

Бактериофаги.

Свойство бактериофагов разрушать бактерии используется для предупреждения и лечения бактериальных заболеваний. Через 10-15 минут после введения бактериофагов в организм возбудители чумы, брюшного тифа, дизентерии, сальмонеллеза обезвреживаются. Но у этого метода есть серьезный недостаток. Бактерии более изменчивы, чем бактериофаги, поэтому бактериальные клетки относительно быстро становятся нечувствительными к фагам. Различают стафилококковый, стрептококковый, протейный, синегнойный, клебсиеллезный, брюшнотифозный, дизентерийный, сальмонеллезный лекарственные бактериофаги. Имеются и их комбинированные формы: колипротейный бактериофаг, интести бактериофаг (содержит фаги шигелл Флек- снера серовара 1.2.3.4.6 и Зонне), сальмонелл (паратифа А и В, энтерилитис, тифимуриум, холера, суис, ораниенбург), энтеро- патогенных групп кишечной палочки, протей вульгарис и мира- билис, стафилококков, синегнойной палочки и патогенных энтерококков), пиобактериофаг комбинированный (содержит фаги стафилококков, стрептококков, патогенной кишечной палочки и синегнойной палочки). Созвучный, но все-таки иной препарат пиобактериофаг поливалентный очищенный содержит фаги стафилококков, стрептококков, патогенной кишечной палочки, протей и клебсилл пневмонии. Данный препарат отличается наиболее высокой степенью очистки от бактериальных метаболитов, что значительно улучшает его вкусовые качества и делает средством первого выбора у детей до года. Фаги — вирусы бактерий и ряда других микроорганизмов. В определенных условиях они вызывают лизис (растворение) своих хозяев. В 1898 году Гамалей показал, что фильтрат сибиреязвенных бацилл вызывает лизис свежих культур этих микроорганизмов. В 1917 году французский микробиолог Д'Эррель изучал возбудителя дизентерии, наблюдал лизис бактериальной культуры при внесении в нее фильтрата испражнений больных людей.

- а — с длинным сложным отростком;
- б — с коротким отростком;
- в — с аналогом отростка;
- г — нитевидные

Лизирующее начало сохранялось при многократном пассировании культуры дизентерийных бактерий и даже становилось более активным. Агента, растворяющего бактерии, автор назвал бактериофагом (пожиратель бактерий), а действие бактериофага, заканчивающееся лизисом бактерий, — феноменом бактериофагии.

Д'Эррель высказал предположение, что бактериофаг является инфекционным агентом, лизирующим бактерии, вследствие чего в окружающую среду поступают дочерние фаговые частицы. На твердых средах, засеянных смесью фага с бактериальной культурой, в местах лизиса бактерий появляются стерильные пятна или негативные колонии фагов. Посев этой же бактериальной культуры на жидкую среду приводит к просветлению среды. Номенклатура бактериофагов основана на видовом наименовании

хозяина. Например, фаги, лизирующие дизентерийные бактерии, получили название дизентерийных бактериофагов, сальмонеллы — сальмонеллезных бактериофагов, дифтерийные бактерии — дифтерийных бактериофагов.

Природа фагов. Фаги — это организмы, которые, подобно всем живым существам, способны размножаться, передавать потомству свои свойства и изменяться под воздействием различных факторов. Они могут инфицировать и разрушать только молодые развивающиеся клетки, являясь их паразитами.

Морфология фагов. Большинство фагов состоит из головки и хвостового отростка. Наиболее изучены Т-фаги (типовые) кишечной палочки. Их отросток представляет собой полый цилиндр (стержень), покрытый чехлом и заканчивающийся базальной пластинкой с шипами-фибриллами.

Химический состав фагов. Фаги состоят из НК одного типа (чаще ДНК) и белка. Молекула НК, скрученная в спираль, находится в головке фага. Внутри хвостового отростка проходит полая трубка (стержень), сообщаясь с головкой, а снаружи — чехол отростка, заканчивающийся шестиугольной базальной пластинкой с шипами, от которых отходят фибриллы (нити). Оболочка фага (капсид) и отросток имеют белковую природу. На свободном конце отростка содержится литический фермент, обычно лизоцим или гиалуронидаза.

