функцию и функцию информационной РНК (иРНК)

2) минус – нить РНК – выполняет только наследственную функцию.

Геном вирусов способен включаться в генетический аппарат клетки в виде провируса, являясь генетическим паразитом клетки. Нуклеиновые кислоты некоторых вирусов (герпес) могут находиться в цитоплазме в виде плазмиды. У просто устроенных (вирус полиомиелита), вирусов нуклеиновая кислота связана с белковой оболочкой – капсидом, состоящим из капсомеров

– повторяющихся субъединиц. Нуклеиновая кислота и капсид – вместе называются нуклеокапсидом. У сложных (вирус гриппа) вирусов капсид окружен дополнительной липопротеиновой оболочкой суперкапсидом – пеплосом; на нем «шипы» или «шипики» – на их поверхности расположены пепломеры или суперкапсидные белки. Вирионы имеют винтообразный, спиральный, икосаэдрический (кубический) и сложный тип симметрии капсида. Капсид и суперкапсид защищают вирион от воздействия окружающей среды, осуществляют адсорбцию, определяют антигенные и иммуногенные свойства вириона.

Внутреннюю структуру вируса называют сердцевинкой, состоит из белков, связанных с ДНК, или из белков внутреннего капсида.

В вирусологии используют следующие таксономические категории: семейство –viridae, подсемейство - virinae, род – virus.

В основу классификации вирусов положены тип нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК), ее структура, количество нитей (1 или 2), особенности воспроизводства генома, размер и морфология вирионов, количество капсомеров и тип симметрии; чувствительность к эфиру и дезоксихолату; место размножения в клетке; антигенные свойства и др. Вирусы поражают человека, животных и растений. Вирусы, являясь основными возбудителями инфекционных болезней, участвуют в процессах канцерогенеза, могут передаваться различными путями (вирус краснухи – через плаценту), приводит к различным осложнениям (миокардит, панкреатит, иммунодефицит и др). Помимо обычных вирусов известны прионы – белковые инфекционные частицы, имеющие вид фибрилл размером 10-20x100-200нм, вызывают у человека и животных энцефалопатии. Вироиды, близки к вирусам – небольшие молекулы РНК, вызывают заболевания растений.

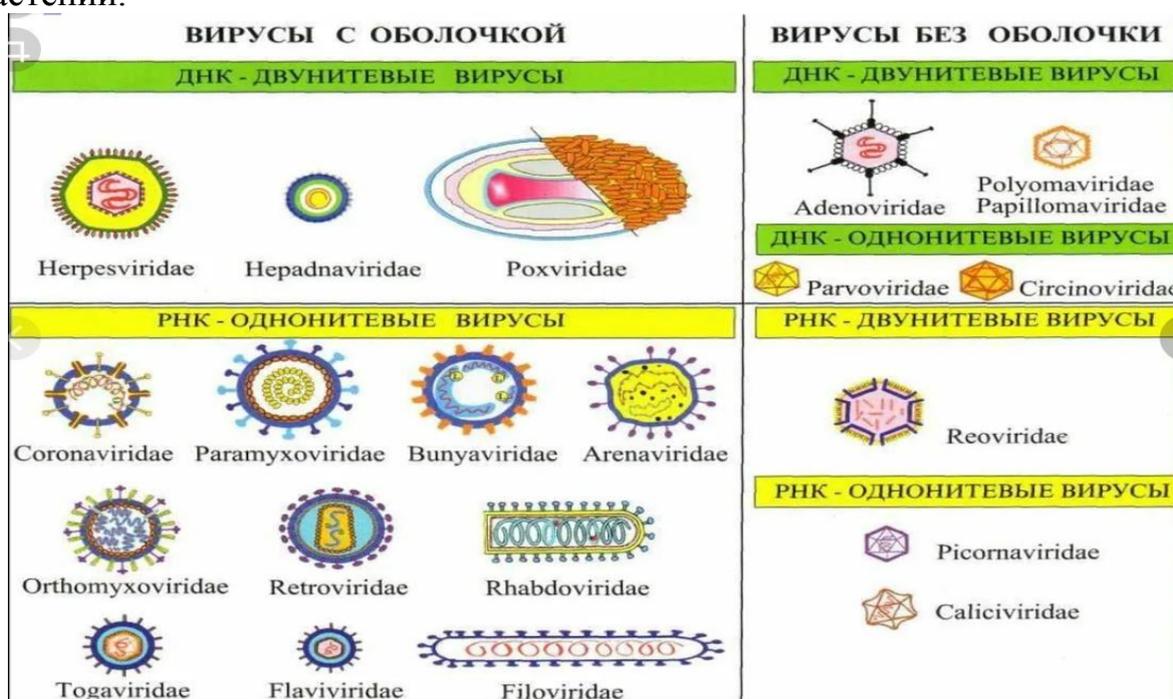


Рисунок 17. Классификация и морфология вирусов

В инфицированной клетке вирус может воспроизводиться в виде многочисленных вирионов, находиться в интегрированном состоянии с хромосомой клетки, быть в цитоплазме в виде кольцевых нуклеиновых кислот, напоминая плазмиды бактерий. Нарушения, которые вызывает вирус

– это инфекция и гибель клетки; продолжительное взаимодействие вируса с клеткой (латентная инфекция) или злокачественная трансформация клетки.

а) Культивирование и индикация вирусов

Так как вирусы являются внутриклеточными паразитами, их культивируют в организме лабораторных животных, куриных эмбрионах и культурах тканей. Заражают животных различными способами. Индикацию устанавливают по типичным признакам заболевания, патологическим изменениям органов и тканей животных или (положительной реакции гемагглютинации РГА) в пробирках *in vitro* (эритроциты животных склеиваются благодаря белку – гемагглютину, который находится на поверхности некоторых вирусов). (Для диагностических целей используют редко).

Куриные эмбрионы (5-12 дней) заражают введением исследуемого материала в различные полости и ткани эмбриона: в амнион, аллантоисную полость, в желточный мешок. Выращивание вирусов в эмбрионах птиц используют при промышленном выращивании вирусов.

Индикацию вируса осуществляют по специфическим поражениям эмбриона и РГА.

Чаще для культивирования вирусов применяют культуру клеток (тканей). Клетки получают из различных органов и тканей человека, животных, птиц, размножаются на искусственных питательных средах в лабораториях (на матрацах, в флаконах, в пробирках). Наиболее часто используют культуры клеток из эмбриональных и опухолевых тканей как наиболее активно размножающиеся.

#### **Различают следующие культуры клеток:**

1. однослойные в виде монослоя клетки прикрепляются и размножаются на поверхности лабораторной посуды;
2. суспензионные клетки – размножаются во всем объеме питательной среды;
3. органые – кусочки органов и тканей (применяются ограниченно).

Выращенные культуры клеток, в основном однослойные, заражают вирусодержавшим материалом. Индикацию вирусов проводят в культуре клеток на основании цитопатогенного действия (ЦПД) вирусов, или цитопатогенного эффекта (ЦПЭ), образования внутриклеточных включений, образования бляшек, «гемадсорбции» или цветной реакции. ЦПД, или ЦПЭ – видимые под микроскопом морфологические изменения клеток, возникающие в результате внутриклеточной репродукции вирусов.

Включения – цитоплазматические и ядерные выявляются при специальном окрашивании под микроскопом скоплений вирусов. Вирусы натуральной оспы образуют цитоплазматические включения – тельца Гварниери; вирусы герпеса и аденовирусы (ОРЗ и др.) – внутриклеточные включения. Бляшки или «негативные» колонии, участки разрушенных вирусами клеток, культивируемых на питательной среде под агаровым покрытием, видимые невооруженным глазом светлые пятна на фоне окрашенных живых клеток. Один вирион образует потомство в виде бляшек.

«Негативные» колонии разных вирусов отличаются по форме, размеру, их используют для дифференциации и определения их концентрации в исследуемом материале.

Реакция гемадсорбции – способность культур клеток, инфицированных вирусом, адсорбировать на своей поверхности эритроциты; изменяется цвет индикатора в питательной среде. Если вирусы не размножаются в культуре клеток, живые клетки выделяют кислые продукты, что ведет к изменению рН среды и цвета индикатора. Если размножаются вирусы, клетки гибнут и среда сохраняет свой цвет.

### **б) Репродукция вирусов**

Существует три типа взаимодействия вируса с клеткой:

- 1) **продуктивный** цитоцидный когда в зараженной клетке образуется новое поколение вирионов;
- 2) **абортивный** – прерывается инфекционный процесс в клетке, новые вирионы не образуются
- 3) **интегративный, вирогения**, - когда вирусная ДНК встраивается (интегрируется) в виде провируса в хромосому клетки, и вирус и клетка совместно сосуществуют.

Продуктивный тип взаимодействия вируса с клеткой предполагает размножение, т.е. репродукцию вирусов, которая проходит несколько стадий: (Рис. 12).

1. адсорбция вирионов на клетке;
2. проникновение вируса в клетку;
3. «раздевание» и высвобождение вирусного генома – депротенизация вирусов;
4. биосинтез компонентов вируса;
5. «сборка», формирование вирусов;
6. выход вирионов из клетки.

**Эти стадии у различных вирусов различаются.**

1) Адсорбция вирионов – начинается с прикрепления вириона к поверхности клетки; вирусы поражают определенные клетки, проявляя тропизм (от гр. tropos направление). Вирусы, избравшие для репродукции (размножения) клетки печени, называются гепатотропными, нервные – нейротропными. Адсорбция обеспечивается взаимодействием белков поверхностных структур вирионов со специфическими рецепторами чувствительных клеток. Таких рецепторов на поверхности 1-клетки может быть от 10 до 100 000, по этому на ней могут адсорбироваться десятки и сотни вирионов. Так для миксовирусов рецепторами являются мукопротеиды, для арбовирусов – липиды.

2) Проникновение в клетку вирусов путем виропексиса или слияния оболочки вируса с клеточной мембраной или обоими путями. При виропексисе – вирус захватывается, заглатывается клеткой, происходит впячивание клеточной мембраны, поглощение вириона и образование внутриклеточной вакуоли с вирусом внутри. Если вирус имеет белок

слияния, то он проникает в клетку через плазматическую мембрану в результате слияния с ней происходит депротеинизация поверхностных структур вириона.

3) «Раздевание» вириона происходит в процессе проникновения вириона в клетку плюс участием ферментов. Конечными продуктами «раздевания» могут быть нуклеиновая кислота, нуклеокапсид (нуклеопротеин) или сердцевина вириона, которые не только не препятствуют экспрессии (усилению) вирусного генома, а более того, защищают его от клеточных протеаз и регулируют последующие процессы.

4) Биосинтез компонентов вируса.

Следующая стадия репродукции – биосинтез белков и нуклеиновых кислот вируса, этот биосинтез разобщен во времени и пространстве; осуществляется в разных частях клетки, такой способ размножения

называется дизъюнктивным (от лат. *disyunctus* - разобщенный). Белки вируса синтезируются в результате транскрипции, т.е. переписывания информации с генома вируса на информационную РНК (и РНК) и последующей трансляции с образованием белка вируса. Транскрипция осуществляется с помощью ферментов полимераз (транскриптаз) вируса или клетки. Синтез белка различен у ДНК и РНК – вирусов и состоит из стадий:

а) для ДНК содержащих вирусов: ДНК вируса – транскрипция и РНК – трансляция белка вируса;

б) для РНК – содержащих минус – нитевых вирусов (минус-геномных): РНК вируса – транскрипция и РНК – трансляция белка вируса;

в) для РНК – содержащих плюс – нитевых вирусов (плюс-геномных): РНК вируса – трансляция белка вируса;

г) для РНК – содержащих ретровирусов: РНК – вируса – комплементарная ДНК – транскрипция и РНК – трансляция белка вируса.

Нуклеиновая кислота вируса кодирует синтез неструктурных и структурных белков. Неструктурные белки – это ферменты, ответственные за репродукцию вируса. Структурные белки – составные части вириона: геномные (связанные с геномом вируса), капсидные и оболочки.

Одновременно происходит и репликация (от лат. *replicatio* – повторение), т.е. синтез нуклеиновых кислот, являющихся копией исходных вирусных геномов.

5) Формирование вирионов – происходит путем самосборки – составные части вириона транспортируются в места сборки вируса – участки ядра, цитоплазмы. Результатом самосборки капсомеров из полипептидов вируса и взаимодействия их с нуклеиновыми кислотами вируса являются нуклеокапсиды (нуклеопротеины) простых вирусов. Сложные вирусы содержат нуклеокапсид – сердцевину, окруженную оболочкой, суперкапсидом, содержащим наряду с белками вируса компоненты мембран клетки.

б) Выход вирионов из клетки – этим процессом заканчивается репродукция вирусов, реализуется двумя основными типами выхода вирионов из клетки:

1 тип – это взрывной: из погибающей клетки одновременно выходят большое количество вирионов (этот тип для простых вирусов);

2 тип – почкование (для сложных вирусов). Сформировавшаяся почка отделяется от клетки в виде сложноустроенного вируса. Клетка остается длительное время жизнеспособной и продуцирует потомство вирусов.

