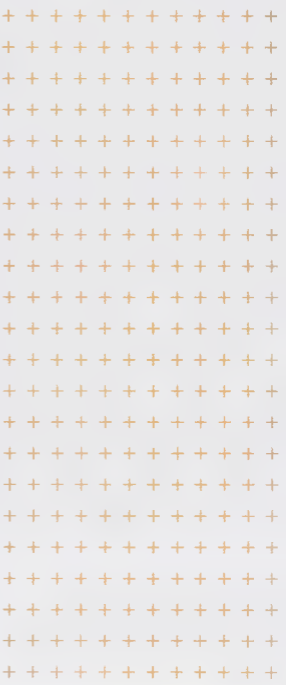


БИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

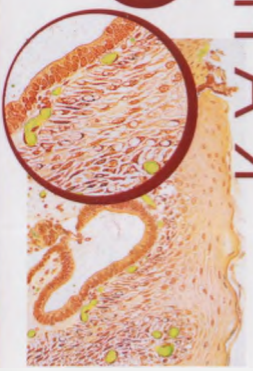


МИНСК
2019



ВЕТЕРИНАРНАЯ

ММНКР



ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРО- БИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

*Допущено Министерством образования Республики Беларусь
в качестве учебного пособия для студентов учреждений высшего образования
по специальности «Ветеринарная медицина»*



Минск
«ИВЦ Минфина»
2019

УДК 619:[579.62+612.017.1](075.8)

ББК 48я73

В39

Авторы:

А. А. Вербицкий, В. Н. Алешкевич, А. П. Медведев,
Р. Б. Корочкин, С. В. Даровских, А. А. Гласкович

Рецензенты:

кафедра микробиологии и эпизоотологии УО «Гродненский государственный аграрный университет» (кандидат сельскохозяйственных наук, доцент зав. кафедрой микробиологии и эпизоотологии *И. М. Лоико*); кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Белорусского государственного университета *А. Г. Песнякевич*

Ветеринарная микробиология и иммунология : учебное пособие / А. А. Вербицкий [и др.]. — Минск : ИВЦ Минфина, 2019. — 526 с.

ISBN 978-985-7224-45-6.

Учебное пособие содержит основные сведения о морфологии, физиологии, генетике микроорганизмов. Приведена современная систематика микроорганизмов и основные таксономические категории, идет речь об инфекции и инфекционном процессе. Рассмотрены вопросы иммунологии. Частная микробиология содержит сведения о возбудителях основных инфекционных болезней сельскохозяйственных животных, принципах их лабораторной диагностики и специфической профилактики.

Адресовано студентам учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина». Может быть полезно преподавателям микробиологии, эпизоотологии, микробиологам производственных ветеринарных лабораторий, слушателям ФПК, широкому кругу специалистов АПК.

УДК 619:[579.62+612.017.1](075.8)

ББК 48я73

ISBN 978-985-7224-45-6

© Оформление. УП «ИВЦ Минфина», 2019

Предисловие

Микробиология (от гр. *micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – учение) – наука о мельчайших невидимых невооруженным глазом существах, названных микроорганизмами. Объектами ее исследования являются бактерии, синезеленые водоросли, микроскопические грибы, простейшие, хламидии, риккетсии, актиномицеты, вирусы, прионы.

Создание пособия обусловлено появлением новых сведений о строении бактериальной клетки, биологических свойствах хламидий, риккетсий, микоплазм и других групп микроорганизмов, современной систематики, предусматривающей новую таксономию и номенклатуру патогенных видов бактерий, разработкой и внедрением в микробиологическую практику более достоверных способов диагностики инфекционных болезней, методов их активной и пассивной профилактики, появлением на рынке новых специфических препаратов диагностического, профилактического и лечебного назначения.

В разделе «Общая микробиология» освещены вопросы систематики, классификации и номенклатуры микроорганизмов. В нем описываются тинкториально-морфологические свойства шаровидных, палочковидных, извитых форм микроорганизмов, микоплазм, риккетсий, хламидий, актиномицетов. В этом же разделе приводятся сведения о физиологии и генетике микроорганизмов, влиянии факторов внешней среды на бактерии, представлены основы учения об инфекции.

В разделе «Основы иммунологии» изложен материал, касающийся истории развития иммунологии, ее основных достижений, приводятся данные об иммунитете и его видах, указываются основные задачи иммунологии как науки. Представлено строение иммунной системы млекопитающих и птиц, описываются формы иммунного реагирования на антигены, конститутивные (врожденные) и индуцибельные факторы защиты организма, факторы взаимодействия клеток, механизмы формирования иммунитета, аллергические реакции и аллергены, методы иммунодиагностики инфекционных болезней, биопрепараты для специфической профилактики этих болезней и лечения больных животных, даны биотехнологические основы производства биопрепаратов, способы определения их качества, условия хранения и применения.

Раздел «Частная микробиология» посвящен изучению возбудителей конкретных инфекционных болезней, их морфологии, культуральных, биохимических, патогенных и других свойств. В пособии в доступной форме излагают-

ся основные данные относительно бактериальной этиологии инфекционных болезней.

В первую очередь авторы дают определение болезни, затем приводят исторические данные, систематическое положение возбудителя, описывают его морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические свойства, способы лабораторной диагностики и т. д. в соответствии с традиционной сложившейся схемой изучения бактериальных инфекций в практике обучения студентов.

Материал пособия изложен в логической последовательности и взаимосвязи в научном стиле, но в понятной и доступной для понимания форме.

В пособие включены современные материалы по инфекционным болезням, которые наиболее часто поражают животных разных видов в хозяйствах страны и наносят значительный экономический ущерб.

ВВЕДЕНИЕ В МИКРОБИОЛОГИЮ

В.1. Предмет и история развития микробиологии

Микробиология (от гр. *micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – учение) – наука о мельчайших живых существах не видимых невооруженным глазом. Их называют микроорганизмами или микробами. Это собирательное название мельчайших преимущественно одноклеточных прокариотических и эукариотических организмов. К ним относят бактерии, грибы, водоросли, простейшие, а также простейшие формы жизни (вирусы, прионы, инфекционные нуклеиновые кислоты – вирионы), не являющиеся организмами в полном смысле этого слова. Все они составляют микромир – грандиозную по численности и видовому составу совокупность невидимых существ, обитающих на нашей планете.

Микробиология изучает строение, физиологию, биохимию, генетику и экологию микроорганизмов, их роль и значение в жизни человека, животных и продуктивности биосферы.

Своим успешным развитием микробиология обязана в первую очередь достижениям физики и химии. Применение электронной микроскопии позволило изучить тонкую структуру бактериальной клетки, химия дала много новых аналитических методов исследования, позволивших расшифровать особенности обмена веществ. Микробиология также тесно связана с такими науками, как генетика, вирусология, эпизоотология, фармакология, хирургия, ветеринарно-санитарная и судебная экспертиза и с другими предметами. Достижения микробиологии позволяют решить многие теоретические проблемы общей биологии и ветеринарной медицины. На микроорганизмах впервые была установлена роль ДНК в передаче наследственной информации, доказана сложная структура гена и зависимость мутационных процессов от изменений в структуре ДНК.

Углубленное изучение микробов различных групп привело к формированию в пределах микробиологии таких самостоятельных наук, как бактериология, микология, вирусология, риккетсиология и др. Каждая из них детализирует наши знания биологии и роли определенного микробъекта. Вместе с тем в зависимости от задач микробиология подразделяется на общую и отраслевые науки. Общая микробиология изучает функционально-морфологические закономерности микромира, тогда как отраслевые науки исследуют преимущественно прикладную роль микроорганизмов. Например, промышленная микробиология изучает технологические аспекты использования микробов в народном хозяйстве, сельскохозяйственная микробиология исследует роль микроорганизмов преимущественно в растениеводстве, медицинская микробиология изучает в основном значение микробов в патологии человека. В центре внимания ветеринарной микробиологии – микроорганизмы, вызывающие инфекционные болезни сельскохозяйственных животных, промысловых и диких животных, рыб, пчел, а также возбудителей болезней, общих для животных и человека (зооантропонозы). Кроме того, она изучает микроорганизмы, имеющие значение в животноводстве (микробиоту кормов, желудочно-кишечного тракта) и технологии пищевых продуктов животного происхождения.