Резистентность к факторам окружающей среды. Фаги более устойчивы к действию физических и химических факторов, чем многие вирусы человека. Большинство из них инактивируются при температуре свыше 65—70 °С. Они хорошо переносят замораживание и длительно сохраняются при низких температурах и высушивании. Ультрафиолетовые лучи и ионизирующая радиация также вызывают инактивирующий эффект, а в низких дозах — мутации.

Специфичность фагов. Фаги обладают строгой специфичностью. Различают видовую специфичность, т.е. способность паразитировать только в определенном виде микроорганизма. Именуют фаги обычно по названию микроба-хозяина (стрептококковый, стафилококковый, холерный, дизентерийный). Фаги с более строгой специфичностью паразитируют только на определенных представителях данного вида — это типовые фаги. Фаги, лизирующие микроорганизмы близких видов, например видов, входящих в род возбудителей дизентерии (шигелл), называются поливалентными.

Взаимодействие фага с чувствительной клеткой проходит через последовательные стадии (1—2 ч):

адсорбция частиц фага на поверхностных рецепторах клетки осуществляется с помощью нитей хвостового отростка. На одной клетке могут адсорбироваться сотни фагов. Адсорбция фагов специфична;

проникновение (инъекция) НК фага в клетки у разных фагов происходит по-разному;

репродукция белка НК фага внутри клетки;
сборка и формирование зрелых частиц фага.

Лизис клетки и выход зрелых частиц фага из нее. Происходит разрыв клеточной стенки, и в окружающую среду выходит несколько сот новых

фагов, способных поражать свежие клетки. Такой лизис называется лизисом изнутри. В отличие от лизиса изнутри, лизис извне происходит тогда, когда на клетке адсорбируется сразу очень большое количество фагов. Они проделывают в клеточной стенке многочисленные отверстия, через которые вытекает содержимое клетки. Таким образом, при лизисе извне фаг не размножается и количество его частиц не увеличивается. По характеру действия на микроорганизмы различают вирулентные и умеренные фаги.

Вирулентные фаги вызывают лизис зараженной клетки с выходом в окружающую среду большого количества фаговых частиц, способных поражать новые клетки.

Умеренные фаги лизируют не на все клетки в популяции. Часть фагов вступают в симбиоз: НК фага (его геном) встраивается в хромосому клетки и получает название профага. Происходит образование единой хромосомы. Бактериальная клетка при этом не погибает. Профаг, ставший частью генома клетки, при ее размножении может передаваться неограниченному числу потомков, т.е. новым клеткам. Явление симбиоза микробной клетки с умеренным фагом (профагом) носит название лизогения, а культура, в которой имеется профаг, называется лизогенной. Это название отражает способность профага спонтанно покинуть хромосому клетки и, переходя в цитоплазму, превращаться в вирулентный фаг. Те клетки культуры, в которых образовался вирулентный фаг, погибают (лизируются), остальные сохраняют лизогенность.

Распространение фагов в природе повсеместно. Фаги встречаются в воде, почве, сточных водах, выделениях человека и животных. Почти все известные бактерии являются хозяевами специфических для них фагов.

Устойчивость фагов к физическим и химическим факторам выше, чем у вегетативных форм их хозяев. Фаги выдерживают нагревание до 75 °С, длительное высушивание, рН от 2,0 до 8,5. Они не чувствительны к антибиотикам, тимолу, хлороформу и ряду других веществ, уничтожающих сопутствующую микрофлору. Поэтому эти вещества используют при выделении и сохранении фагов. Кислоты и дезинфицирующие вещества губительны для фагов.

Методы выделения фагов.

Прямой метод. Фаг получают и изучают в фильтратах исследуемого материала. О наличии и активности фага узнают по лизису чувствительной к нему культуры.

Метод обогащения. Подготовительный фильтрат вносят в 2—3-часовую бульонную культуру соответствующих микроорганизмов. Посев инкубируют в термостате. Фаг размножается в клетках культуры, и титр его значительно увеличивается. После этого бульон фильтруют и в фильтрате определяют свойства и активность фага.

Применение фагов в диагностике. Применение фагов основано на их строгой специфичности и способности разрушать микробные клетки или вступать с ними в симбиоз. Метод фаготипирования бактерий широко применяется в микробиологической практике. Он позволяет определить не

только видовую принадлежность исследуемой культуры, но и ее фаготип (фаговар). Это связано с тем, что у бактерий одного и того же вида имеются рецепторы, адсорбирующие строго определенные фаги, которые затем вызывают их лизис. Использование наборов таких типоспецифических фагов позволяет проводить фаготипирование исследуемых культур с целью эпидемиологического анализа инфекционных заболеваний: установления источника инфекции и путей ее передачи.