Полный цикл репродукции вирусов 5-6 часов (для вируса гриппа) или несколько суток (Рис.18)



Рисунок 18– Репродукция вируса гепатита С

Кроме продуктивного типа взаимодействия есть еще вирогения вируса и клетки, их сосуществование, это интегративный тип взаимодействия. Для него характерно интеграция нуклеиновой кислоты вируса в геном клетки, репликация и функционирование вирусного генома как части генома клетки. Интегративный тип характерен для умеренных ДНК-содержащих бактериофагов, онковирусов и некоторых инфекционных вирусов (гепатит В, ВИЧ и др.). Встроенная в хромосому клетки ДНК вируса называется провирусом (ДНК-провирус), он реплицируется в составе хромосомы и переходит в геном дочерних клеток, вирогения наследуется, но при определенных условиях (физический или химический фактор) может исключаться из хромосомы клетки и переходить в автономное состояние по продуктивному типу взаимодействия с клеткой. Дополнительная генетическая информация провируса при вирогении сообщает клетке новые свойства, что может быть причиной возникновения опухолей, аутоиммунных и хронических заболеваний.

### **Бактериофаги**

Бактериофаги – вирусы бактерий (от греч. *phagos* – пожирающий) проникают в бактерии и лизируют их, есть почти у всех бактерий и некоторых грибов.

а) Морфология и химический состав. Имеют форму сперматозоидов, сферическую, кубическую, нитевидную. Размеры 20-800 нм. Похожие на сперматозоиды фаги состоят из головки икосаэдрического типа, содержащей нуклеиновую кислоту, и хвостового отростка. (Рис. 19).

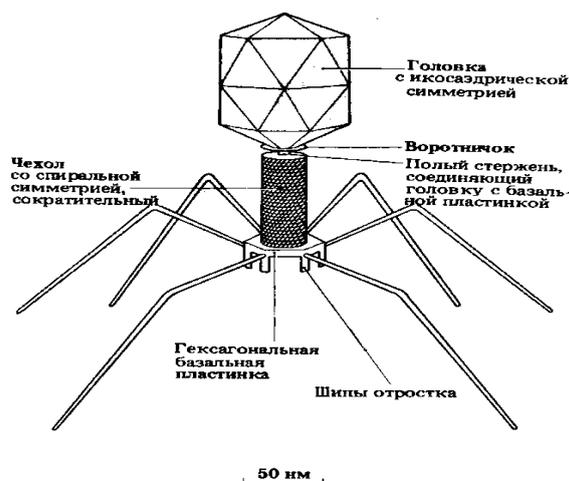


Рисунок 19– Строение бактериофага

### Строение бактериофага

Капсид головки и чехол состоят из полипептидных субъединиц. Хвостовой отросток полый в виде стержня (трубки) и сообщается с головкой, заканчивается базальной пластинкой, от которой отходят фибриллы. Чехол может сокращаться или не сокращаться, отростки разные по длине или их нет. Бактериофаги содержат ДНК или РНК. ДНК – в основном двунитевая, замкнутая в кольцо, есть и однонитевые. Структурные белки уложены по спиральному или кубическому типу, внутренние геномные белки связаны с нуклеиновой кислотой, ферменты лизоцим и АТФ-аза.

б) Бактериофаги более устойчивы во внешней среде, чем бактерии. Этиловый спирт, фенол, эфир не инактивируют их, но к формалину и кислотам высокочувствительны. Устойчивы к низким температурам и высушиванию, инактивируют при 65-70<sup>0</sup>С.

в) Взаимодействие с бактериальной клеткой. Различают вирулентные и умеренные фаги. Вирулентные бактериофаги в клетке реплицируются, формируя 200-300 фаговых частиц, вызывают гибель – лизис бактериальной клеткой. Взаимодействие бактериофагов с клеткой аналогично взаимодействию вирусов человека с клеткой хозяина. Чехол хвостового отростка сокращается, стержень с помощью лизоцима, растворяя оболочку клетки, просверливает её и нуклеиновая кислота из головки инъецируется в клетку, а капсид остается снаружи. Нуклеиновая кислота подавляет биосинтез компонентов клетки, заставляя её синтезировать нуклеиновую кислоту и белки бактериофага. Образовавшиеся в разных частях бактериальной клетки компоненты бактериофага собираются в фаговые частицы путем заполнения фаговой нуклеиновой кислотой пустотелых капсидов головки. Затем в результате лизиса клетки бактериофаги выходят из неё. От адсорбции фага на клетке до выхода из неё проходит 20-40 мин. По специфичности взаимодействия с бактериальной клеткой различают поливалентные (взаимодействуют с родственными видами бактерий), моновалентные (взаимодействуют с бактериями одного вида), типовые

(взаимодействуют с вариантами бактерий данного вида).

Умеренные бактериофаги: не разрушают клетку, т.к. ДНК фага встраивается в ДНК хромосому бактерий и передается по наследству. Фаг интегрирует с хромосомой бактериальной клетки. Такой фаг, встроенный в ДНК бактериальной клетки, называется профагом, а бактерия – лизогенной. Сосуществование бактерий и умеренного бактериофага называется лизогенией. Лизогенная, фаговая конверсия заключается в приобретении лизогенными бактериями дополнительных свойств.

### **Медицинское значение фагов**

Бактериофаги применяют в диагностике для идентификации бактерий, для установления источника инфекции (эпидемиологическое маркирование). Проводят фаготипирование: на чашку с чистой культурой возбудителя наносят капли диагностических бактериофагов. При наличии чувствительности возбудителя к фагу образуется стерильное пятно вследствие лизиса бактерии.

Бактериофаги применяют для лечения и профилактики заболеваний.

## **2. Основные методы диагностики вирусных инфекций Применяют три основных метода:**

1. вирусологическая диагностика — основана на выделении вируса из исследуемого материала и его идентификации;

2. серологическая диагностика-выявление с помощью диагностикумов противовирусных антител в сыворотке крови, т.е. определение специфических иммунологических изменений в организме под действием вирусов;

3. молекулярно-генетическая диагностика — обнаружение в исследуемом материале с помощью зондов (гибридизация НК) или ПЦР фрагментов НК вирусов — возбудителей.

### **Вирусологический метод лабораторной диагностики**

#### **а) Работа с клеточными культурами**

Вирусы — внутриклеточные паразиты, размножаются только в живых системах: культуре клеток, куриных эмбрионах или чувствительных животных. Наиболее трудоемкой является работа с клеточными культурами.

Используют первичные, полуперевиваемые (диплоидные) и перевиваемые клеточные культуры.

Первичные клеточные культуры получают из эмбриональной ткани человека или животного, хорошо растут и размножаются. Культуры клеток готовят чаще всего из смеси нескольких тканей, разрушают их межклеточное вещество протеолитическими ферментами. Диспергированные (разобщенные) клетки, помещенные в питательную среду, способны прикрепляться к поверхности культурального сосуда и размножаться, образуя монослой — толщиной в одну клетку. Клетки можно снять с

поверхности одного сосуда и пересадить в другой (произвести пассаж). Способность к делению и размножению у первичных культур ограничена 5-10 пассажами.

Перевиваемые (пассажные) клеточные культуры выдерживают неограниченное число пассажей, их получают из опухолевых клеток, утративших способность к дифференциации, но не утративших способность к неограниченному росту. Перевиваемые (стабильные) клеточные культуры сохраняют замороженными в жидком азоте и при необходимости используют в исследовательской работе и для проточного культивирования клеточной массы при производстве вакцин.

Полуперевиваемые (диплоидные) культуры – иногда формируется в результате нескольких последовательных пассажей. Диплоидная культура – популяция фибробластоподобных клеток, способных к быстрому размножению, выдерживают до 30-60 пассажей и сохраняют исходный набор хромосом. Диплоидные клетки человека высокочувствительны ко многим вирусам, находят широкое применение в вирусологии, занимают промежуточное положение между первичными и перевиваемыми клеточными культурами.

Для культур клеток готовят сложные питательные среды – ростовые и поддерживающие. Так вкратце готовят культуры живых клеток для культивирования вирусов.

б) Взятие и подготовка материала для вирусологической диагностики. Исследуют содержимое пустул, везикул, соскобы эпителия, спинномозговую жидкость, смывы из верхних дыхательных путей, фекалии, мазки. Пробы берут асептически, чтобы исключить попадания посторонней микрофлоры и не инфицировать себя; пересылают их в контейнерах с сухим льдом; хранят при температуре – 70<sup>0</sup>С. Мазки и соскобы хранят в стабилизирующей среде, питательном растворе Хенкса с инактивированной сывороткой и антибиотиками для подавления сопутствующей микрофлоры.

В пробирки с монослоем культуры клеток вносят 0,1-0,2 мл материала для вирусологического исследования, через час после заражения вносят поддерживающую среду и культивируют при 37<sup>0</sup>С.

В куриные эмбрионы (6-15 дневные) вирусосодержащий материал вводят шприцем на ХАО (хорионаллантоисную оболочку), в желточный мешок, полости амниона и аллантоиса. Скорлупу обрабатывают йодом спиртом. Поврежденные участки заливают стерильным парафином или коллодием.

Экспериментальные животные в вирусологии применяют для:

- а) диагностики вирусных инфекций;
- б) получения иммунных противовирусных сывороток и ингредиентов крови (эритроцитов, плазмы, лейкоцитов и т.д.);
- в) моделирования вирусных инфекций для изучения патогенеза, иммунитета и т.д.;
- г) разработки способов специфической и неспецифической профилактики и лечения.
- в) Индикация вирусов.

Полученный выше изложенными способами вирус в живой системе называют вирусосодержащим материалом.

В культуре клеток вирусы обнаруживаются по ЦПД (цитопатическому действию), дегенеративному изменению в клетках, которые появляются в результате репродукции в них вирусов. Характер ЦПД зависит от вида вируса.

При полной дегенерации клетки монослоя подвергаются значительным изменениям, большая часть их слущивается со стекла, остающиеся единичные клетки сморщены из-за пикноза ядра и цитоплазмы. При микроскопии наблюдается сильное свечение, двойное лучепреломление. Полная дегенерация клеток характерна для вируса полиомиелита, Коксаки и ЕСНО. При частичной дегенерации имеет место 1) гроздеобразование – клетки округляются, увеличиваются, частично сливаются между собой, образуют гроздья (аденовирусы); 2) очаговая деструкция – появляются на фоне монослоя очаги пораженных клеток – микробляшки (вирусы гриппа, оспы); 3) симпластобразование – под действием вирусов клетки сливаются между собой с образованием огромных многоядерных клеток – симпластов, синтициев (вирусы герпеса, ВИЧ, кори и др.).

Пролиферативный тип изменений клеток характерен для некоторых онковирусов, проявляется в способности клеток неограниченно делиться.

Выявление вирусов по реакции гемадсорбции РГадс. Сложные вирусы в составе суперкапсида имеют специфические гликопротеиды – гемагглютинины (парамиксовирусы, ортомиксовирусы). При добавлении в культуру клеток после определенного срока инкубации вируса взвеси эритроцитов наблюдается скопление эритроцитов на отдельных клетках или на всем монослое (результат учитывают под малым увеличением микроскопа). На зараженных вирусом клетках эритроциты отсутствуют.

Не всегда реакция гемадсорбции *in vitro* вызывает гемадсорбцию в культуре клеток, а только тогда, когда в процессе взаимодействия вируса с клеткой вирусный гемагглютинин встраивается в структуру наружной клеточной мембраны и изменяет ее свойства.

### **Выявление вируса по цветной пробе**

В результате жизнедеятельности клеток в среде накапливаются кислые продукты. Цвет индикатора в среде (феноловый красный) становится оранжевым. При заражении культуры клеток цитопатогенными вирусами (реовирусы, энтеровирусы) метаболизм клеток подавляется, рН среды и ее цвет не изменяются, остается красной.

### **Выявление вируса по внутриклеточным включениям**

Вирусы оспы, бешенства, гриппа, герпеса и др. образуют при репродукции внутриклеточные включения в ядре и цитоплазме.

Включения видны при микроскопии после окрашивания монослоя по Романовскому-Гимзе, а также при люминисцентной микроскопии после обработки акридиновым оранжевым (1:2000).

## **Электронная микроскопия вирусов**

Позволяет выявить вирус в отдельных клетках и скопления вирионов в ядре или цитоплазме для вирусов с типичной морфологией (вирус оспы).

## **Выявление с помощью прямой РИФ**

Происходит взаимодействие вирусных антигенов с антителами диагностической иммунной сыворотки или моноклональными антителами. С помощью РИФ можно обнаружить специфический вирусный антиген в культурах клеток, инфицированных вирусом.

## **Выявление вирусов по образованию бляшек**

Бляшки представляют собой очаги разрушенных вирусом клеток монослоя под агаровым покрытием. По количеству бляшек судят об активности вирусов, его концентрации. Для получения бляшек на однослойные культуры ткани в плоских флаконах или чашки Петри наносят разведение вирусной суспензии и покрывают их слоем агарового покрытия.

Репродукция вируса и ЦПД ограничиваются первоначально инфицированными и соседними с ними клетками. Очаги дегенерации клеток

– «бляшки» выявляют путем окрашивания культуры нейтральным красным, который входит в состав агарового покрытия или добавляют индикатор перед учетом результатов. Бляшки состоят из погибших клеток, не окрашиваются, выглядят в виде светлых пятен на фоне красного монослоя. Один вирион образует потомство в виде одной бляшки. «Негативные» колонии разных вирусов отличаются по размеру, форме. Метод бляшек используют для дифференциации вирусов и для определения их концентрации.

Обнаружение вирусов в куриных эмбрионах. Зараженные эмбрионы культивируют при 35-37<sup>0</sup>С в течение 48-72ч. Затем яйца охлаждают при 4<sup>0</sup>С в течение 18 часов и асептически вскрывают.