Ветеринарная микробиология состоит из:

- общей микробиологии;
- основ иммунологии;
- частной микробиологии.

Общая микробиология изучает морфологию и физиологию микроорганизмов, их распространение в природе, роль в круговороте веществ, влияние факторов внешней среды на микробы, их генетику, роль микробов в инфекционном процессе, условия возникновения инфекции, патогенность и вирулентность микроорганизмов, вопросы систематики бактерий и многие другие вопросы.

Иммунология изучает иммунную систему организма, факторы иммунитета, его формирование, влияние антигена на организм, синтез и динамику образования антител, вопросы аллергии, серологические реакции, специфическую иммунопрофилактику инфекционных болезней, терапию животных и целый ряд других вопросов.

Частная микробиология исследует возбудителей инфекционных болезней, их биологические свойства, пути проникновения микробов в организм, патогенез болезни, пути выделения возбудителей из организма, устойчивость микробов по отношению к различным факторам

внешней среды, вопросы лабораторной диагностики, профилактики и терапии больных животных и т. д.

Современному представлению о микроорганизмах и их биологических особенностях предшествовало длительное развитие микробиологии как науки. Историю развития микробиологии условно можно разделить на пять периодов, или этапов:

- эвристический;
- морфологический;
- физиологический;
- иммунологический;
- современный — молекулярно-генетический.

Эти этапы не столько связаны хронологически, сколько обусловлены основными достижениями и открытиями.

Эвристический период — IV—III тысячелетие до н. э. связан, скорее, с логическими и методическими приемами нахождения истины, т. е. эвристикой (от гр. *эврика* — неожиданная находка), чем с какими-либо экспериментами и доказательствами. Мыслители того времени предполагали, что болезни вызывают мелкие невидимые животные «миазмы». Так считали Гиппократ, Гален, Лукреций, Фукидид, поэт Веррон и др.

Итальянский врач и астроном Дж. Фракасторо (1478—1553) высказал идею о живом контагии (*contagium vivum*), который вызывает болезни. При этом каждая болезнь вызывается своим контагием, т. е. он впервые указал на специфичность инфекционных болезней.

Морфологический период связан с изобретением микроскопа и изучением морфологии микробов. Начало этого периода датируется с 1695 г., т. е. с момента открытия микробов А. Левенгуком.

Физиологический период относится ко второй половине XIX в. и характеризуется изучением жизнедеятельности микробов, их физиологии.

Иммунологический период связан с работами Луи Пастера по созданию вакцин и вакцинации и начинается примерно с 1880 г.

Современный этап развития микробиологии начинается с 1953 г., когда Дж. Уотсон и Ф. Крик расшифровали строение ДНК, которая является носителем наследственности. Этот этап характеризуется определением молекулярной структуры бактерий и вирусов, их генетического кода.

Считают, что впервые увидел и описал микробов голландец А. ван Левенгук (1632—1723) в 1676 г., сконструировавший микроскоп,



А. Левенгук

который давал увеличение в 270–300 раз. А. Левенгук был торговец сукном, в родном городе Дельфте слыл умным и деловитым человеком редких способностей, приобретшим обширные знания путем самообразования. Он был мастером по обработке металлов, производству стеклянных изделий, искусным шлифовальщиком линз. С помощью микроскопа собственной конструкции он рассматривал различные настои, воду, слюну, кровь, испражнения, зубной налет, коровий навоз, листья растений и т. д. Всюду он находил мельчайших «зверушек», т. е. микробов, называя их «анималькулами».

«С величайшим изумлением, — писал он, — я видел в зубном налете множество мельчайших животных, весьма оживленно двигавшихся. В моем рту их больше, чем людей в Соединенном королевстве».

В 1695 г. он опубликовал книгу «Тайны природы, открытые Антоном Левенгуком». Результаты своих наблюдений он посылал в Лондонское королевское общество, членом которого впоследствии был избран. Всего написал свыше 170 писем.

В 1698 г. Петр I работал на корабельных верфях в Голландии, беседовал с Левенгуком, привез микроскопы в Россию, один из которых ему подарил А. Левенгук.

Понятие «бактерия» ввел в употребление Х. Эренберг в 1828 г. Изучение строения бактериальной клетки началось с изобретения в 1930 г. электронного микроскопа. В 1937 г. Э. Чаттон предложил делить все организмы по типу клеточного строения на прокариот и эукариот, и в 1961 г. Р. Стейниер и Н. ван Корнелис окончательно оформили это деление. Развитие молекулярной биологии привело к открытию в 1977 г. К. Везе коренных различий и среди самих прокариот: между бактериями и археями.

Начало современной микробиологии положил выдающийся французский ученый Луи Пастер (1822–1895). Он доказал, что спиртовое брожение является результатом деятельности дрожжей, молочнокислое — вызывается молочнокислыми бактериями, маслянокислое — протекает без доступа воздуха под влиянием маслянокислых микробов, т. е. открыл явление анаэробнозиса. Во времена Пасте-

ра гниение рассматривали как химический процесс. Он же доказал его биологическую природу. Л. Пастеру принадлежит честь открытия возбудителей куриной холеры, стафилококков, стрептококков, пневмококков. Он указал, что родильная горячка, остеомиелит вызываются микробами, а пемблина и фляшерия (болезни шелковичных червей) — стрептококками. Ученый обосновал процессы дезинфекции и стерилизации, предложил методы обработки вина и пива, предупреждающие их порчу. Разработал вакцины против сибирской язвы, пастереллеза, бешенства, рожи свиней.

Ученых, современников Л. Пастера, волновали три основные проблемы, послужившие стимулом для проведения исследований, приведших к интенсивному развитию микробиологии:

- природа процессов брожения и гниения;
- проблема самозарождения организмов;
- причина возникновения инфекционных болезней.

Большинство исследователей рассматривало брожение и гниение как чисто химические процессы и считало, что живые существа самопроизвольно зарождались из неживой природы. Например, знаменитый голландский алхимик Я. Б. ван Гельмонт (1579–1644) полагал, что если грязную рубашку положить в один сосуд с пшеницей и выдержать 21 день в темноте, то из испарений зерна и человеческого пота возникнет живая мышь. Прямых доказательств причин возникновения инфекционных болезней не было. Л. Пастер доказал, что причиной процесса брожения и гниения, а также инфекционных болезней являются микроорганизмы. Он же на простых и оригинальных опытах показал, что живые организмы зарождаются от себя подобных живых организмов, т. е. из неживой природы они возникать не могут. За решение проблемы самозарождения Л. Пастеру была присуждена премия Французской академии наук. Многочисленные достижения в области биологии, связанные с именем Л. Пастера, невольно наводят на вопрос: «Что все это счастливая случайность?» На этот вопрос можно ответить словами самого Л. Пастера: «...В области наблюдений счастливая случайность выпадает лишь на долю подготовленных умов».



Л. Пастер



Р. Кох

Большой вклад в развитие микробиологии внес немецкий ученый Роберт Кох (1843—1910). Он открыл возбудителей туберкулеза и холеры, предложил плотные питательные среды и метод выделения чистых культур, окрашивание бактерий анилиновыми красителями, микрофотографирование и автоклавирование. Р. Кох применил для микроскопии иммерсионную систему и конденсор Аббе, разработал метод получения туберкулина, открыл возбудителя сибирской язвы и доказал, что он образует споры.