Фагопрофилактика и фаготерапия — предупреждение и лечение инфекций с помощью фагов — основаны на том, что, встречая в организме больного возбудителя болезни, фаг уничтожает его (стафилококковые и стрептококковые инфекции, вызванные кишечной палочкой и протеем). Препараты бактериофагов применяются для лечения дизентерии, сальмонеллеза, гнойной инфекции, вызванных бактериями. Вначале определяют чувствительность к данному препарату бактериофага. Сальмонеллезные фаги применяются для профилактики одноименного заболевания в детских коллективах.

Фагодиagnostика включает:

идентификацию выделенных культур с помощью известных (диагностических) фагов. Культура соответствует тому фагу, который ее лизировал. Строгая специфичность типовых фагов дает возможность типировать варианты внутри вида (фаговары);

определение неизвестного фага по тест-культуре микробов;

ускоренный метод диагностики с помощью реакции нарастания титра фага (РНТФ) не требует выделения чистой культуры возбудителя.

Исследуемый материал и индикаторный фаг, титр которого строго установлен, вносят в бульон. После инкубации в термостате определяют титр фага по Грациа. Увеличение титра в 5 раз и более говорит о том, что в исследуемом материале есть соответствующие возбудители, в которых фаг размножился. Умеренные фаги широко применяют при решении кардинальных вопросов биологии.

Методы микробиологической диагностики вирусных инфекций.

Серологические методы в вирусологии основаны на реакции связывания комплемента, торможения гемагглютинации, биологической нейтрализации, иммунодиффузии, непрямой гемагглютинации, радиального гемолиза, иммунофлюоресценции, иммуноферментного, радиоиммунного анализа. Эти методы используют для идентификации вирусов с помощью набора известных сывороток и для серодиагностики с целью определения нарастания антител во второй сыворотке по сравнению с первой (первую сыворотку берут в первые дни после заболевания, вторую — через 2-3 недели). Для идентификации индивидуальных антигенов вирусов и антител к ним в сложных смесях без предварительной очистки белков используют иммуноблоттинг. Метод сочетает фракционирование белков с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с последующей иммуноиндикацией белков иммуноферментным методом. Разделение белков снижает требования к

химической чистоте антигена и позволяет выявлять индивидуальные пары антиген — антитело.

Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК) — определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. *sequentum* — последовательность). В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сенгеру. В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной м-РНК и даже полных геномов организмов. Для секвенирования применяют методы Эдмана, Сенгера и другие; в настоящее время для секвенирования генов обычно применяют метод Сенгера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP). Обычно до начала секвенирования производят амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить при помощи ПЦР.

Дезоксинуклеотидный метод, или метод «обрыва цепи», был разработан Ф. Сенгером в 1977 году и в настоящее время широко используется для определения нуклеотидной последовательности ДНК. При секвенировании по Сенгеру происходит гибридизация синтетического олигонуклеотида длиной 17-20 звеньев со специфическим участком одной из цепей секвенируемого участка.

Методы идентификации нуклеиновых кислот. Методы выявления ДНК- и РНК-возбудителей в настоящее время применяют в основном для диагностики вирусных инфекций. Методы генной диагностики базируются на выявлении нуклеотидных последовательностей непосредственно в патологическом материале с помощью молекулярных зондов — искусственно полученных нуклеиновых кислот, комплементарных вирусным нуклеиновым кислотам и меченных биотином или радиоактивной меткой.

Особенность метода ПЦР — многократное копирование (амплификация, репликация) с помощью фермента ДНК-полимеразы определенного фрагмента ДНК, состоящего из нескольких десятков или сотен нуклеотидных пар, который уникален, то есть специфичен для данного вида вируса возбудителя. Механизм репликации таков, что достраивание фрагмента может начаться только в определенных стартовых блоках, для создания которых в заданных участках ДНК используют затравки (праймеры) — специально синтезированные олигонуклеотиды. Праймеры комплементарны последовательностям в пределах границ специфического фрагмента, и синтез ДНК протекает только в этих границах.

Процесс ПЦР заключается в большом числе циклов синтеза (амплификации) специфического фрагмента ДНК, накоплении большого числа копий, которые затем могут быть выявлены обычными методами детекции (иммунофлюоресцентный анализ, электрофорез).