При репродукции вирусов появляются характерные изменения на ХАО. Вирусы нат. оспы, простого герпеса образуют бляшки – выпуклые белые пятна (1-2мм) по числу инфекционных частиц.

**Реакция гемагглютинации – РГА** (для ортомиксовирусов и парамиксовирусов). Показателем накопления этих вирусов является гемагглютинация (склеивание) куриных или других эритроцитов аллантоисной и амниотической жидкостью зараженных куриных эмбрионов. Вирусы содержат поверхностные структуры гемагглютинины, ответственные за агглютинацию эритроцитов. РГА не является иммунологической, т.к. здесь нет взаимодействия АГ+АТ=ИК (им. комплекс).

Результаты РГА зависят от многих факторов, в т.ч. и от некоторых микроорганизмов — стаф., эшерихии, шигеллы, хол. вибр. эль-тор, которые вызывают гемагглютинацию. Это надо иметь в виду.

## **Обнаружение вирусов в организме животных**

В зависимости от вида животного и типа вируса способы обнаружения вируса в организме чувствительных животных различаются и будут рассмотрены при диагностике отдельных инфекций.

### **Методы идентификации выделенных вирусов**

Проводят по следующим признакам:

- а) патологическим изменениям в чувствительных живых системах;
- б) антигенным свойствам вирусов в серологических реакциях с противовирусными видовыми и типовыми сыворотками (основная и точная идентификация);
- в) наличию НК в ПЦР;
- г) результатам исследования морфологии вирусов при электронной микроскопии.

### **Идентификация по антигенной структуре**

Реакция нейтрализации РН основана на нейтрализации инфекционной активности вирусов при связывании со специфическими антителами.

Готовят серийные разведения из вируссодержащего материала и добавляют к ним специфическую сыворотку. Смесь вирус-сыворотка инкубируют при 37<sup>0</sup>С в течение 1ч. После этого заражают культуру ткани, куриные эмбрионы, животных. Контроль — живая система, зараженная вирусом. Реакция положительная, если подавляется ЦПД в культуре клеток, нет бляшкообразования, патологических изменений в эмбрионах и животных.

**Цветная проба** — один из вариантов РН. При положительной реакции противовирусные антитела блокируют размножение вируса в культуре клеток и метаболиты клеток изменяют цвет индикатора.

### **Реакция торможения гемагглютинации РТГА**

Блокируют вирусные гемагглютинины специфическими антителами. Можно рассматривать как один из вариантов РН. РТГА используют как для серологической диагностики, так и для идентификации гемагглютинирующих вирусов. Образуется компактный осадок эритроцитов вместо «зонтика» гемагглютинации. Реакцию проводят на полистироловых пластинах и оценивают по отсутствию склеивания эритроцитов, добавленных к смеси вируса и специфической сыворотки.

### **Контрольные вопросы к лекции**

- 1.Строение и классификация вирусов.
  - 2.Основные методы диагностики вирусных инфекций.
  - 3.Вирусологический метод диагностики вирусных инфекций.
- Клеточные культуры: первичные, перевиваемые, полуперевиваемые.
- 4.Взятие материала для диагностики, его подготовка, инфицирование культуры клеток, куриных эмбрионов и животных, индикация вирусов.

5. Методы идентификации вирусов (ПЦР, электронная микроскопия). Серологические методы (ИФА, РИФ).

#### **Раздел 4. Частная вирусология Лекция 8. Частная вирусология**

##### **План лекции**

1. Грипп
2. ОРВИ
3. Характеристика энтеровирусов.
4. Характеристика дерматропных вирусов: герпесвирусы; натуральной оспы, кори, краснухи.
5. Характеристика арбовирусов; вирус клещевого энцефалита. РСК для диагностики клещевого энцефалита.
6. Вирус бешенства
7. Вирусы гепатитов *A, B, C, D, E, G*.
8. Возбудители МВИ
9. Онкогенные вирусы и ретровирусы
10. ВИЧ – инфекция

##### **Вирус гриппа**

**Грипп** – острая массовая вирусная инфекция, характеризующаяся поражением в основном верхних дыхательных путей. Возбудитель гриппа серотипы *A, B, C*.

**Таксономия.** Вирус гриппа относится к сем. *Orthomyxoviridae* роду *Influenzavirus*, различают 3 типа *A, B, C*. Вирус типа *A* обнаружен у человека, млекопитающих и птиц, имеет наибольшее значение; типом *B* и *C* болеют дети.

**Структура вируса гриппа А.** Имеет одноцепочечную РНК из 8 фрагментов. Сегментированность позволяет двум вирусам легко обмениваться генетической информацией, и это определяет высокую изменчивость вируса. Капсомеры вокруг РНК уложены по спиральному типу, оболочка липопротеиновая с шипами. Полиморфны: сферические, палочковидные, нитевидные.

**Антигенная структура вируса А.** Внутренний антиген из РНК и белков капсида (рибонуклеопротеины) определяют серотип вируса – *A, B, C*, стимулируют Т-киллеры и макрофаги; хотя и образуются на него антитела, но не обладают защитным действием. Поверхностные антигены – гликопротеиновые отростки – выполняют функции гемагглютина (*H*) и нейраминидазы (*N*). Поверхностные антигены определяют 3 подтипа вируса *A*: *A1(H1N1)*, *A2(H2N2)*, *A3(H3N2)*; внутри каждого подтипа множество поверхностных антигенных вариантов, вызывающих образование защитных антител. Поверхностные антигены участвуют в репродукции вируса: гемагглютинин способствует прикреплению вируса и склеиванию эритроцитов, его в 5 раз больше чем нейраминидазы, последняя способствует

выходу вируса из клетки. Гемагглютинин и нейраминидаза определяют патогенность вируса. (Рис. 20).

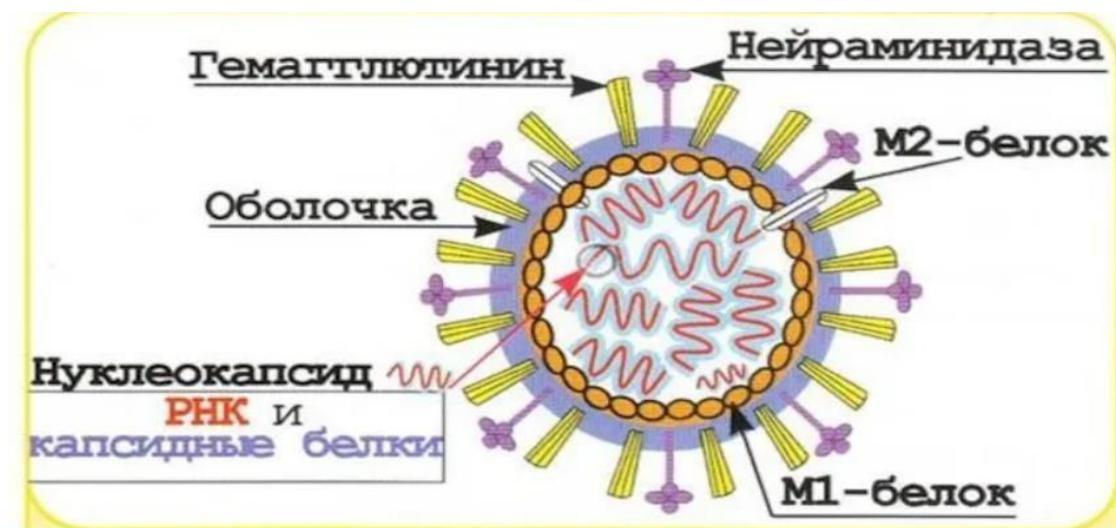


Рисунок 20– Строение вируса гриппа А

### **Антигенная изменчивость вируса гриппа А.**

Различают два вида антигенной изменчивости: шифт – значительные изменения в результате рекомбинации (между двумя вирусами человека, или вирусами человека и животных или птиц), приводящие к образованию новых подтипов вируса; дрейф – изменения в результате точечных мутаций, приводящие к возникновению новых антигенных вариантов вируса. Из-за постоянной изменчивости вируса трудно прогнозировать какая антигенная разновидность вызвала заболевание, поэтому и вакцины малоэффективны.

Вирус *B* изменяется по типу дрейфа. Вирус *C* – его РНК состоит из 7фрагментов, малоизменчив и не имеет *N*-антигена.

**Культивирование.** Лабораторные животные, куриные эмбрионы, культура клеток.

**Резистентность.** Чувствителен к высоким температурам, дезинфицирующим веществам. Устойчив к низким температурам.

**Эпидемиология.** Источник инфекции – больные; заражение – воздушно-капельным путем, реже контактным. Восприимчивость высокая.

Эпидемии зимой, продолжительность их 3-6 нед.

Каждую пандемию вызывает подтип вируса *A*, каждую эпидемию – новый антигенный вариант одного подтипа. В последние годы от больных выделяют вирусы гриппа *A(H3N2)*, *A(H1N1)*. Эпидемии гриппа *B* повторяются реже, в 4-7 лет.

**Патогенез.** Входные ворота – верхние дыхательные пути. В слизистой оболочке размножаются, вызывая гибель клеток. Воспалительный процесс охватывает респираторный тракт. Поражаются сердечно-сосудистая, дыхательная, нервная, иммунная и др. системы. Возникают различные бактериальные осложнения из-за вторичного иммунодефицита. Тяжесть болезни зависит от состояния макроорганизма.

**Клиническая картина.** Инкубационный период при гриппе *A* 24-48 часов, при *B* – 72 часа. Заболевание начинается с повышения  $t$  до  $39-40^{\circ}\text{C}$ , головной боли, боли в мышцах, суставах, появляются насморк, кашель, боль в горле. Продолжительность болезни 7 дней. Осложнения – кровотечения, пневмония бактериальная и геморрагическая (причины смерти) и др. Возможно бессимптомное течение болезни.

**Иммунитет.** Специфичный, но создается впечатление кратковременности.

**Микробиологическая диагностика.** Материал – слизь и смыв из носоглотки, сыворотка крови. Вирусологический метод, серологические реакции (РТГА, РСК), РИФ и ПЦР.

**Лечение.** Ремантадин (грипп *A*), арбидол (грипп *A* и *B*), лейкоцитарный интерферон, иммуноглобулины – противогриппозный. Не рекомендуется снижать  $t$ , т.к. при  $t$   $38-39^{\circ}\text{C}$  вырабатывается максимальное количество интерферона. Не следует применять аспирин (снижает свертываемость крови).

**Профилактика.** Применение вакцины: живые, убитые, химические или сплит-вакцины («расщепленные»), но из-за высокой изменчивости вируса малоэффективны. При частой вакцинации возможны осложнения, параличи. Неспецифическая профилактика – закаливание; использование масок.

**Сплит вакцины** – высокоочищенные, с полным набором антигенов, но без липидов внешней оболочки (для уменьшения пирогенного эффекта).

## 1. ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции

Возбудителями их являются более 150 разновидностей вирусов. Наряду с гриппом они занимают первое место по распространенности, поражают верхние дыхательные пути.

Некоторые бактерии – легионеллы вызывают заболевания, похожие на ОРВИ, «острое респираторное заболевание» - ОРЗ – это бактериальные заболевания.

**Таксономия и классификация возбудителей ОРВИ РНК-содержащие вирусы.**

I сем - *Paramyxoviridae* – вирусы парагриппа, похожие на вирусы гриппа человека (5 серотипов) и респираторно-синтициальный вирус (РС).

II сем – *Picornaviridae* (от ит. *piccolo*-маленький и англ. *rna*-РНК), включает 7 серотипов энтеровирусов Коксаки и ЕСНО, поражают дыхательные пути, и 120 серотипов риновирусов.

III сем – *Reoviridae* (от англ. *respiratory, enteric*) – включает 3 серотипа, вызывающих заболевание респираторного и ЖК трактов.

IV сем – *Coronaviridae* (от лат. *corona*-корона) – 3 серотипа, поражает респираторный и ЖК тракты.

**ДНК-содержащие вирусы.**

V сем – *Adenoviridae* (выделены из удаленных аденоидов у детей), поражают глаза, кишечник, мочевой пузырь. Три типа вызывают ОРВИ.

### **Структура и антигенные свойства.**

Эти вирусы различны по структуре, форме, свойствам. Антигенами являются белки капсида и липопротеиновые отростки липопротеиновой оболочки.

**Культивирование.** На культуре клеток.

**Резистентность.** ОРВИ как у вирусов гриппа.

**Эпидемиология.** Источник ОРВИ больные; заражение воздушно-капельным путем через дыхательный тракт. Называют ОРВИ простудными заболеваниями, т.к. наблюдаются в холодное время года.

**Патогенез.** Входные ворота – верхние дыхательные пути, размножаются в клетках слизистой оболочки, вызывают воспалительный процесс. Токсигенные продукты распада вирусов и клеток организма воздействуют на различные системы, в том числе и на иммунную, вызывая вторичные иммунодефициты.

**Клиническая картина.** Инкубационный период 1-4 дня, повышения  $t$  может и не быть, головная боль, насморк, кашель, слабость. Продолжительность болезни 7 дней, но легче протекает чем при гриппе. Дети тяжелее болеют (bronхи, легкие – воспаление). Вирус парагриппа вызывает отек гортани, вирус РС – пневмонию. Бактериальные осложнения как следствие иммунодефицита.