Ученый экспериментально обосновал теорию и практику дезинфекции, а также постулаты под названием «триада Генле—

Коха». Суть этого положения сводится к следующему:

подозреваемый вид микроорганизмов должен быть обнаружен в больном организме;

вид микробов, вызвавших болезнь, должен быть получен в чистой культуре;

введение чистой культуры в организм должно вызывать тоже заболевание, что и у первоначально заболевших животных.

Р. Кох и его ученики открыли возбудителей азиатской холеры, столбняка, брюшного тифа, гонореи. Р. Коха называли королем медицины и отцом бактериологии.



И. И. Мечников

Большую роль в развитии микробиологии сыграли русские ученые. Основателем медицинской микробиологии в России справедливо считают И. И. Мечникова (1845—1916), который окончил Харьковский университет, стал профессором в 26 лет. Он исследовал патогенез холеры человека, туберкулеза, тифа, сифилиса. Разработал учение о микробном антагонизме, обосновал теорию долголетия и фагоцитоза, раскрыл сущность воспаления как защитной реакции организма. И. И. Мечников является отцом иммунологии. Ученый впервые предложил использовать гриб *Isaria destructor* для борьбы

с вредителем полей — хлебным жуком, т. е. он основатель биологического метода борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений.

Основателем общей микробиологии в России является Л. С. Ценковский. Объектом его исследований были простейшие, водоросли, грибы. Он изучал изменчивость микроорганизмов, создал вакцину против сибирской язвы, описал явление симбиоза.

Основателем общей почвенной микробиологии был С. Н. Виноградский (1856—1953). Он разработал накопительные питательные среды, выделил и изучил азотфиксирующие и нитрофицирующие бактерии, установил роль микробов в круговороте N, C, P, Fe, S. Открыл новый тип питания микробов — аутоτροφизм, т. е. способность синтезировать органические вещества; хемосинтез — способность жить за счет окисления аммиака, сероводорода, закисного железа, не нуждаясь в органическом веществе, синтезируя компоненты тела из углекислоты воздуха.

Ученик С. Н. Виноградского — В. Л. Омелянский (1867—1928) изучал круговорот веществ в природе, выделил целлюлозоразрушающие бактерии, описал физиологию и химизм этого процесса, написал первый русский учебник «Основы микробиологии» и первое русское руководство по микробиологии.

Д. И. Ивановский (1864—1920) открыл фильтрующиеся вирусы, создал новую отрасль микробиологической науки — вирусологию. Он установил, что возбудитель мозаичной болезни табака — живое начало, невидимое под микроскопом и проходящее через бактериальные керамические фильтры, опубликовал работы «О двух болезнях табака» и докторскую диссертацию «Мозаичная болезнь табака» (1902).

Н. Ф. Гамалея (1859—1949) посвятил свои работы изучению инфекции и иммунитета, изменчивости бактерий, профилактике сыпного тифа, холеры, туберкулеза. Он открыл птичий вибрион, описал лизис бактерий под влиянием неизвестного в то время бактериофага.

Н. А. Михин (1872—1946) — один из основоположников ветеринарной микробиологии — открыл возбудителя лептоспироза крупного рогатого скота, разработал методику приготовления формолвакцины



Д. И. Ивановский

против сальмонеллеза телят, методику получения противосибирез-венной и противоколибактериозной сывороток. Он является автором первого российского учебника «Курс частной микробиологии для ветеринарных врачей и студентов».

Большой вклад в развитие ветеринарной микробиологии внесли Г. М. Андриевский, С. Н. Вышелесский, М. Г. Тартаковский, Н. Н. Гинсбург, Я. Е. Коляков, С. Г. Колесов, Я. Р. Коваленко, Н. В. Лихачев, А. Х. Саркисов, Р. А. Цион, М. К. Юсковец, Ю. А. Малахов и многие другие.

В.2. Положение микроорганизмов в природе

Мир микроорганизмов сложен и разнообразен. Они распространены в природе от Антарктиды до Сахары. Их количество неисчислимо и разнообразно. Несмотря на то что размеры микробов ничтожно малы и измеряются в микрометрах (мкм), $1 \text{ мкм} = 0,001 \text{ мм} = 10^{-6} \text{ м}$, они составляют одну треть всей биосферы, имеют большой удельный вес в живой природе. Их масса во много раз превосходит массу мира животных. Они выделяют до 95 % углекислоты, которая образуется в природе всеми живыми существами.

Микробам присущи следующие свойства: относительно просто устроены, обладают интенсивным размножением, массовостью популяции, высоким уровнем метаболизма, способностью к трансформации различных веществ, высокой приспособляемостью и устойчивостью ко многим факторам окружающей среды, обитают в различных объектах внешней среды, в животном и растительном мире.

Естественно, что микробы как биологические существа живут, размножаются и осуществляют свои функции в благоприятных для них экологических условиях. В природных условиях микроорганизмы входят в состав биоценозов – совокупность растений и животных населяющих участок среды обитания, с более или менее однородными условиями жизни. В то же время в процессе своей жизнедеятельности микробы оказывают существенное влияние на неживую и живую природу. Хорошо известно, что бактерии обеспечивают круговорот веществ и энергии в природе, плодородие почв, поддержание газового состава атмосферы и других природных процессов. Благодаря их ферментативной активности образовались нефть, лечебные грязи. Разные виды микробов синтезируют антибиотики, ферменты, витамины, сте-

роиды, аминокислоты. Микроорганизмы используются в хлебопечении, пивоварении, виноделии, производстве молочных продуктов (кефира, кумыса), изготовлении чая, кофе, какао, обработке каучука, шелка, хлопка, дублении кож, выщелачивании руд, повышении плодородия почвы, в микробиологической промышленности (получение кормовых дрожжей, белково-витаминных добавок и т. д.). Многие микроорганизмы питаются органическими веществами погибших организмов. Разлагая трупы, микробы выполняют функцию очищения в биотическом круговороте веществ.

Многие из микробов болезнетворны, т. е. патогенны для человека, животных, птиц, насекомых и растений. Это связано с их паразитизмом, т. е. эволюционно сложившимся способом существования микробов с определенными представителями животного и растительного мира. Большинство микробов не болезнетворны и обитают в неживой природе (почве, воде, атмосфере и др.). В связи с этим микробы делят на патогенные, т. е. болезнетворные (от гр. *pathos* — болезнь), и непатогенные. Последние называют сапрофитами (от гр. *sapros* — гнилой и *phyton* — растение).

Однако существует большая группа непатогенных микробов, которые при определенных условиях (ослабленный организм, факторы, активизирующие жизнедеятельность микроба) вызывают болезни. Такие микробы называют условно-патогенными. Так, из 500 видов непатогенных бактерий (кишечная палочка, стафилококк, лактобациллы и др.), обитающих на поверхности слизистых оболочек и кожи человека, практически все при определенных условиях могут вызвать болезнь, т. е. стать условно-патогенными.

В.3. Задачи ветеринарной микробиологии

Основными задачами микробиологии являются:

изучение микробов — возбудителей инфекционных болезней млекопитающих, птиц, пчел, рыб — зоонозов, а также зооантропонозов (от гр. *zoon* — животное, *anthropos* — человек, *nosos* — болезнь);

изучение микроорганизмов, имеющих значение в животноводстве (микробиота тела животных, кормов, воды, почвы и т. п.), в технологии приготовления кормов для животных (термин «микробиота» рекомендован к употреблению вместо ранее широко используемого термина «микрофлора»);

разработка новых и совершенствование существующих методов лабораторной диагностики инфекционных болезней;

совершенствование существующих и разработка новых биопрепаратов для диагностики, профилактики и лечения животных (вакцины, сыворотки, иммуноглобулины, аллергены, антигены и др.).