**Иммунитет.** Непродолжительный, кроме аденовирусной инфекции.

**Микробиологическая диагностика** заключается в дифференциации ОРВИ от гриппа и ОРЗ, вызываемых бактериями. Исследуют слизь или смыв из носоглотки, с помощью вирусологического или серологического методов, РИФ, ПЦР; экспресс-методы.

**Лечение.** Симптоматическое.

**Профилактика.** Неспецифическая.

### **Характеристика энтеровирусов**

**Энтеровирусы** – группа вирусов, обитающая в кишечнике человека и вызывающая разнообразные болезни.

**Таксономия.** Энтеровирусы – РНК-содержащие. Сем. *Picornaviridae*, рода *Enterovirus*. К ним относятся патогенные для человека вирусы полиомиелита (3 серо типа), Коксаки А (2 серотипа) и В (29 серо типов), кишечные цитопатогенные *ECHO* (31 серо тип) и энтеровирусы (68-71 серо тип).



Рисунок 21– Строение вируса Коксаки

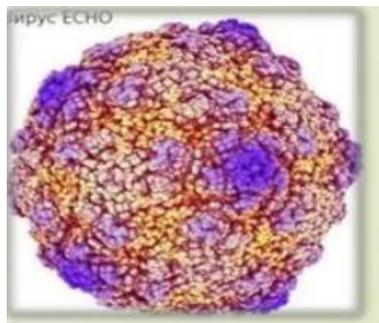


Рисунок 22– Строение вируса ЕСНО

**Морфология и химический состав.** Энтеровирусы самые мелкие, сферической формы, однонитевые плюс РНК, простые, с икосаэдрическим типом симметрии. ( Рис. 21, 22).

**Культивирование** – в культурах клеток, репродукция в цитоплазме клеток, сопровождается цитопатическим эффектом; образуют бляшки в культурах клеток под агаровым покрытием.

**Антигенная структура.** Антигены общие группоспецифические и типоспецифические.

**Резистентность.** Энтеровирусы устойчивы к факторам окружающей среды (месяцами сохраняются) и дезинфектантам. Погибают под действием УФ-лучей, окислителей, формалина; при кипячении – в течение нескольких секунд.

**Эпидемиология.** Болеют все, особенно дети. Источник инфекции – больные и носители, выделяющие возбудителя с носоглоточной слизью и фекалиями. Передаются через воду, пищу, почву, предметы обихода и т.д. Вспышки болезни в летние месяцы. Передача – воздушно-капельным путем в первые две недели.

Возбудители инфекции через слизистые оболочки носоглотки и тонкой кишки проникают в организм, размножаются в их эпителиальных клетках и лимфоузлах, попадают в кровь и распространяются.

**Клиническая картина.** Энтеровирусы вызывают заболевания различных органов и тканей: ЦНС (полиомиелит, менингиты, энцефалиты), мышечной мускулатуры (миалгия, миокардит), органов дыхания (ОРЗ), пищеварительного тракта (гастроэнтериты, диарея), кожных и слизистых покровов (конъюнктивиты, сыпь) и др.

**Иммунитет.** Стойкий, типоспецифический.

**Лабораторная диагностика.** Исследуемые смывы с носоглотки, фекалии, спинномозговая жидкость, кровь, сыворотку, мочу, асцитическую жидкость, содержимое везикул, кусочки разлагающей ткани (посмертно)  
Методы – вирусологический и серологический с парными сыворотками в начале болезни и в разгар.

**Лечение.** Патогенетическое – противовирусные препараты, интерферон и др.

**Профилактика.** Неспецифическая – выявление и изоляция больных, санитарный надзор в окружающей среде, за работой пищевых предприятий и др.

### Характеристика дерматропных вирусов) Герпесвирусы

**Герпес** – хроническое рецидивирующее заболевание, характеризуется поражением кожи, слизистых оболочек, ЦНС и внутренних органов, персистенцией и рецидивами.

**Таксономия.** ВПГ – *Herpes simplex*, относится к сем. *Herpesviridae*, роду *Simplexvirus*, ДНК-содержащий, сложный. (Рис. 23).

Классификация герпесвирусов и вызываемые ими заболевания:  $\alpha$  – герпесвирусы – ВПГ – 1, ВПГ- 2, вирус ветряной оспы (у детей), вирус опоясывающего лишая;  $\beta$ - герпесвирусы – цитометаловирус (поражает ИКК, почки и др. органы);  $\gamma$  – герпесвирусы - вирус ЭБ(Эпштейна-Барр): лимфома Беркитта, инфекционный мононуклеоз, назофарингеальная карцинома; нетипируемые вирусы: ВГЧ(6), ВГЧ (7), ВГЧ(8)-саркома Капоши.

**Морфология и антигенные свойства.** Сходны с вирусами оспы и опоясывающего герпеса. Различают 8 антигенных типов ВПГ, из них 1-2 типы – человека.

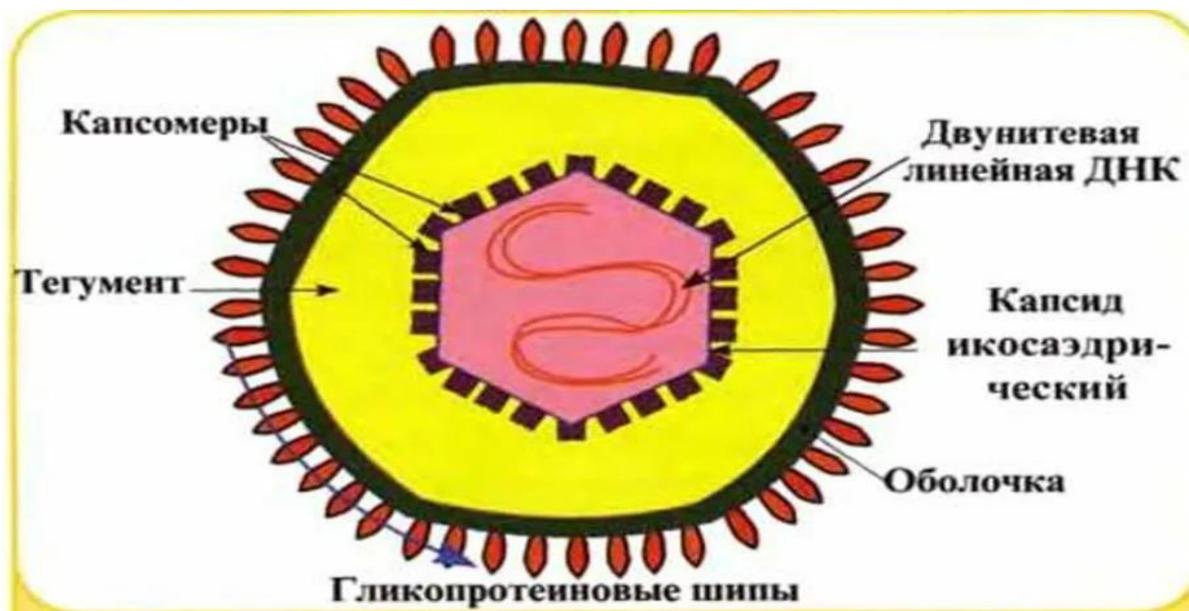


Рисунок 23– Строение Герпесвируса

**Культивирование.** На куриных эмбрионах и культуре клеток.

**Резистентность.** Неустойчив.

**Эпидемиология.** Источник инфекции – больной или носитель. Передается контактным путем, через предметы обихода, воздушно-капельным путем, через плаценту, при рождении ребенка. Возможны рецидивы. ВПГ 1 типа поражает слизистые оболочки ротовой полости, вызывает энцефалиты, ВПГ 2 типа – гениталии.

**Патогенез.** Простой герпес различают первичный и рецидивирующий. При первичном герпесе, вирус попав на слизистые оболочки и кожу, размножается, поражает слизистые оболочки рта, глаз, носа, мочеполового тракта, разносится кровью в другие органы и ткани. Возможна латентная инфекция, 70-80% являются носителями вируса.

**Клиническая картина.** Инкубационный период 2-12 дней. Болезнь начинается с зуда, отека и пузырьков. После подсыхания последних рубцы не образуются.

ВПГ поражает кожу, слизистые оболочки рта, глотки (стоматит), кишечника, печень (гепатиты), глаза (кератит), ЦНС (энцефалиты и менингоэнцефалит). Считают, что ВПГ типа 2 может вызвать рак шейки матки.

**Иммунитет.** Клеточный.

**Лабораторная диагностика.** Материал для диагностики – содержимое везикул, слюна, кровь, спинномозговая жидкость и мозг при летальном исходе. Выделенный вирус идентифицируют в РИФ и ИФА с моноклональными антителами. Серодиагностика – в РСК, РИФ, ИФА, РН и ПЦР.

**Лечение.** Интерферон и химиопрепараты против вирусов.

**Специфическая профилактика.** Инактивированная герпесвакцина.

## **б) Вирус натуральной оспы**

**Натуральная оспа** – особоопасная высококонтагиозная болезнь, характеризуется тяжелым течением, лихорадкой и сыпью на коже и слизистых оболочках.

Болезнь ликвидирована в 1977 году, относилась к карантинным инфекциям. Вирус натуральной оспы – ДНК-содержащий, относится к сем. *Poxviridae*, пор. *Orthopoxvirus*, самый крупный из вирусов, имеет форму кирпича, размер 250-400 нм. ДНК-двухцепочечная, сердцевина в виде гантели, трехслойная оболочка. Вирус содержит липиды, углеводы и >30 белков. (Рис. 24).

**Антигены** – нуклеопротеиновый, гемагглютинин. Есть общие антигены с вирусом коровьей оспы (вакцина – из коровьей оспы).

**Культивирование** – в куриных эмбрионах (белые бляшки), в культуре клеток (тельца Гварниери).



Рисунок 24–Строение вируса натуральной оспы

**Резистентность.** Вирус устойчив к высушиванию, низким  $t$ , сохраняется долго в корочках пустул. При  $100^{\circ}\text{C}$  погибает моментально.

Восприимчивы обезьяны.

**Эпидемиология.** Натуральная оспа относится к карантинным инфекциям. Источник инфекции – больной. Инфицирование – воздушно-капельным и контактным путем, а также через вещи.

С 1977 г оспа в мире ликвидирована. Возбудитель хранится в специальных лабораториях России и США.

**Патогенез.** Вирус проникает через слизистые оболочки верхних дыхательных путей, через кожу, размножается в лимфоузлах и попадает в кровь, оттуда заносится в кожу и лимфоидные ткани, размножается, формируются очаги поражения в коже, слизистых оболочках и паренхиматозных органах.

**Клиническая картина.** Инкубационный период 7-17 дней. Болезнь начинается с высокой  $t$ , рвоты, головной и поясничной боли, появляется сыпь

– сперва розовые пятна, потом узелки – папулы с горошину, затем образуются пузырьки – везикулы и пустулы – гнойнички, которые подсыхают и образуются корки. После отпадения их на коже остаются рубцы

– рябины на лице.

Формы оспы: тяжелая (пустулезно-геморрагическая или черная оспа со 100% летальностью); среднетяжелая (рассеянная оспа); легкая (без сыпи).

**Иммунитет:** пожизненный.

**Лабораторная диагностика.** Условия работы как при особо опасных инфекциях. Исследуются содержимое сыпи, отделяемое носоглотки, пораженные органы, ткани, кровь. Экспресс-диагностика – электронная микроскопия (тельца Гварниери), РИФ и др. Посев в куриные эмбрионы, на культуры тканей. РСК, РТГА, РИ.

**Лечение.** Симптоматическое, индукторами интерферона и противовирусными препаратами.

**Специфическая профилактика.** Живая оспенная вакцина (из соскобов сыпи телят) или из культивированных вирусов на куриных эмбрионах. Вакцинация отменена с 1980г. в связи с ликвидацией оспы.

### в) Вирус кори

**Корь** острая болезнь, характеризующаяся лихорадкой, катаром слизистых оболочек в дп и глаз, сыпью на коже.

**Таксономия.** Возбудитель относится к РНК-содержащим, сем. *Paramyxoviridae*, роду *Morbillivirus*.

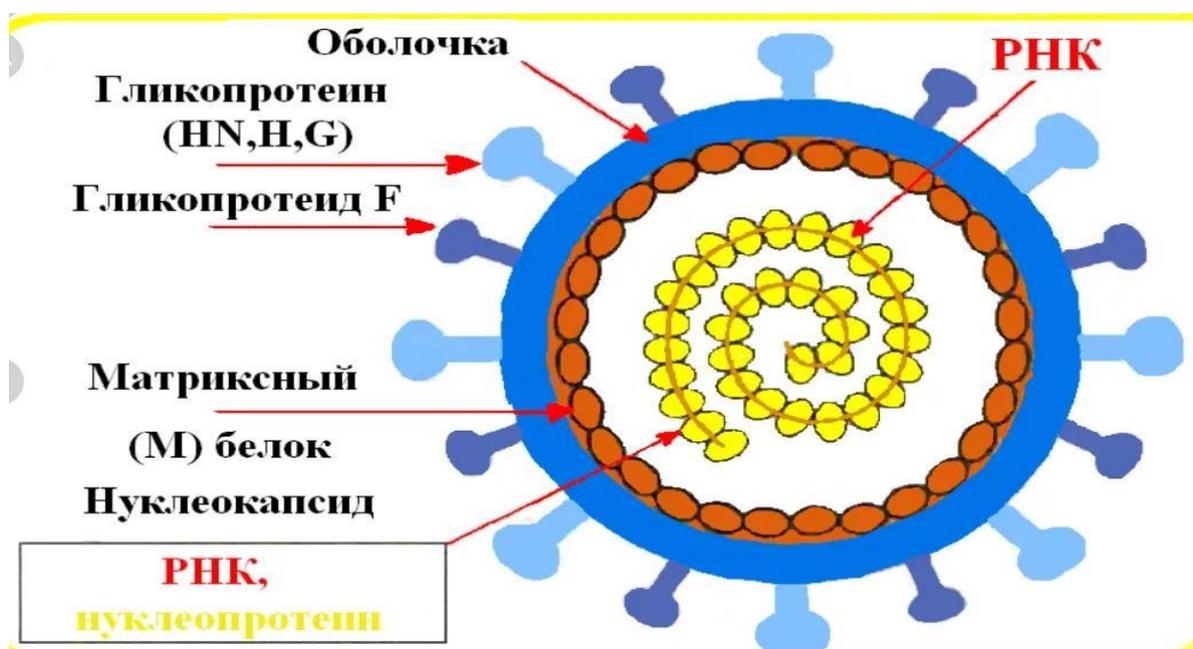


Рисунок 25– Строение вируса кори

**Морфология и антигенная структура.** Содержит однонитчатую РНК и белки. Сложного строения. ( Рис. 25).

**Культивирование.** В культуре клеток.

**Резистентность.** В окружающей среде нестойк.

**Эпидемиология.** Корь – антропонозная инфекция. Восприимчивость высокая; чаще болеют дети (4-5 лет). Источник инфекции больной. Механизм заражения – воздушно-капельный. Через 5 дней после появления сыпи больной не заразен.

**Патогенез.** Вирус через слизистые оболочки в дп и глаз попадает в подслизистую оболочку, лимфатические узлы, после размножения попадает в кровь и поражает сосуды.

**Клиническая картина.** Инкубационный период 11-25 дней. Болезнь начинается с повышения температуры, головной боли, недомогания. Воспаляются околоушные железы, возможно и слюнные.

Продолжительность болезни около недели. Осложнения – орхит, менингит, менингоэнцефалит, панкреатит. Возможно бессимптомное течение.

**Иммунитет.** Пожизненный.

**Микробиологическая диагностика.** Материал для исследования – слюна, цереброспинальная жидкость, моча, кровь. Вирусологический и серологический методы – РСК, РТГА, ИФА, РИФ.

**Лечение.** Специфической терапии нет.

**Профилактика.** Для специфической профилактики – моновакцина или ассоциированная вакцина против кори, паротита и краснухи для детей старше 1 года.

#### г) Вирус краснухи

**Краснуха (*rubella*)** – острая инфекционная болезнь детей, характеризуется кореподобной сыпью, увеличением лимфатических узлов, поражением плода.

**Таксономия.** Вирус РНК-содержащий, относится к сем. *Togaviridae*, роду *Rubivirus*.

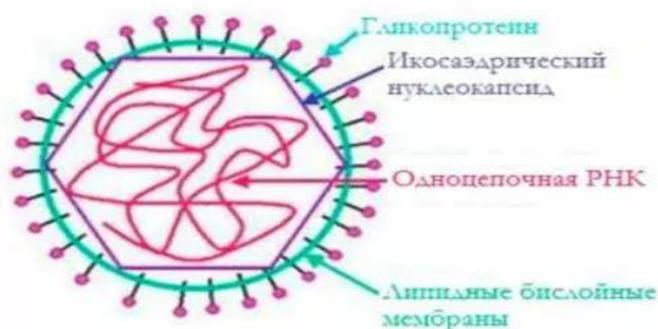


Рисунок 26– Строение вируса краснухи

**Морфология и антигенные свойства.** Вирус сферической формы. РНК-однонитевая, нуклеокапсидный белок, липопротеиновая оболочка с шипами. Имеет комплекс внутренних и наружных антигенов, гемагглютинины нейраминидазу. ( Рис. 26).

**Культивирование.** На культурах клеток образуют цитоплазматические включения, иногда лизис клеток.

**Резистентность.** Неустойчив во внешней среде. Восприимчивы обезьяны.

**Эпидемиология.** Болеют люди, восприимчивость высокая, чаще болеют дети 2-9 лет. Вирус выделяется с носоглоточным секретом, мочой, калом. Заражение воздушно-капельным путем. Больной заразен с появления признаков и в течение 5 дней от начала высыпания. Возможна передача от матери плоду.

**Патогенез.** Входные ворота вируса – слизистые оболочки вдп, размножается в шейных лимфатических узлах, затем проникает в кровь и поражает лимфоидную ткань.

**Клиническая картина.** Инкубационный период 15-24 дня. Болезнь протекает на фоне субфебрильной температуры тела, розовой пятнистости, папулезной сыпи на лице и теле, которая через 2-3 дня исчезает. У взрослых болезнь более тяжелая, с интоксикацией, высокой  $t$ , с увеличением шейных лимфатических узлов. В первые 3 месяца возможно инфицирование плода с последующими осложнениями, даже уродствами, мертворождениями. Тогда рекомендуют прервать беременность.

**Иммунитет.** Пожизненный. При врожденной краснухе – слабый, с персистенцией.

**Лабораторная диагностика.** Материал – смыв из носоглотки, кровь, моча, кал или ткани погибшего плода. Серодиагностика в РСК, РТГА, ИФА, РИА.

**Лечение.** Симптоматическое.

**Специфическая профилактика.** Живые и убитые вакцины, ассоциированные и моновакцины. Иммунизируют девочек 12-14 лет при отсутствии у них антител (в большинстве стран).

## Характеристика арбовирусов

**Арбовирусы** – группа вирусов, передающихся трансмиссивно восприимчивым животным или человеку кровососущими членистоногими переносчиками.

Известно около 500 арбовирусов, 100 из них вызывают у человека заболевание. Это желтая лихорадка, клещевой энцефалит, омская геморрагическая лихорадка, лихорадка Крым-Конго, лихорадка Денге, японский и калифорнийский энцефалиты, а также вирусы лихорадки Марбург и Эбола и др.

В патологии человека основную роль играют представители 3 семейств: *Flaviviridae*, *Togaviridae* и *Bunyaviridae*.

**Морфология, химический состав и антигенная структура.** Для арбовирусов характерны сферическая форма, сложное строение, РНК-геномные, состоят из РНК и белка-капсида, оболочка липопротеиновая с гликопротеиновыми шипами. Имеют родоспецифические, группоспецифические и типоспецифические антигены-гликопротеины с протективными свойствами.

**Культивирование.** Используют новорожденных мышей, культуру клеток и куриные эмбрионы (желточный мешок). Культивируют при  $36-40^{\circ}\text{C}$  для позвоночных и  $22-25^{\circ}\text{C}$  для членистоногих переносчиков.

**Резистентность.** Чувствительность высокая к дезинфектантам, химическим и физическим факторам.

**Эпидемиология.** Арбовирусные инфекции природноочаговые зоонозы. Резервуары в природных очагах – кровососущие членистоногие (клещи, комары, москиты, мокрицы), дополнительные резервуары, связанные

трофически членистоногими – летучие мыши, птицы, грызуны, приматы. Основной путь заражения – трансмиссивный, но возможен от человека к человеку, иногда воздушно-капельный, контактный, через пищу. Возможны эпидемии и спорадические случаи заболевания. Характерна сезонность.

**Патогенез.** Арбовирусы размножаются в тканях, органах, слюнных железах членистоногих. При укусе вирусы разносятся и вновь поступают в кровь, появляется лихорадка, вазотропные поражают эндотелий капилляров внутренних органов, нейротропные – клетки ЦНС, вызывая их гибель.

**Клиническая картина.** Арбовирусные инфекции часто протекают скрытно и выявляются в серологических реакциях. Синдромы – системные и геморрагические лихорадки, менингоэнцефалиты. Летальность около 75%.

**Иммунитет.** Стойкий, гуморальный, типоспецифический.

**Лабораторная диагностика.** Материал для исследования – кровь, спинномозговая жидкость, при летальном исходе – материал из всех органов. С арбовирусами работы проводятся в специально оборудованных лабораториях как с особо опасными инфекциями.

Арбовирусы выделяют интерцеребральным заражением новорожденных белых мышей и в куриных эмбрионах. Реакции РТГА, РИФ, РПГА, ИФА, РИА, ПЦР и др.

**Лечение.** Интерферон, рибавирин, и др. противовирусные препараты, а также иммуноглобулины.

Профилактика. Иммуноглобулины – для экстренной профилактики; для создания активного иммунитета – убитые вакцины и только живая вакцина против желтой лихорадки.

#### **а) Вирус клещевого энцефалита**

Относится к семейству *Flaviviridae*, *p. Flavivirus* (от лат. *flava*-желтый). Арбовирус умеренного климата. Нейротропный. Неустойчив во внешней среде; в кислой среде – устойчив. Основной резервуар – иксодовые клещи, дополнительный – грызуны, птицы, домашние и дикие животные. Сезон – весна-лето. Человек заражается трансмиссивно и при употреблении молока коз и овец. Распространяется гематогенно, поражает ЦНС. ( Рис. 27).

**Клиническая картина.** Различают лихорадочную, менингеальную и очаговую формы клещевого энцефалита. Последняя наиболее тяжелая, развиваются параличи шеи и верхних конечностей. У 1-3% больных – хроническое течение болезни.

**Иммунитет** стойкий.

**Лабораторная диагностика.** Вирус выделяют из крови и спинномозговой жидкости. Серологические реакции: РПГА, ИФА, ПЦР.

**Лечение и профилактика.** Для лечения и экстренной профилактики – донорский или гетерологичный иммуноглобулин. Для вакцинации убитая вакцина; из препаратов – йодантипирин. Кипячение молока.

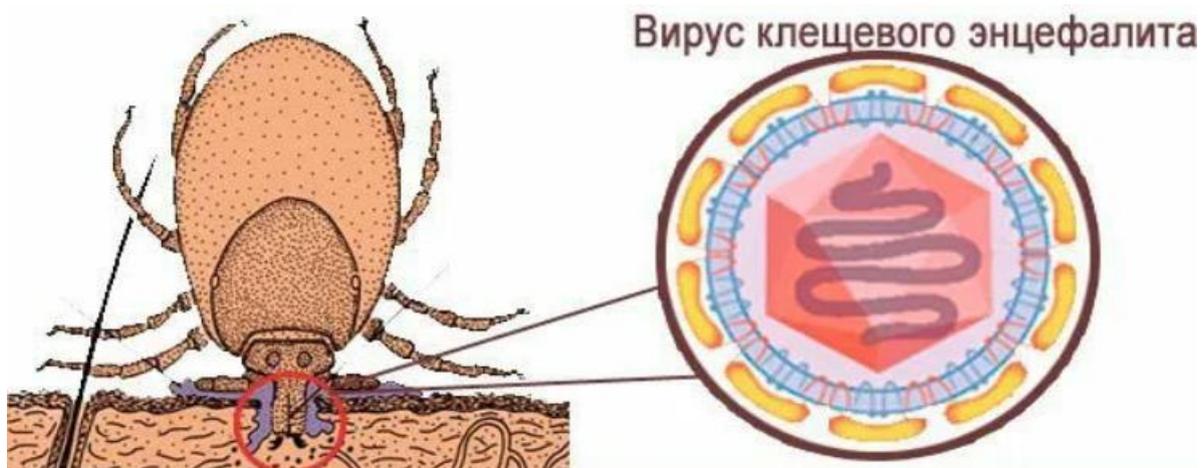


Рисунок 27– Строение вируса клещевого энцефалита

### б) РСК для диагностики клещевого энцефалита

Основана на изучении парных сывороток крови. Для выявления нарастания титра антител гемагглютинирующих арбовирусов. РСК и РН. Трудность диагностики в том что очаге циркуляция количества вируса может сопровождаться выработкой групповых антител к антигенно – родственным вирусам. В таких случаях применяют РСК иРН, которые более специфичны чем РТГА. Диагностическое значение имеет не менее 4-х кратное увеличение антител.

### Вирус бешенства

**Бешенство** (*Rabies*: водобоязнь, гидрофобия) – вирусная инфекционная болезнь, развивается после укуса инфицированным животным. Характеризуется поражением ЦНС, параличами дыхательной и глотательной мускулатуры, летальным исходом.

**Таксономия.** Вирус относится к семейству *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*, РНК-содержащий. ( Рис. 28).

**Морфологические и антигенные свойства.** Вирус имеет форму пули, со спиральной симметрией рибонуклеопротеина, сложного строения, с гликопротеиновой оболочкой, обладающей антигенными и иммуногенными свойствами. Существует два типа вируса – дикий, уличный, патогенный для человека, и фиксированный, полученный Л. Пастером, непатогенный. Оба идентичны по антигенам.

**Культивирование.** Внутримозговое культивирование лабораторных животных (белые мыши, хомячки, овцы), в культуре клеток, куриных эмбрионах (возможно). В мозговой ткани образуются цитоплазматические включения – тельца Бабеша-Негри, содержащие антиген вируса.