В.4. Методы лабораторной диагностики инфекционных болезней

Диагноз на инфекционную болезнь ставят комплексно, т. е. учитывают результаты клинического исследования, данные вскрытия, эпизоотическую ситуацию в хозяйстве, районе. Однако решающее значение при диагностике инфекционной болезни имеет лабораторное исследование.

К основным методам лабораторной диагностики относят микроскопический; бактериологический; биологический; серологический и молекулярно-генетический.

Сущность *микроскопического метода* исследования заключается в изучении морфологических и тинкториальных свойств микробов, их строения с помощью световой, люминесцентной, фазово-контрастной, аноптральной и других видов микроскопии.

С помощью этого метода можно определить форму, размеры, взаиморасположение микробов, их подвижность, наличие спор, капсул, жгутиков, грампринадлежность, отношение к окраске специальными методами, учесть результаты реакции микроагглютинации и реакции агглютинации.

Бактериологический метод позволяет изучать физиологические свойства микробов (питание, дыхание, рост, размножение и др.), характер роста на питательных средах, выделение чистых культур, определять их свойства с целью идентификации вида микробов. С помощью бактериологического метода можно выделить чистую культуру из исследуемого материала (патологического материала, воды, почвы и др.), изучить характер роста микробов на питательных средах (жидких, полужидких, плотных), биохимические свойства (гликолитические, протеолитические, редуцирующие, гемолитические), определить подвижность бактерий. Применение бактериологического метода позволяет поддерживать ценные производственные и музейные штаммы микроорганизмов.

Биологический метод (биопроба) сводится к заражению лабораторных животных (белых мышей, морских свинок, голубей, кроликов и др.) или естественно восприимчивых животных с целью изучения в первую очередь патогенных, вирулентных и токсических свойств микробов, вызвавших болезнь. Этот метод позволяет выделить чистую культуру, определить ее патогенность и вирулентность, испытать биопрепараты на безвредность, токсичность, пирогенность, активность.

Серологический метод исследования заключается в изучении антигенных свойств культуры микробов с целью определения вида микроорганизмов, для обнаружения антител в сыворотках крови животных путем постановки серологических реакций: агглютинации (РА), преципитации (РП), связывания комплемента (РСК), нейтрализации (РН) и др.

Молекулярно-генетический метод основан на идентификации микроорганизмов по их генетическому коду. С этой целью используют метод ДНК-зондов и полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

Ценность микроскопического метода лабораторной диагностики заключается в быстрой ориентировочной диагностике болезни; бактериологического — в более достоверной постановке диагноза в срок от 1–3 до 7–60 сут. Наиболее быструю и достоверную диагностику проводят с помощью серологического и молекулярно-генетического метода.

Лабораторный диагноз ставят по совокупности данных микроскопического, бактериологического и серологического методов исследования с последующим анализом полученных результатов и обоснованием объективного заключения либо по результатам определения последовательности нуклеотидов в нуклеиновой кислоте микроорганизма молекулярно-генетическим методом.

Глава 1. СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ



1.1. Прокариоты и эукариоты

Элементарной физической единицей всего живого является клетка. По своему химическому составу все живые существа очень сходны. Основные компоненты всякой клетки – ДНК, РНК, белки, липиды и фосфолипиды. Изучение тонкого строения различных типов клеток позволило выявить заметные различия между бактериями и цианобактериями (синезеленые водоросли), с одной стороны, и животными и растениями – с другой. Различия между теми и другими настолько глубоки, что можно выделить две группы организмов: прокариоты и эукариоты. К *прокариотическим организмам* относят бактерии и синезеленые водоросли, к *эукариотическим* – грибы, простейшие, растения, животные и водоросли.

От истинных ядерных клеток эукариот прокариоты отличаются неотделенной оболочкой кольцевой молекулой ДНК, свободно расположенной в цитоплазме. Кроме того, в прокариотической клетке могут содержаться очень небольшие кольцевые молекулы ДНК – плазмиды. Прокариоты не имеют дифференцированного аппарата митоза, у них нет ядрышка. Они имеют рибосомы 70S, и

большинство из них имеет клеточную стенку, содержащую пептидогликан, который отсутствует у эукариот. Размеры прокариот варьируются в пределах 1–20 мкм. У прокариот нет митохондрий и хлоропластов. Среди них есть аэробные и анаэробные организмы. Кроме того, прокариоты отличаются отсутствием внутриплазматического ретикулула (кроме участвующего в фотосинтезе аппарата цианобактерий), накоплением запасного вещества поли- β -оксибутирата и другими уникальными признаками. Основные отличительные характеристики прокариотических организмов представлены в таблице.

Таблица. Отличительные свойства клеток прокариот и эукариот

Признак	Клетка	
	прокариотическая	эукариотическая
Средний размер, мкм	1–10	10–100
Ядерная мембрана	Отсутствует	Есть
Хромосома	Одна	Несколько
Гистоны	Отсутствуют	Есть
Тип деления	Бинарный	Митотический
Специализированные мембранные структуры	Отсутствуют	Есть
Клеточная стенка	Образована пептидогликанами	Содержит хитин или целлюлозу
Стероиды клеточной стенки	Отсутствуют	Есть
Рибосомы	70S	80S
Анаэробное дыхание	Возможно	Обычно отсутствует
Гканевая дифференцировка	Отсутствует	Обычно есть
Фиксация азота	Возможна	Невозможна

Эукариоты имеют дифференцированное ядро, отграниченное от цитоплазмы ядерной мембраной, аппарат митоза и ядрышко. Ядерная ДНК эукариот находится в комплексе с гистонами в соотношении 1:1; хромосомы эукариот построены в виде регулярных компактных структурных единиц – нуклеосом, которые состоят из белковой глобулы и обвивающего ее фрагмента ДНК размером в 200 пар нуклеотидов. В свою очередь нуклеосомы образуют хроматоидные фибриллы, уложенные в структуры более высокого порядка. Эукариоты имеют рибосомы 80S, митохондрии или хлоропласты, не содержат пептидогликана, в большинстве случаев являются аэробами.

Подвижность прокариот и эукариот обеспечивается жгутиками, которые различаются по химической структуре. Жгутики у прокариот

построены из белка флагеллина и не содержат систем микротрубочек. Жгутики у простейших эукариот состоят из белка тубулина и представляют собой систему микротрубочек, расположенных по типу 9+2 и связанных с базальным телом.

1.2. Единство и эволюция бактериального мира

Все существующие на Земле биологические виды, составляющие ее биосферу, относятся к одному из известных трех доменов: бактерии, археи и эукариоты. Первые две формы жизни представляют собой доядерные или прокариотические микроорганизмы, а домен эукариот объединяет в себя все ядерные организмы от микроскопических грибов и протистов до млекопитающих. В течение долгого времени археи считались частью царства бактерий и назывались архебактерии, хотя было известно о их значительных отличиях от остальных бактерий, называемых в то время эубактериями. С развитием филогенетики было установлено, что по многим характеристикам археи более близки эукариотам, что привело к ревизии привычной системы деления живых организмов на доядерные и ядерные формы.

Современная трехдоменная система деления была предложена в 1977 г. Карлом Везе (*Carl Woese*) (1928–2012), американским микробиологом, работавшим в Иллинойском университете, на основе изучения последовательности нуклеотидов рибосомальной РНК (так называемой 16S рРНК). Благодаря новой системе деления живых организмов появилась возможность классификации их на шесть царств, что исключило противопоставление прокариот и эукариот (рис. 1.1).

Все три домена живых организмов объединены общностью происхождения от единого последнего универсального общего предка (LUCA – англ. *last universal common ancestor*) – гипотетического протоорганизма, давшего генетическое начало и являющегося ближайшим общим предком всех ныне обитающих на Земле живых организмов от микроскопических бактерий до высших животных, включая человека.