**Резистентность.** Вирус неустойчив к УФ, нагреванию.

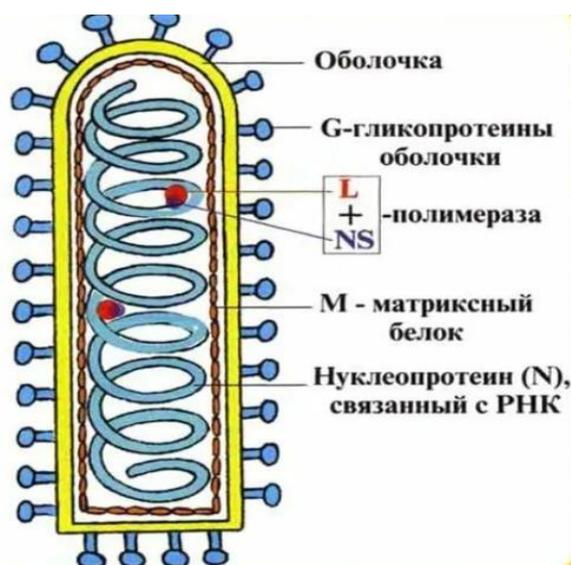


Рисунок 28– Строение вируса бешенства

**Эпидемиология.** Источник инфекции в природных очагах лисы, волки, песцы, шакалы, летучие мыши, в домашних условиях – собаки и кошки. Вирус локализуется в слюнных железах и выделяются со слюной. Механизм передачи – контактный при укусе, аэрогенный – со слюной летучих мышей.

**Инкубационный период.** У собаки 14-16 дней; появляется возбуждение, слюноотделение, рвота, водобоязнь, бросается на людей, животных, грызет предметы, через 1-3 дня паралич и смерть.

**Патогенез.** Вирус со слюной после укуса животного попадая в раны, распространяется по нервным стволам и попадает в головной и спинной мозг, где размножаются. В нейронах обнаруживаются тельца Бабеша-Негри, затем вирусы попадают в слюнные железы и выделяются со слюной.

**Клиническая картина.** Инкубационный период от 10 дней до 2 мес., иногда до года. Болезнь начинается с недомогания, страха, беспокойства, бессонницы, затем развиваются возбудимость, спазматические сокращения глотательных мышц, судорожное дыхание. Судороги усиливаются при виде льющейся воды, при движении воздуха, от яркого света, при всех воздействиях. Появляются галлюцинации. На 3-7 день болезни параличи. Летальность~95%.

**Лечение.** Нет средств.

**Иммунитет.** Не изучен из-за гибели больного. Антирабическая вакцина (укушенным) для выработки антител, интерферонов и активации клеточного иммунитета.

**Лабораторная диагностика.** Диагностика посмертная. В мазках-отпечатках из ткани мозга обнаруживаются тельца Бабеша-Негри. У больных

– РСК, ИФА.

**Специфическая профилактика.** Первая вакцина против бешенства получена Л.Пастером аттенуацией уличного штамма через мозг кролика.

Для профилактики – инактивированная вакцина (УФ- или  $\gamma$ -учами).

Для пассивного иммунитета – антирабический иммуноглобулин.

## Вирусы гепатитов (А В С Д Е G)

Вирусные гепатиты включают в себя поражения печени, вызванные различными типами вирусов, среды которых могут быть герпес вирусы, цитомегаловирусы и др. Современная классификация гепатотропных вирусов включают в себя 8 различных типов вирусов, обозначаемых от *A* до *G*.

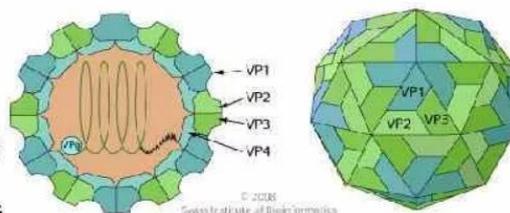
### а) Вирус гепатита *A*.

Вызывает острую инфекционную болезнь, поражает печень, сопровождается интоксикацией, желтухой, лихорадкой, склонен к эпидемическому распространению.

**Таксономия, морфология и антигенная структура.** Вирус гепатита *A* относится к сем. *Picornaviridae*, р. *Hepatovirus*, РНК-содержащий вирус, простого строения. (Рис. 29).

### Строение вируса гепатита *A*

- Просто организованный вирус;
- Вирион - 20-30 нм;
- Геном - однонитевая плюс РНК, на 5'-конце которой находится связанный с ней внутренний белок **VPg**;
- Капсид –икосаэдрический тип симметрии, состоящий из протомеров.
- Протомеры образованы полипептидами: **VP1, VP2, VP3, VP4**.



! Антигенность вируса гепатита *A* связана с белками капсида **VP1, VP2, VP3**

Рисунок 29– Строение вируса гепатита *A*

**Культивирование.** В культуре клеток, цитопатия не выражена.

**Резистентность.** Относительно устойчив к нагреванию и во внешней среде.

Восприимчивы из животных обезьяны.

**Эпидемиология.** Источник инфекции – больные. Механизм заражения фекально-оральный. В начале болезни больные более опасны, с появлением желтухи – менее опасны. Вирус гепатита *A* передается через воду, пищу, предметы обихода. Способен вызывать эпидемические вспышки. Болеют там, где низкий уровень гигиены. Болеют чаще дети от 4 до 15 лет. Летом и осенью.

**Патогенез.** Репликация вирусов происходит в кишечнике, проникают в печень и репродуцируются в цитоплазме гепатоцитов, повреждая их.

**Клиническая картина.** Инкубационный период 15-50 дней. Начало острое, с повышением *t*, тошнотой, рвотой. Иногда желтуха на 5-7 день.

Течение болезни без тяжелых осложнений, легкое; у детей до 5 лет бессимптомное. Продолжительность заболевания 2-3 недели.

**Иммунитет.** Стойкий, пожизненный, обусловлен в начале болезни IgM и Ig G; гуморальный и местный в кишечнике.

**Лабораторная диагностика.** Материал для исследования – кровь, кал.

Реакции ИФА, РИА, РСК.

**Лечение.** Симптоматическое.

**Профилактика.** Неспецифическая – повышение санитарно-гигиенической культуры населения. Специфическая пассивная профилактика иммуноглобулином, специфическая активная профилактика инактивированной и рекомбинантной вакциной.

## б) вирус гепатита В

Парентеральные гепатиты – вирусные инфекционные болезни печени, характеризующиеся длительным течением, носительством, печеночной недостаточностью, циррозом печени и раком печени. Передаются через кровь и половым путем. Возбудители парентеральных гепатитов – вирусы гепатитов В, С, Д и G.

Вирус гепатита В – ВГВ, HBV. Относится к сем. *Hepadnaviridae*, роду

*Orthohepadnaviridae*, открыт Дейном, называется «частица Дейна».

**Морфология** ВГВ – сложного строения. Двунитевая кольцевая ДНК состоит из укороченной на 1/3 плюс+ цепи ДНК и полноценной минус – ДНК, связанной с ДНК полимеразой, которая достраивает плюс цепь до полноценной структуры. Геном записан на минус – цепи и состоит из 4 генов. Содержит 3 антигена – поверхностный *HBsAg* и два внутренних: *HBcAg* (сердцевинный) и *HBeAg*, обладающий свойствами ДНК – полимеразы. В организме больных к каждому из антигенов в различной стадии болезни образуются антитела: анти-*HBs*, анти-*HBc* и анти-*HBe*. ( Рис. 30).

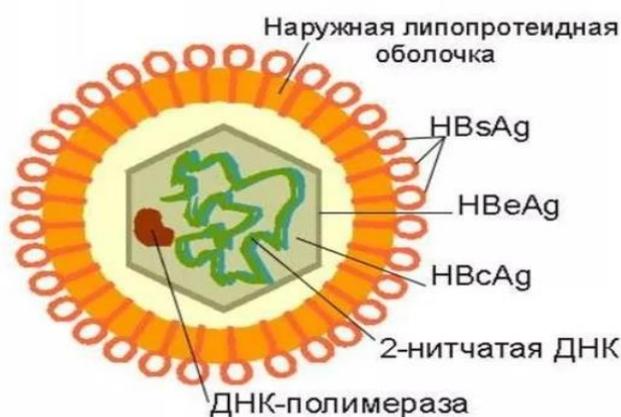


Рисунок 30– Строение вируса гепатита В

**Культуральные свойства.** Культивируются в культуре клеток, полученной из ткани первичного рака печени.

**Резистентность.** ВГВ устойчив в окружающей среде и дезинфектантам. Инактивируются при 120° С в течение 45 мин.

**Антигенная структура.** ВГВ имеет сложную антигенную структуру.

Существует 4 антигенных серотипа вируса.

**Эпидемиология.** Источник инфекции – больной и носитель; их в мире > 300 млн, ежегодно умирают от вирусных гепатитов ~2 млн. человек. Заражение вирусом происходит через кровь при парентеральных действиях, половым путем, трансплацентарно от матери плоду. Риск заражения ребенка от матери 60-90% в зависимости от сроков заболевания матери. Вирус у инфицированных находится во всех биологических жидкостях. После клинического выздоровления сохраняется до 5 лет.

**Патогенез.** Инфекционный процесс начинается после проникновения вируса в кровь. Различают интегративную и продуктивную инфекцию. При интегративной инфекции кольцевая ДНК вируса включается в хромосому печеночной клетки – гепатоцита с образованием в ней провируса; результатом вирусоносительства может быть развитие первичного рака печени. В крови обнаруживаются *HBx*-антигены.

При продуктивной инфекции формируются новые вирусные частицы и наблюдается клинически острый или хронический гепатит, в крови появляются анти-*HBc*-антитела. Вирус не разрушает гепатоциты, а индуцирует иммунную патологическую реакцию.

**Клиническая картина.** Инкубационный период 2-6 мес. Поражается печень, развивается желтуха почти всегда. Летальный исход при молниеносной форме (1%). В 5-10% случаев острая форма переходит в хроническую с развитием цирроза и носительства ВГВ, в последнем в 50-90% случаев у детей до 1 года, заразившихся от матерей.

**Иммунитет.** Гуморальный иммунитет защищает гепатоциты от вируса; клеточный иммунитет освобождает организм от инфицированных гепатоцитов. Хроническая форма болезни связана с нарушением клеточного иммунитета, синтеза интерферона и интерлейкина-1.

**Диагностика.** Серологический метод – ИФА, РНГА и ПЦР.

**Лечение.** Интерферон и ингибиторы ДНК-полимеразы.

**Профилактика.** Исключение попадания вируса гепатита В при парентеральных манипуляциях в кровь. Личная гигиена. Правильное половое воспитание.

**Специфическая профилактика.** Вакцинация рекомбинантной генно-инженерной вакциной с *HBs*-антигеном.

Дети от больных гепатитом В матерей и носителей вируса подлежат 4-х кратной вакцинации по схеме. Лица, относящиеся к группе высокого

риска заражения (медперсонал), вакцинируются 3-хкратно. Длительность иммунитета после вакцинации 7 лет.

### в) Вирус гепатита С - ВГС, HCV

ВГС относится к семейству *Flaviridae*, роду *Hepacivirus*, содержит линейную однонитчатую РНК, сферической формы, очень вариабельный; известно >10 генотипов вируса. Антигены – сердцевидный С-протеин, гликопротеины оболочки и неструктурные белки. Болезнь, вызываемая ВГС широко распространена, и все время нарастает. Природный резервуар неизвестен. Болезнь можно вызвать у шимпанзе. (Рис. 31).



Рисунок 31– Строение вируса гепатита С

**Культивирование** – на культуре тканей. По устойчивости – как ВГВ.

Передача вируса – при переливаниях крови. Заражающая доза более высокая, чем при гепатите В.

**Клиническая картина** острого гепатита С более легкая, чем ВГВ, но чаще, в 50% случаев переходит в хроническую форму с развитием цирроза и первичного рака печени.

**Лечение.** Интерферон и рибавирин.

**Профилактика.** Такая же, как и при гепатите В, но вакцина против гепатита В не защищает от гепатита С. Для специфической профилактики- рекомбинантная полипептидная вакцина.

### г) Вирусы гепатитов Д и G

ВГД не классифицирован, спутник вируса гепатита В, дефектный вирус, без собственной оболочки, использует внешнюю оболочку вируса В, сферической формы, РНК-однонитчатая. Имеет 3 генотипа, относятся к одному серотипу. В России -1 генотип. (Рис. 32-33).

## Строение вируса гепатита D

Сферический вирус, диаметром 35-43 нм;

однонитевая циркулярная молекула РНК;

два дельта-антигена (DAg): p24 (DAg-Small) и p27 (DAg-Large);

«оболочка» составлена из HBs-АГ.

Вирус представлен **единственным серотипом**.

Дельта-антиген не экспрессируется на поверхности инфицированных гепатоцитов и не принимает участия в реакциях Т-клеточного иммунитета. **Антитела против HDAg не обладают протективным эффектом.**

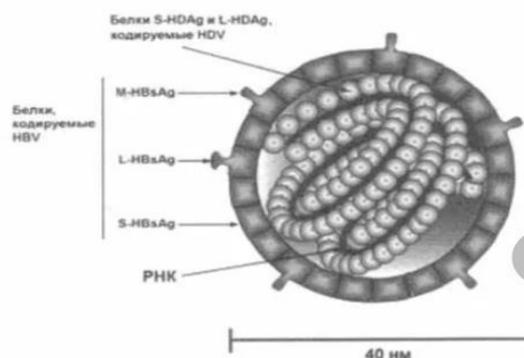


Рисунок 32– Строение вируса гепатита D



Рисунок 33– Строение вируса гепатита G

Источник инфекции – больные и носители. Заражение через кровь, как и при ВГВ. Одновременная коинфекция вирусами *B* и *D* приводит к развитию умеренной формы болезни. При хроническом гепатите *B* инфицирование вирусом гепатита *D* осложняет течение болезни, развивается острая печеночная недостаточность и цирроз печени. Вирус гепатита *D* обнаруживается только в гепатоцитах.