LUCA существовал на Земле около 3,8 млрд лет назад и представлял собой прото клетку с характеристиками, базовыми для всех современных организмов: присутствие рибосом, биосинтез белка, наличие механизмов репликации и репарации ДНК. LUCA представлял собой строго анаэробный, хемолитоавтотрофный, термофильный микроор-

ганизм с неоформленной внешней мембраной. Этот протоорганизм не обладал способностью к синтезу аминокислот, полностью извлекал их из внешней среды, являясь таким образом «полуживым», глубоко зависел от абиотических процессов, протекавших снаружи. LUCA не являлся первым и единственным организмом в биосфере, однако именно он стал общим предком всех существующих теперь на Земле живых существ.

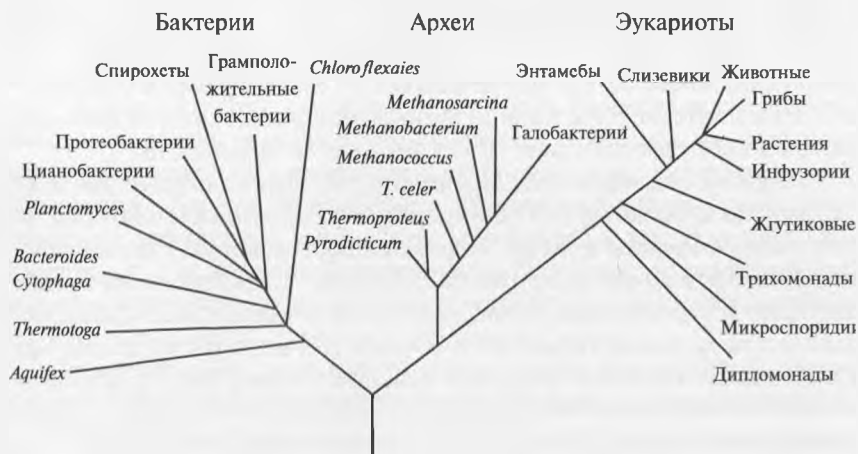


Рис. 1.1. Филогенетическое древо всех существующих в биосфере организмов (нижняя часть древа определяет эволюционное положение последнего универсального предка)

Дальнейшая эволюция привела к оформлению клеточной мембраны, а затем одна эволюционная ветвь – к появлению однослойной (монодермной) клеточной стенки для обеспечения постоянства внутренней среды организма и обеспечения устойчивости от внешних воздействий. Этот микроорганизм дал эволюционное начало современным бактериям, к которым наиболее близки современные грамположительные бактерии.

Первые формы бактерий, существовавшие в биосфере, характеризовались низким содержанием гуанин-цитозиновых пар в структуре ДНК (значительно меньше 50 %), а также облигатной анаэробностью, так как ранняя атмосфера на Земле не содержала свободного кислорода и его высокая окисляющая активность была токсичной для первых микроорганизмов. Наиболее ранним эволюционным ответвлением являются предки современных бацилл и клостридий, последние из ко-

торых до сих пор сохранили непереносимость молекулярного кислорода и обитают в анаэробных экологических нишах.

В последующем в ходе эволюции обозначилась эволюционная ветвь микроорганизмов с более высокой биохимической активностью и тенденцией увеличения доли гуанин-цитозиновых пар в структуре ДНК, что положило начало возникновению современных актинобактерий – самому разнообразному типу бактерий. Появление актинобактерий в биосфере предопределило появление в бактериальном мире антибиотиков, ставших мощным эволюционным фактором эволюции микроорганизмов. До сих пор подавляющее число применяемых антибиотиков синтезируется именно актинобактериями, а род *Streptomyces* является продуцентом около 70 % известных антибиотиков.

Получив эволюционное преимущество перед остальными бактериями, актинобактерии стали господствующим типом бактерий на том этапе эволюции и до сих пор сохраняют высокую степень убиквитарности (распространенности) в природе. Следствием адаптации бактерий к токсическому действию антибиотиков стало снижение количества пептидогликана в клеточной стенке, а также появление в ней дополнительной оболочки (внешней мембраны) с одновременным увеличением периплазматического пространства. Археи, укрываясь от токсического действия антибиотиков, стали уходить на периферию биосферы, до сих пор предпочитая обитать в экстремальных условиях, неприемлемых для других бактерий: с высокими показателями осмотичности, температуры и других физико-химических характеристик.

Такой ход эволюции предопределил появление в природе дидермных бактерий, давших начало современным грамотрицательным микроорганизмам. Первой обособившейся ветвью на том этапе эволюции стали предки современного типа бактерий *Deinococcus-Thermus*. Современные дейнококки, хоть и окрашиваются грамположительно, номинально филогенетически стоят ближе к грамотрицательным бактериям, имея клеточную стенку дидермного типа.

Следующий этап эволюции бактерий был ознаменован появлением фотосинтеза – процесса преобразования энергии света в энергию химических связей органических веществ на свету при участии фотосинтетических пигментов. Такими пигментосодержащими бактериями стали зеленые несерные бактерии и цианобактерии, последние из которых осуществляли особый кислородный фотосинтез, т. е. приводящий к выделению во внешнюю среду молекулярного кисло-

рода. Эти фотосинтезирующие кислород-продуцирующие бактерии и изначально существовали локально в виде так называемых бактериальных матов, формируя локальные карманы с высоким содержанием кислорода. Будучи сильно токсическим веществом для первых форм жизни, кислород стал причиной вытеснения анаэробных бактерий из бактериальных матов, однако предопределил появление в биосфере аэробного гликолиза, энергетически более выгодного по сравнению с анаэробным. В течение очень длительного времени весь выделяемый в процессе фотосинтеза кислород уходил на выведение из воды железа с образованием магнетита, т. е. оксида железа, до сих пор сохранившегося на Земле в форме ископаемого минерала. После того как поверхностные породы и газы атмосферы оказались окисленными, кислород начал накапливаться в атмосфере в свободном виде, что приводило к образованию богатой им атмосферы. Это явление ознаменовало «кислородную катастрофу» в биосфере, приведшую к кислородному перевороту, т. е. к переходу большей части биосферы на аэробный тип дыхания и оттеснению анаэробных микроорганизмов в ограниченные экологические ниши (глубокие слои почвы и воды).

Цианобактерии дали начало современным хлоропластам, ранее представлявших собой свободноживущие бактерии и затем перешедшие к симбиотическому взаимоотношению с эукариотическими клетками. Результатом такого симбиогенеза стало появление фотосинтезирующих пластид у эукариот — предшественников современных растительных клеток. Давность этого события оценивают в 1–1,5 млрд лет. Одновременно с ним происходило появление отдельной эволюционной ветви, положившей начало современным хламидиям. По этой причине хламидии сохранили значительную генетическую связь с современным растительным миром.

Одновременно с этими событиями отдельные аэробные бактерии, способные утилизировать кислород, перешли к симбиотическим отношениям с ядерными клетками, став их органеллой — современной митохондрией. До сих пор хлоропласты и митохондрии сохранили многие черты не только бактериальных клеток, но и автономности (способность к делению, наличие части генов), хотя и не являются самостоятельными организмами, так как в ходе симбиогенеза передали значительную часть своих генов в ядро. Другие бактерии, имевшие родство с предшественниками современных митохондрий, полностью утратили автономность и перешли к внутриклеточному паразитическому существованию. Современные внутриклеточные паразиты — риккетсии — имеют филоге-

нетическое родство с митохондриями и, вероятно, эволюционно с ними связаны.

На одном из поздних этапов эволюции бактериального мира появились современные протеобактерии, из которых гамма-протеобактерии являются самым многочисленным классом из всех протеобактерий. Гамма-протеобактерии включают в себя наибольшее число известных паразитических, патогенных микроорганизмов, эволюционировавших после появления в биосфере животных, растений и грибов.