**Диагностика.** ИФА.

**Лечение.** Интерферон.

**Профилактика.** Такая же, как и при гепатите *B*, та же вакцина – рекомбинантная генно-инженерная с *HBs*-антигеном.

**Вирус гепатита G.** Мало изучен. Предположительно с дефектом в сердцевинном белке, для репликации требуется помощь вируса гепатита *C*.

**д) Вирус гепатита E** – возбудитель инфекции с фекально-оральным механизмом передачи, от гепатита *A* отличается клинико-эпидемиологическими особенностями и серологическими реакциями.

**Таксономия и морфология.** Вирус гепатита *E* с геномом +РНК-содержащий, существует единственный антигенный вариант вируса. (Рис. 34). Заражение через загрязненную воду. Болеют в теплых регионах с низким санитарно-гигиеническим уровнем. Болезнь протекает в легкой форме, более тяжело у беременных.

**Простой вирус 27-38 нм в диаметре с шипами и вдавлениями на поверхности; кубический тип симметрии, геном – одноцепочечная +РНК.**

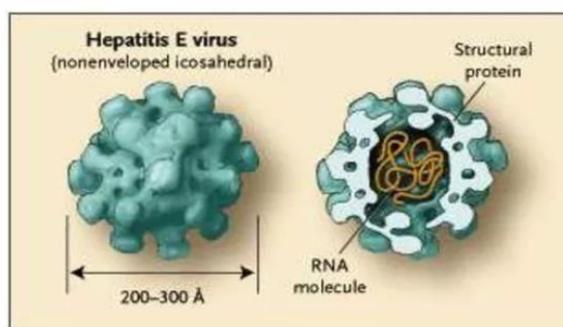


Рисунок 34– Строение вируса гепатита E

**Иммунитет.** Не изучен.

**Диагностика.** Серологический метод (ИФА, иммуноблоттинг – высокочувствительный анализ, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА), ПЦР (для определения РНК).

**Профилактика.** Снабжение качественной водой, улучшение санитарно-гигиенических условий. Специфический иммуноглобулин для беременных, неживые вакцины, разрабатываются рекомбинантные и живые вакцины.

### **Возбудители медленных вирусных инфекций (МВИ)**

Признаки МВИ:

1. длительный инкубационный период (месяцы, годы);
2. преимущественное поражение ЦНС;
3. медленное прогрессирование заболевания;
4. неизбежный летальный исход.

МВИ могут вызвать возбудители острых вирусных инфекций, так вирус кори может вызвать подострый склерозирующий панэнцефалит (ПСПЭ), вирус краснухи – прогрессирующую врожденную краснуху и краснушный панэнцефалит. К МВИ относятся прионные болезни.

**Прионы** – белковые инфекционные частицы, вызывают болезни, сходные с МВИ, но их относят к возбудителям конформационных болезней,

вызывающие диспротеиноз. Конформация белков происходит в результате неправильного сворачивания клеточного белка. Патологическая форма белка накапливается в нейронах, придавая клетке губкообразный вид.

Прионы вызывают трансмиссивные губкообразные энцефалиты человека и животных, происходят губкообразные изменения мозга.

Основные прионные болезни.

**Куру** – возникает после ритуального каннибализма, поедания инфицированного прионами мозга, недостаточно термически обработанного своих людей. Поражается ЦНС, нарушаются координация движений, походка, появляются озноб и эйфория («хохочущая смерть»). Летальный исход через год.

**Болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ)** – прионная болезнь. Инкубационный период до 20 лет, с деменцией, зрительными и мозжечковыми нарушениями, двигательными расстройствами, со смертельным исходом. Пути инфицирования – употребление продуктов больных губкообразной энцефалопатией; при трансплантации органов; при медицинских манипуляциях.

**Синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера** – прионная болезнь, наследственная, семейная, с деменцией, гипотонией, расстройством речи.

Инкубационный период 3-5 лет. Летальный исход через 4-5 лет.

**Фатальная семейная бессонница** – аутосомно-доминантное заболевание с прогрессирующей бессонницей, гиперактивностью, галлюцинациями, нарушением циркадных ритмов. Смерть от сердечной недостаточности.

**«Скрепи-чесотка»** - прионная болезнь коз и овец, поражаются ЦНС, сопровождается зудом кожи, нарушением движений, гибелью животного.

**Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота** – прионная болезнь КРС. Инкубационный период 1,5-15 лет. Поражается ЦНС, нарушается координация движений, гибель животного неизбежна.

## **Онкогенные вирусы и ретровирусы**

а) РНК-содержащие вирусы сем. *Retroviridae*

б) ДНК-содержащие вирусы сем. *Papillomaviridae*, сем. *Poxviridae*, сем.

*Herpesviridae*.

в. Вирусы и рак.

В объяснении природы рака господствовали две теории – вирусная и мутационная. Роль вирусов в развитии опухолей впервые была доказана Раусом в 1910 г на примере саркомы кур. Вирусно-генетическую теорию происхождения злокачественных опухолей в 1946 г изложил российский вирусолог Л.А. Зильбер. Она нашла экспериментальное подтверждение. Рак вызывают онкогенные вирусы. Они интегрируются в хромосому клетки и создают раковый фенотип.

Популярна мутационная теория Ф. Бернета (1974), согласно которой раковая опухоль моноклональна. Она происходит от 1 исходной

соматической клетки, мутации в которой вызываются химическими, физическими агентами и вирусами, повреждающими ДНК. Мутации накапливаются и клетка начинает неограниченно делиться.

**а) Онкогенные ретровирусы**

**Морфология.** Сложные, состоят из сердцевинки с суперкапсидом с шипами. Сердцевина состоит из капсида кубического типа, обратной транскриптазы или ревертазы и генома из двух идентичных нитей РНК.

**Культивирование.** В культурах клеток и организме восприимчивых животных.

**Резистентность и антигенная структура.** Вирусы чувствительны к факторам (УФ-лучам, детергентам). Антигены – белки сердцевинки и поверхностные гликопротеины шипов.

**Патогенез и механизм онкогенеза.** В процессе инфекции ревертаза катализирует синтез ДНК на матрице вирусной РНК, ДНК замыкается в кольцо, встраивается в хромосому клетки и образуется провирус. В геноме клеток человека имеется онкоген. Включение ДНК-провируса в геном клетки приводит к активации онкогена, который в нормальных условиях находится в неактивном состоянии. Клетка трансформируется. При исключении ДНК- провируса из хромосомы клетки онкоген может встроиться в вирусный геном и активироваться. Заражение клеток онковирусами, имеющими онкоген, трансформирует клетки. ( Рис. 35).

К семейству *Retroviridae p. Deltaretrovirus* относится возбудитель Т-клеточного лейкоза взрослых и возбудитель волосисто-клеточного лейкоза. Заболевания встречаются в определенных географических регионах, в России – в Восточной Сибири и Дальнем Востоке. Профилактики и лечения нет.

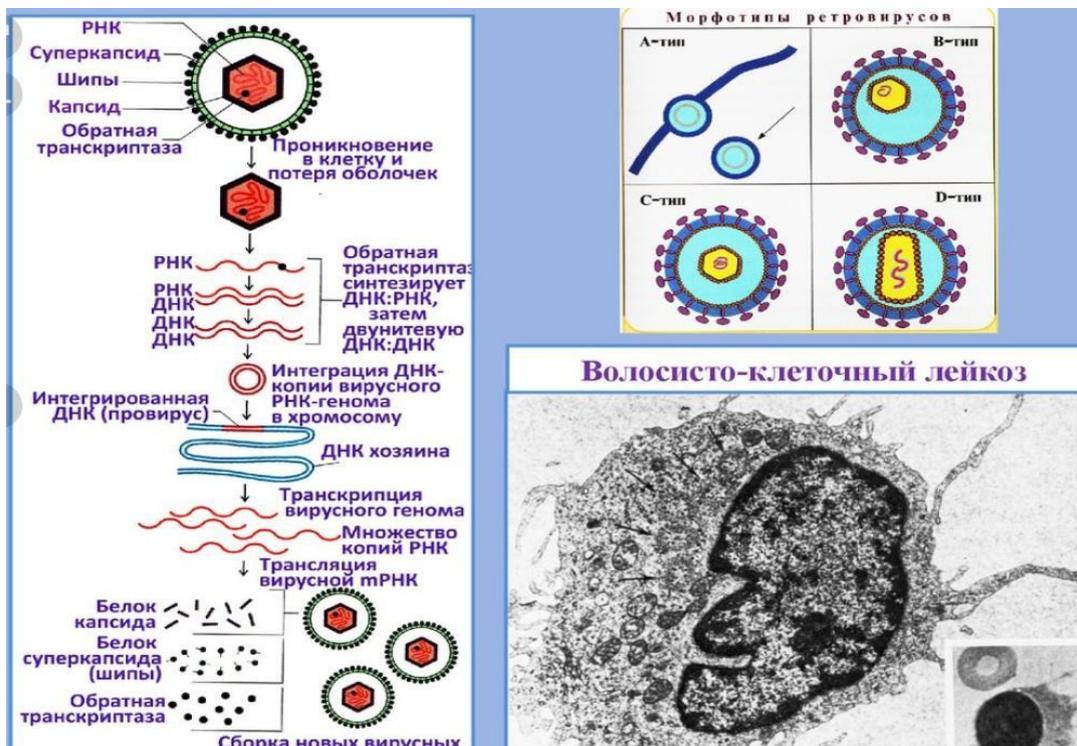


Рисунок 35– Строение и репликация Deltaretrovirus

## б) Днк-содержащие вирусы

Сем. *Papillomaviridae* включает в себя вирусы папилломы человека, кроликов, собак, коров.

Вирусы папилломы человека вызывают продуктивную инфекцию в клетках плоского эпителия, поскольку клетки базального слоя не способны к поддержанию полного репродуктивного цикла.

Насчитывается более 100 типов вируса папилломы человека, большинство вызывает образование доброкачественных бородавок, папиллом и кандилом в различных местах и на коже. В клетках этих образований ДНК вируса находится в ядре в виде независимой от генома клетки плазмидной формы кольцевой двухцепочечной ДНК. ( Рис. 36).

Определенные типы вируса папилломы 2,5,8 способны вызвать рак кожи, злокачественные опухоли в полости рта, гортани. Типы 16 и 18 в 100% случаев – возбудители рака шейки матки.

В раковых клетках вирусная ДНК интегрирована в клеточную.



Рисунок 36– Строение вируса папилломы

Сем. *Poxviridae*. К нему относится вирус контагиозного моллюска. У человека вызывает образование доброкачественных шаровидных узелков на лице, веках, шее и др. местах. ( Рис. 37).

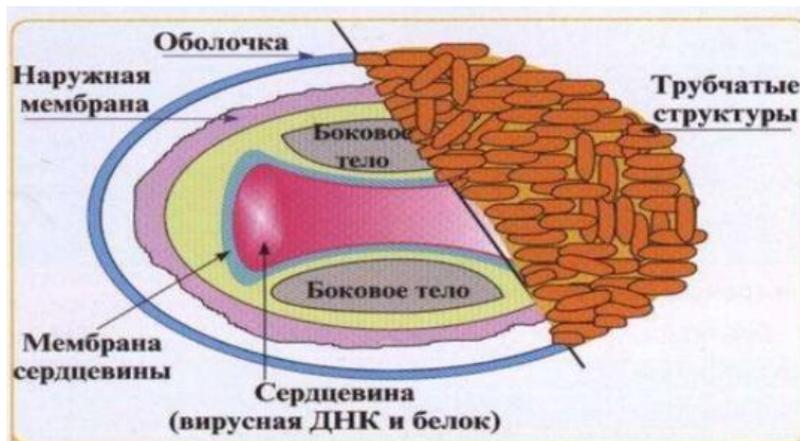


Рисунок 37 Строение вируса контагиозного моллюска

Сем. *Herpesviridae*.

Вирус герпеса человека типа 4 – вирус Эпштейна-Барр – является возбудителем инфекционного мононуклеоза, с этим же вирусом связывают развитие лимфомы Беркитта и назофарингеальной карциномы (эндемичных для некоторых районов Африки и Северного Китая). (Рис. 38).

Следствием вирусоносительства гепатита В может быть развитие первичного рака печени.



Рисунок 38– Строение вируса Эпштейна-Барр

### в) Вирусы и рак

Существует два типа онковирусов: вирусы, содержащие онкоген (вирусы onc+); вирусы, не содержащие онкоген (вирусы onc-). Вирусы onc+ могут утрачивать онкоген, но это не нарушает их нормальной жизнедеятельности – онкоген вирусу не нужен. Вирус onc- проникнув в клетку, не вызывает ее трансформации в раковую или крайне редко.

Вирусы onc+ попадая в ядро клетки, трансформируют её в раковую. (Рис. 39).

Превращение нормальной клетки в опухолевую происходит при привнесении в хромосому онкогена, наделяет новым качеством – позволяет ей размножаться бесконтрольно, образуя клон раковых клеток. Онкогенные вирусы интегрируются в хромосому. Причина превращения нормальной клетки в злокачественную – мутации (внешние факторы – химические вещества, УФ-облучение, вирусы и др).

Раковая клетка, как чужеродная распознается Т-цитотоксическими лимфоцитами и при участии остальных механизмов иммунной системы уничтожается (NK-клетками, РИТ-клетками, В-киллерами, К-клетками). В качестве К-клеток могут функционировать полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги, моноциты, тромбоциты, мононуклеарные клетки лимфоидной ткани, Т-лимфоциты.

Противоопухолевым действием обладают интерфероны и др.

биологически активные комплексы, синтезируемые ИКК. В частности, раковые клетки распознаются и разрушаются рядом цитокинов, как фактор некроза опухоли (ФНО) и лимфотоксин. ФНО – один из главных медиаторов воспалительных и иммунных реакций организма.



Рисунок 39–Вирусы опс+ , опс-

Большинство людей не болеет раком не потому, что у них не возникают мутантные раковые клетки, а потому, что последние возникнув, своевременно распознаются и уничтожаются Т-цитотоксическими лимфоцитами и другими звеньями иммунной системы раньше, чем успевают дать злокачественное потомство. У таких людей противоопухолевый иммунитет работает надежно.

У больных раком, наоборот, мутантные клетки вовремя не распознаются или не уничтожаются иммунной системой, а беспрепятственно и бесконтрольно размножаются. Следовательно, рак – это следствие иммунодефицита.

### **ВИЧ – инфекция**

СПИД – инфекционная болезнь, вызываемая вирусом иммунодефицита человека – ВИЧ, поражает иммунную систему. Болезнь длительная, заканчивается летально, передается половым путем и парентерально.

**Таксономия.** Возбудитель СПИДа, ВИЧ-инфекция, относится к сем. *Retroviridae*, роду *Lentivirus*, имеет два типа (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и не менее 10 сероваров. Открыт в 1983 году независимо друг от друга американским вирусологом Р. Галло и французским ученым из института Л.Пастера Л. Монтанье.

**Морфология.** Вирус сферической формы, имеет двухслойную липопротеиновую оболочку.

Сердцевина белковая, имеет конусообразную форму, в ней находятся РНК и несколько молекул ревертазы (обратной транскриптазы). Геном вируса – две идентичные однонитевые молекулы+РНК. ( Рис. 40).

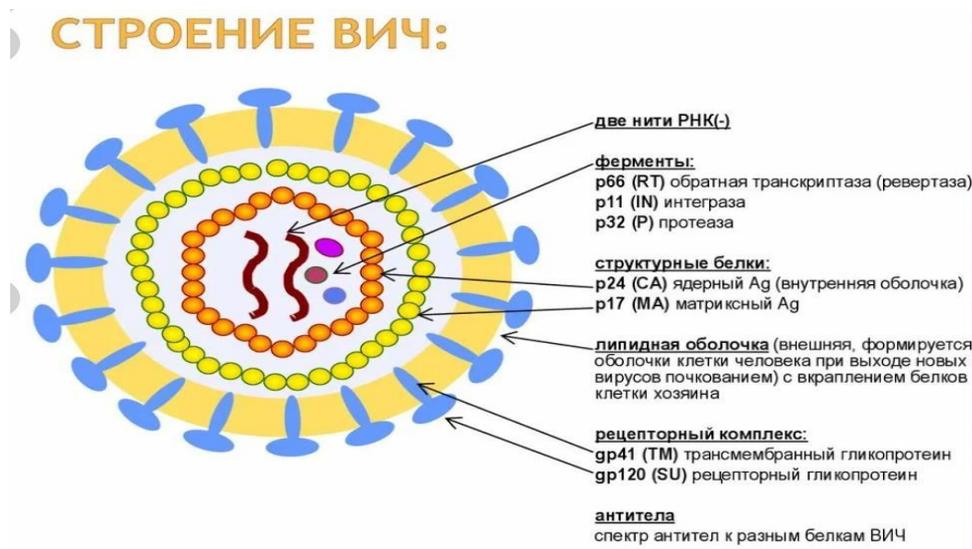


Рисунок 40– Строение ВИЧ

**Антигенная структура.** Главные антигены – оболочечные и сердцевинный, для них характерна большая вариабельность, обусловленная гипервариабельностью вируса, что в свою очередь обеспечивает вирусу адаптацию к условиям его существования в организме в процессе болезни.

**Культуральные свойства.** Вирус размножается только в культуре Т-лимфоцитов на сложных питательных средах с интерлейкином-2. Последний участвует в пролиферации В-лимфоцитов и защищает клетки от апоптоза.

#### **Стадии репликации вируса в лимфоцитах:**

1. адсорбция на Т-лимфоцитах, на спец. рецепторах;
2. эндоцитоз вируса;
3. высвобождение вирусной РНК, синтез с помощью ревертазы двунитевой ДНК провируса и интеграция провируса в геном (ДНК) клетки;
4. синтез РНК вируса, трансляция и синтез вирусных белков;
5. сборка, созревание и высвобождение вирусных частиц из клетки почкованием, одевание вируса в липидную оболочку клетки.

Из животных к ВИЧ чувствительны только шимпанзе.

**Резистентность.** ВИЧ малоустойчив (во внешней среде, химическим и физическим факторам). Препараты для дезинфекции – как при микобактериях, т.е. высокие концентрации.

**Эпидемиология.** В 1980-1981 гг – пандемия (США, Африка, Азия, Австралия). Сейчас 40 млн. вичинфицированных; более 18 млн. уже умерло

от СПИДа – в мире. В России к 2005 г 300000 – ВИЧ-инфицированных. Сейчас 1,5 млн. Распространению способствуют наркоманы. Все люди восприимчивы.

**Патогенез.** Инфицирование ВИЧ – при половых контактах, парентеральных манипуляциях, от инфицированной матери плоду и при кормлении грудью.

После репродукции вируса в клетке последняя погибает или снижает активность, что приводит к нарушению функций иммунной системы, снижению реакций на антигены; уменьшается количество Т-и В-лимфоцитов, макрофагов, естественных киллеров, снижается синтез антител, интерферона, комплемента, интерлейкинов, активность фагоцитоза.

У ВИЧ-инфицированных вирус обнаруживается во всех органах, тканях и жидкостях.

Из-за снижения функций иммунной системы возникают вторичные поражения условно-патогенной микрофлорой различных органов и злокачественные новообразования.

**Клиническая картина.** Инкубационный период от неск. дней до неск. месяцев. При ВИЧ-инфекции поражаются дыхательная система (пневмония, бронхиты, плевриты), ЦНС (абсцессы, менингиты, энцефалиты, деменция и др). Возникают злокачественные новообразования (опухоли внутренних органов, саркома Капоши).

Вич-инфекция протекает в несколько стадий. Инкубационный период – 2-4 недели. Первичные проявления – острая лихорадка, диарея, лимфоаденопатия и др. Завершается стадия бессимптомной фазой и персистенцией вируса, восстанавливается самочувствие, в крови обнаруживаются ВИЧ-антитела. Эта стадия может длиться годами и затем переходит в стадию вторичных заболеваний, поражаются дыхательная система, нервная система, ЖКТ, возникают злокачественные заболевания. Завершается ВИЧ-инфекция терминальной стадией, собственно СПИДом, характеризуется кахексией, анемией, диареей, адинамией, деменцией, снижением всех иммунных показателей с летальным исходом.

Средняя продолжительность жизни ВИЧ-инфекции человека ~12 лет. ВИЧ-инфекция поражает Т-, В- и А-звенья иммунной системы.

**Вирусологическая диагностика** основана на определении антигенов и антител к вирусу на различных стадиях развития инфекции, используют ИФА, ИБ, ПЦР.

**Лечение.** Все методы лечения малоэффективны. Лишь облегчают течение болезни. Препараты: азидотимидин, тимозин, интерфероны, интерлейкины.

**Профилактика.** Специфической профилактики нет. Выявление больных и инфицированных, обследование групп риска, воспитание населения – основные способы профилактики.

## **Контрольные вопросы к лекции**

1. Грипп. Реакция торможения гемагглютинации при серодиагностике гриппа.

2. ОРВИ. Таксономия и классификация ОРВИ.

3. Характеристика энтеровирусов.

4. Герпесвирусы.

5. Вирус натуральной оспы.

6. Вирус кори.

7. Вирус краснухи.

8. Характеристика арбовирусов.

9. Вирус клещевого энцефалита. РСК и РН для диагностики клещевого энцефалита.

10. Вирус бешенства.

11. Вирус гепатита А.

12. Вирус гепатита В.

13. Вирус гепатита С.

14. Вирус гепатитов D и G.

15. Вирус гепатита E.

16. Иммуноферментный анализ ИФА. Применение.

17. Возбудители медленных вирусных инфекций (МВИ). Признаки.

Основные прионные болезни.

18. Онкогенные вирусы и ретровирусы:

РНК - содержащие вирусы сем. Retroviridae, ДНК - содержащие сем. Papillomaviridae, Сем. Poxviridae, сем. Herpesviridae.

19. Вирусы и рак.

20. ВИЧ- инфекция. Характеристика возбудителя; открытие, антигенная структура, репликация, патогенез, клиника, диагностика. Лечение, профилактика.

### **Список сокращений**

ВИЧ-вирус иммунодефицита человека ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота РНК-рибонуклеиновая кислота

ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа ГНТ - гиперчувствительность немедленного типа ПЦР - полимеразно-цепная реакция

атм. - атмосферы

ПАВ-поверхностно-активные вещества УФО - ультрафиолетовое облучение ЦПМ-цитоплазматическая мембрана ЛПС-липополисахарид

МПА-мясо-пептонный агар МПБ-мясо-пептонный

ХТП-химиотерапевтические препараты

МИК-минимально-ингибирующая концентрация РА-реакция агглютинации

РНГА-реакция непрямой гемагглютинации РПГА-реакция пассивной гемагглютинации РТГА - реакция торможения гемагглютинации РП - реакция преципитации

РЛ - реакция лизиса

РСК-реакция связывания комплемента РИФ - реакция  
иммунофлюоресценции ИФА - иммуноферментный анализ РИА -  
радиоиммунный анализ  
ИБ - иммуноблоттинг  
РГА - реакция гемагглютинации ЦПЭ - цитопатогенный эффект ЦПД -  
цитопатогенное действие  
ОРЗ - острое респираторное заболевание  
ОРВИ - острое респираторное вирусное заболевание АТФ -  
аденозинтрифосфат  
НК - нуклеиновая кислота  
ХАО-хориоаллантоисная оболочка  
ЕСНО- кишечные цитопатогенные человеческие сиротские вирусы  
АГ - антиген  
АТ - антитело ИК - иммунный  
ИКК - иммунокомпетентные клетки ЦНС - центральная нервная  
система ВПГ - вирус простого герпеса  
ЭБ - Эпштейн-Барр  
ВГЧ - вирус герпеса человека  
ВГВ- вирус гепатита В ВГС- вирус гепатита С ВГД- вирус гепатита Д  
ВГЕ - вирус гепатита E ВГЖ - вирус гепатита J  
МВИ - медленные вирусные инфекции  
ПСПЭ - подострый склерозирующий панэнцефалит СПИД - синдром  
приобретенного иммунодефицита ИЛ - интерлейкин

## Использованная литературы

1. Ткаченко, К. В. Микробиология: учебное пособие / К. В. Ткаченко. — 2-изд. — Саратов: Научная книга, 2019. — 159 с. — ISBN 978-5-9758-1750-1. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. — URL: <http://www.iprbookshop.ru/80990.html>. — Режим доступа: для авторизир. пользователей
2. Руденко, Е. Ю. Специальная микробиология: лабораторный практикум / Е. Ю. Руденко. — Самара: Самарский государственный технический университет, ЭБС АСВ, 2019. — 88 с. — ISBN 2227-8397. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. — URL: <http://www.iprbookshop.ru/90922.html>. — Режим доступа: для авторизир. пользователей
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Атлас-руководство: Учебное пособие / Под ред. А.С. Быкова, В.В. Зверева.- Москва: ООО «Издательство «Медицинское информационное агенство», 2018.- 416 с. : ил.
4. Киркимбаева, Ж. С. Частная микробиология : учебное пособие / Ж. С. Киркимбаева. — Алматы :Нур-Принт, 2014. — 274 с. — ISBN 978-601-241-116-4. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. — URL: <http://www.iprbookshop.ru/67175.html> . — Режим доступа: для авторизир. пользователей
5. Мальцев, В.Н. Медицинская микробиология и иммунология: Учебник / В.Н. Мальцев, Е.П. Пашков; под ред. В.В. Зверева.- М.: Практическая медицина, 2014.- 512 с.: ил.

АЛИЕВА Диана Арасуловна  
БАТЧАЕВА Альбина Хыйсаевна  
СМЕЯНОВ Владимир Владиславович  
КИПКЕЕВА Файруза Ибрагимовна

# МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие  
Курс лекций по микробиологии,  
вирусологии обучающихся 2,3 курса по специальностям  
31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.02 «Педиатрия»  
**Часть 1**

Корректор Чагова О.Х.  
Редактор Чагова О.Х.

Сдано в набор 05.06.2024 г.  
Формат 60x84/16  
Бумага офсетная.  
Печать офсетная.  
Усл. печ. л. 5,58  
Заказ №4892  
Тираж 100 экз.

Оригинал-макет подготовлен  
в Библиотечно-издательском центре СКГА  
369000, г. Черкесск, ул. Ставропольская, 36