Общая эволюционная линия бактерий показана на рис. 1.2. Все современные бактерии берут начало от общего предка, существовавшего около 3,8 млрд лет назад. Приблизительно этой величиной датируется возраст наиболее древних микропалеонтологических останков, которые были найдены в Исуанском зеленокаменном поясе на западе Гренландии.

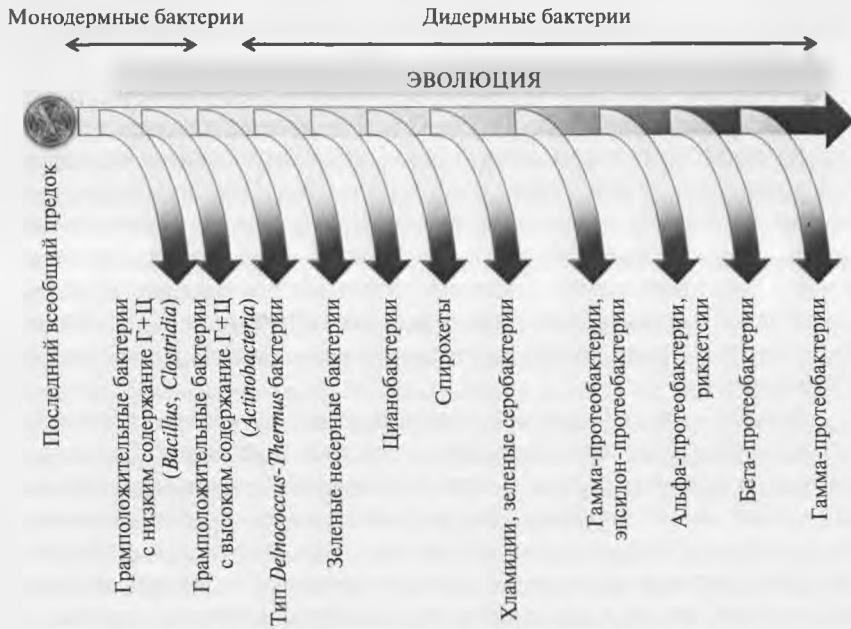


Рис. 1.2. Общая схема эволюции бактериального мира по результатам филогенетического анализа микроорганизмов

1.3. Систематика микроорганизмов и основные таксономические категории

Несмотря на большое многообразие, обитающие на нашей планете существа имеют филогенетическое родство. Чем теснее родственная связь, тем большим числом общих признаков они обладают. Группированием живых организмов по наибольшему общему сходству занимается специальная отрасль биологической науки – систематика (от гр. *systematicus* – упорядоченный, относящийся к системе), или таксономия (от гр. *taxis* – расположение по порядку, закон). Термины «систематика» и «таксономия» в литературе часто употребляется как синонимы, однако систематика является более широким понятием, чем таксономия.

Систематика (таксономия) в микробиологии – наука, занимающаяся вопросами классификации, номенклатуры и идентификации микроорганизмов.

Задачей классификации является объединение микроорганизмов с общими свойствами в определенные группы (таксоны).

Номенклатура – это свод правил присвоения названий таксонам (группам) и список этих названий.

Идентификация – отнесение микроорганизмов к определенному таксону (виду) на основании таких конкретных признаков, свойств, как:

морфологические – форма, величина, взаимное расположение, наличие спор, капсул, жгутиков;

физиологические – особенности питания, дыхания, роста в определенных условиях культивирования;

тинкториальные – способность окрашиваться различными красителями при сложных методах окрашивания. Одним из наиболее важных признаков является отношение к окраске по Граму, которое зависит от структуры и химического строения клеточной стенки. По этому признаку все бактерии делятся на грамположительные и грамотрицательные;

культуральные – особенности роста бактерий на жидких, полужидких и плотных питательных средах;

биохимические – совокупность сахаролитических, протеолитических, редуцирующих и гемолитических свойств;

токсигенные – способность образовывать экзо- и эндотоксины;

патогенные – способность вызывать болезнь;

чувствительность к специфическим бактериофагам;
антигенные, генетические и другие свойства.

Систематика микроорганизмов использует два подхода к классификации: *филогенетический*, в котором принадлежность организма к тому или иному таксону определяют исходя из его генетического родства (эволюционных отношений), и *фенотипический*, основанный на сходстве этого организма и известного таксона. Филогенетическая классификация — естественная, фенотипическая — искусственная. Естественная классификация пока неосуществима. Современные системы классификации микроорганизмов по существу являются искусственными. Для классификации используют комплекс фенотипических (морфологические, культуральные, физиологические и другие свойства) и генотипических (физико-химические свойства ДНК) признаков.

В классификации для группирования родственных организмов используют следующие таксономические категории: империя, надцарство, домен (*domain*), или царство (*regnum*), отдел (*divisio*), тип (*phylum*), класс (*class*), порядок (*order*), семейство (*family*), род (*genus*), вид (*species*).

Основной номенклатурной единицей является вид. Под *видом* подразумевается группа микроорганизмов, сходных по морфологическим и физиологическим признакам, имеющих единое происхождение и генотип и обладающих способностью вызывать в естественных условиях обитания специфические процессы. В *рода* объединяют близкие по большинству общих признаков виды. В *семейства* и более высокие таксоны микробов группируют по такому же принципу, при этом имеются большие условности. Чтобы облегчить общение микробиологов, всем микробам присваивают научные названия в соответствии с Международным кодексом номенклатуры бактерий. Для этого пользуются универсальным латинским языком и алфавитом. Названия родов и более высоких таксонов унитарны, т. е. состоят из одного слова, преимущественно существительного в единственном (родов) или множественном (семейств) числе. В последнем случае название имеет окончание *-aceae*. Для обозначения вида микроорганизма применяют биномиальную номенклатуру, предложенную еще К. Линнеем. В соответствии с этой номенклатурой название микроорганизма состоит из двух слов. Первое означает его родовую принадлежность и пишется с прописной буквы. Название рода обычно является производным от слов, характеризующих морфологичес-

кий признак микроба (например, стрептококки – кокки, располагающиеся цепочкой, от гр. *streptos* – цепь), или от фамилии ученого, впервые выявившего его (*Pasteurella* – Пастер, *Salmonella* – Сальмон, *Brucella* – Брюс и т. д.). Второе слово пишется со строчной буквы и вместе с родовым обозначением составляет видовое название микроорганизма. В основе его употребления лежит какое-либо отличительное биологическое свойство микроба (например, выделение желтого пигмента у золотистого стафилококка – *Staphylococcus aureus*) или признак вызываемого им заболевания (*Shigella dysenteriae* – возбудитель дизентерии), фамилия первооткрывателя (*Clostridium chauvoei* – французский бактериолог А. Шаво, *Clostridium novyi* – американский бактериолог Ф. Нови) и др. Второе слово бинарного названия вида, взятое отдельно, не имеет статуса в номенклатуре и не может быть использовано для научного обозначения микроорганизма.

Виды могут подразделяться на подвиды. Это культуры, у которых обнаруживают отклонение от типичных видовых свойств. Название подвидов – тринерные, так как состоят из трех слов: названия вида из двух слов и третье слово обозначает подвид. При этом предпочтительнее перед подвидовым названием указывать ранг словом *subsp.* (*subspecies* – подвид). Например, *Campylobacter fetus subs. fetus*, *Campylobacter fetus subs. venerealis*.

Существуют также и инфраподвидовые подразделения, которые основаны на отличии особей по каким-либо наследуемым признакам: антигенным – серовар, биохимическим – биовар, отношением к фагам – фаговар, патогенностью – патовар и др.

В микробиологии пользуются терминами «штамм» и «клон». *Штамм* – культура одного и того же вида, выделенная из разных объектов и отличающаяся незначительными изменениями свойств (например, чувствительностью к антибиотикам, ферментацией углеводов и др.). Под термином *культура* понимают микроорганизмы, выращенные на плотной или жидкой питательной среде в условиях лаборатории. Культуру микроорганизмов, полученную из особей одного вида, называют *чистой культурой*. *Смешанной культурой* называют смесь неоднородных микроорганизмов, выделенных из исследуемого материала (молока, почвы, воды и др.). *Клон* – это культура, полученная из одной клетки.

Комплекс микроскопических, микробиологических и серологических исследований, направленных на определение вида микро-



Дэвид Берджи

ба, лежит *идентификация микроорганизмов*. Большую роль в бактериологической систематике сыграл ученый-биолог Д. Берджи (1860–1937). Идентификацию микроорганизмов проводят по специальным определителям. Известны такие определители, как «Определитель бактерий и актиномицетов» Н. А. Красильникова (1949), «Определитель микробов» Р. А. Циона (1948) и др. Международно признанным определителем является «Справочник по бактериологической систематике» Д. Х. Берджи (далее – Справочник Берджи).

1.4. Современная классификация бактерий по Берджи

«Справочник по бактериологической систематике» во всем мире признан основным источником по систематике бактерий, включает в себя все имеющиеся классификационные признаки бактерий. Он является логическим продолжением издаваемого ранее «Справочника Берджи по определительной бактериологии», хотя последний также имеет хождение в кругах микробиологов.

Справочник неоднократно дополнялся, благодаря новым методам и способам исследования изменялась классификация многих таксонов не только по фенотипам, но и по генетическим признакам. Современный Справочник Берджи состоит из нескольких томов:

том 1 (2001) – «Археобактерии, ветвящиеся и фототрофные бактерии»;

том 2 (2005) – «Протеобактерии», состоящий из трех книг «Общее представление»; «Гамма-протеобактерии»; «Другие классы протеобактерий»;

том 3 (2009) – «Отдел *Firmicutes*»;

том 4 (2010) – «Отделы *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* и *Planctomycetes*»;

том 5 (состоит из двух частей) (2012) – «*The Actinobacteria*».

Справочник Берджи по бактериологической систематике бактерии относят к надцарству – доядерные – *Procaryota*, в котором различают два домена (царства): *Bacteria* (зубактерии) и *Archaea* (архебактерии). Домены (*domain*) включают типы (*phylum*), классы (*class*), порядки (*order*), семейства (*family*), роды (*genus*), виды (*species*).

В домен *Bacteria* входят 24 типа. В нем можно выделить следующие бактерии:

- с тонкой клеточной стенкой, грамотрицательные;
- с толстой клеточной стенкой, грамположительные;
- без клеточной стенки (класс *Mollicutes* – микоплазмы).

Архебактерии не содержат пептидогликан в клеточной стенке, имеют особые рибосомы и рибосомальные РНК (рРНК). Термин «архебактерии» появился в 1977 г. Это одна из древних форм жизни, о чем свидетельствует приставка *архе-*. Среди них нет возбудителей инфекционных болезней.

Большинство грамотрицательных бактерий объединены в тип *Proteobacteria*. Они появились от общего фотосинтезирующего предка. Протеобактерии – наиболее многочисленная группа бактерий – 1534 видов или примерно треть от всех известных видов бактерий. Группа была выделена на основании анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК, названа в честь древнегреческого бога Протея, умевшего менять форму по собственному желанию (в названии протеобактерий отражено большое разнообразие биохимических, физиологических и морфологических свойств, присущих этой группе). Протео-бактерии делятся на пять секций (называемых также классами), обозначенных буквами латинского алфавита: α -, β -, γ -, δ - и ϵ -протеобактерии.

Протеобактерии является весьма неоднородной группой. В нее включены симбионты эукариот и большое количество патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, фото- и хемотрофные виды бактерий, как автотрофы, так и гетеротрофы. Основным компонентом внешней мембраны протеобактерий является липополисахарид. Группа включает облигатно и факультативно аэробные и анаэробные бактерии. Кроме того, различны типы движения, в группу входят бактерии, имеющие жгутики, неподвижные бактерии и бактерии, имеющие так называемый скользящий тип движения.

Морфологически группа также неоднородна: сюда входят и палочковидные бактерии, и кокки, и спиралевидные бактерии.

Грамположительные бактерии, согласно изученным последовательностям рибосомной РНК, являются отдельной филогенетической

группой с двумя большими подотделами – с высоким и низким соотношением G + C (генетическое сходство). Как и протеобактерии, эта группа метаболически разнообразна.

Эукариоты по новой системе классификации относят к домену *Eucarya* (эукариоты).

Глава 2 **МОРФОЛОГИЯ И СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ**



2.1. Общее представление о морфологии и строении бактериальной клетки

Основная масса бактерий – одноклеточные организмы. Однако нередко клетки после деления не расходятся и образуют сочетания различной формы, которая определяется расположением делящей перегородки. Эти сочетания не равноценны многоклеточным организмам, поскольку каждая клетка в них автономна и может существовать самостоятельно после отделения от остальных клеток.

Бактерии, за исключением микоплазм, имеют определенную форму клетки. У большинства бактерий она поддерживается благодаря твердой (ригидной) клеточной стенке. Клеточная стенка, например спирохет, эластична, и их извитая форма поддерживается с помощью аксиальных фибрилл. Форма клетки многих бактерий отличается постоянством и сохраняется в течение всей жизни. Вместе с тем есть бактерии, у которых наблюдается более или менее выраженный плеоморфизм. Нередко он отражает стадии развития микроорганизмов. В этом случае обнаруживается упорядоченное, регулярное чередование определенных форм. Изменение морфологии может происходить и под влиянием условий культивирования. Полиморфность (разнообразие форм) микоплазм связана с отсутствием у них клеточной стенки. Из всех форм

наибольшей стабильностью характеризуются кокки, наибольшей вариабельностью — палочковидные клетки.

Морфологические типы бактерий по сравнению с высшими организмами немногочисленны. Клетки значительной части бактерий имеют сферическую, цилиндрическую или спиралевидную форму. Существует обширная группа ветвящихся бактерий (например, микобактерии, актиномицеты, нокардии), сравнительно небольшое количество нитчатых форм (например, цианобактерии) и бактерий, образующих выросты (простеки — выпячивание клеточного содержимого, окруженного клеточной стенкой и ЦПМ и не отделенного от клетки перегородкой, например *Caulobacter* и др.).

Бактерии не видимы невооруженным глазом и относительно просто устроены. Клетки бактерий измеряют в микрометрах ($1 \text{ мкм} = 10^{-3} \text{ мм}$), а структурные компоненты — в нанометрах ($1 \text{ нм} = 10^{-3} \text{ мкм}$). Разрешающая способность светового микроскопа составляет $0,2 \text{ мкм}$, электронного — $0,15\text{--}0,3 \text{ нм}$. Размер бактерий в среднем составляет $0,5\text{--}1,0 \times 2\text{--}10 \text{ мкм}$, их объем — 1 мкм^3 , а масса — $4 \cdot 10^{-3} \text{ г}$.

Бактериальная клетка имеет сложное, строго упорядоченное (структурированное) строение. Процессы ассимиляции (анаболизм) и диссимиляции (катаболизм) упорядочены во времени и пространстве благодаря структурированности объема клетки. Например, микоплазма превосходит в размере атом водорода в 1000 раз. Однако благодаря структурированности клетки микроорганизма в ней осуществляется не менее 100 биохимических реакций. Жизнедеятельность любой клетки человека и животных поддерживается в результате последовательного согласованного протекания более 10 000 реакций.

С анатомической точки зрения бактерия морфологически дифференцирована. В ней различают (рис. 2.1) основные (обязательные) и необязательные и временные структуры.

К *основным структурам (компонентам) клетки* относят:

клеточную стенку (кроме микоплазм);
цитоплазматическую мембрану с ее производными;
цитоплазму с рибосомами и различными включениями;
нуклеоид.

Необязательными и временными структурами бактерий являются:

слизистый слой или чехол;
капсула;
жгутики;
фимбрии (ворсинки, пили);
эндоспоры.

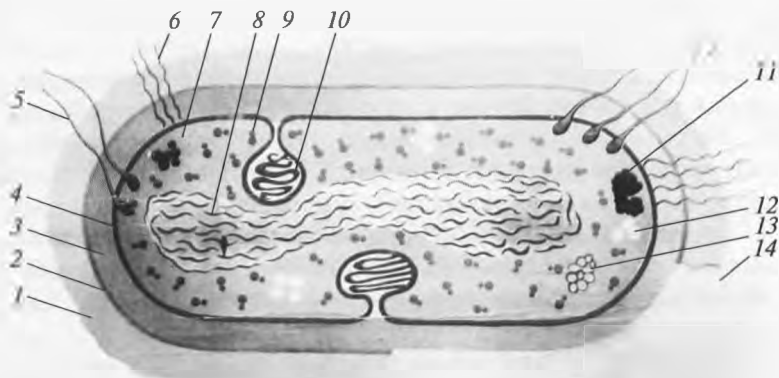


Рис. 2.1. Схема строения бактериальной клетки:

- 1 – макрокапсула; 2 – микрокапсула; 3 – клеточная стенка; 4 – цитоплазматическая мембрана; 5 – жгутики; 6 – ворсинки; 7 – цитоплазма; 8 – нуклеоид; 9 – рибосомы; 10 – мезосома; 11 – зерна волютина; 12 – гликоген; 13 – капли жира; 14 – слизистый слой

2.2. Основные структурные компоненты бактериальной клетки, их характеристика и биологическая роль

Клеточная стенка – прочная, упругая структура, внешняя оболочка клетки у бескапсульных бактерий. У капсульных она расположена между капсулой и цитоплазматической мембраной. Толщина клеточной стенки 10–100 нм, она содержит в среднем 20 % сухого вещества бактерий. Клеточная стенка обладает ригидностью (упругостью, жесткостью), она представляет собой скелет клетки. Ее можно рассмотреть только у крупных бактерий, например у серобактерии. Стенку можно увидеть в световой микроскоп при плазмоллизе в затемненном поле зрения. Стенка имеется у всех прокариот, за исключением микоплазм, протопластов, L-форм бактерий.

Основным компонентом клеточной стенки бактерий является пептидогликан, или муреин (от лат. *murus* – стенка), – опорный полимер, имеющий сетчатую структуру и образующий жесткий наружный каркас бактериальной клетки. Само название говорит о двойственной химической природе соединения. Гликаны представлены чередующимися остатками двух аминсахаридов – N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, а пептиды – цепью четырех лево- и

правовращающихся аминокислот. Благодаря гликозидным связям, гликаны собираются в полимер, а при помощи полипептидных связей они образуют между собой своеобразный молекулярный каркас. Как собран этот каркас, такую форму и имеет бактериальная клетка. Если каркасный слой будет иметь форму вытянутого мешка, бактерия приобретет палочковидную форму, если каркас сферический, – шарообразную форму.

Разный химический состав и строение стенок бактериальных клеток лежит в основе деления микробов на грамположительные и грамотрицательные организмы. В 1884 г. Х. Грам предложил метод окраски, который используется до сих пор для дифференцировки бактерий. При окрашивании по Граму основной краситель генциановый (фиолетовый) в присутствии иода (раствор Люголя) с компонентами клетки (Mg соли РНК) образует комплекс, который при действии на него этиловым спиртом удерживает краситель у грамположительных и обесцвечивается у грамотрицательных микробов. В результате грамположительные микробы окрашиваются в цвет основного красителя (фиолетовый), а грамотрицательные – в красный (цвет дополнительного красителя – фуксина).

Клеточная стенка грамположительных бактерий плотно прилегает к цитоплазматической мембране, массивна, ее толщина – 20–100 нм, при этом на долю пептидогликана приходится 30–70 % сухой массы клеточной стенки (толщина – 40 слоев). В составе клеточной стенки в небольших количествах обнаруживаются полисахариды, белки и липиды. Характерная особенность – наличие тейхоевых кислот, которые взаимодействуют с пептидогликаном и участвуют в связывании ионов магния и их транспорте в клетку.

Тейхоевые кислоты (от гр. *teichos* – стенка) – линейные углеводные фосфатсодержащие гетерополимеры, состоящие из повторяющихся остатков полиолов либо гликозилполиолов, имеющих фосфоэфирные связи. В зависимости от полиолов, образующих основную цепь, выделяют глицерин-, рибит- и манниттейхоевые кислоты. Они являются компонентами клеточной стенки многих грамположительных бактерий. Могут быть ковалентно связаны с мембранными липидами и тогда называются липотейхосвыми кислотами. Клеточная стенка каждого вида содержит только один тип тейхоевых кислот (за исключением вида *Streptomyces*). Тейхоевые кислоты выделяют из клеточной стенки, где их содержание составляет 20–50 %, путем экстракции 5%-й водной трихлоруксусной кислотой.

Грамотрицательные бактерии имеют сравнительно тонкую клеточную стенку. В ней выделяют два слоя — пластичный и ригидный. Последний образован одним, редко двумя слоями пептидогликана, содержание которого составляет не более 20 % сухой массы клеточной стенки. Структурные микрофибриллы у грамотрицательных бактерий сшиты менее компактно, поры в их пептидогликановом слое значительно шире, чем в молекулярном каркасе грамположительных бактерий, что способствует быстрейшему вымыванию фиолетового комплекса генцианвиолета и иода. Тейхоевые кислоты у грамотрицательных бактерий не обнаружены. На пептидогликановом каркасе расположены фосфолипиды, липополисахариды (ЛПС) и белки, образующие пластичный слой. Толщина пластичного слоя значительно превышает размеры монослоя пептидогликана. Его компоненты расположены мозаично и могут образовывать дополнительную внешнюю мембрану либо переходить в капсулу.

Фосфолипиды пластичного слоя прикреплены к пептидогликану липопротеидами, пересекающими периплазматическое пространство. Обработка детергентами (например, додецилсульфатом натрия) приводит к нарушению этих связей. Основное отличие внешнего фосфолипидного слоя от внутреннего ригидного — высокое содержание ЛПС.

ЛПС состоит из липидной части (липид А), базисной части молекулы полисахарида (сердцевина) и боковых полисахаридных цепей. Иммуногенные свойства проявляют боковые полисахаридные цепи и сердцевина. Боковые полисахаридные цепи отвечают за антигенную специфичность молекулы ЛПС и называются О-А₁. Липидная часть термоустойчива и отвечает за биологические эффекты ЛПС. Структура ЛПС имеет большое диагностическое значение, поскольку разные виды или серовары патогенных грамотрицательных бактерий отличаются друг от друга составом боковых цепей ЛПС внешней мембраны. Липополисахарид у патогенных грамотрицательных бактерий выполняет функцию эндотоксина, так как он связывает рецепторный комплекс CD14/TLR4/MD2 во многих типах клеток, но особенно в моноцитах, дендритных клетках, макрофагах и В-лимфоцитах, что способствует секреции провоспалительных цитокинов, оксида азота и эйкозаноидов.

Белки, входящие в состав пластичного слоя, подразделяются (в зависимости от выполняемых функций) на основные (мажорные) и второстепенные (минорные). К основным белкам относят порины,

образующие трансмембранные каналы, вовлеченные в транспорт ионов и гидрофильных соединений из внешней среды в периплазму. Второстепенные белки также могут участвовать в транспорте веществ через пластинчатый слой (путем облегченной диффузии или активного транспорта молекул). Некоторые белки играют роль рецепторов для вирусов бактерий и бактериоцинов, а также для донорских пилей при конъюгации.

Внешняя мембрана не пропускает молекулы с большой молекулярной массой, что можно рассматривать как фактор неспецифической устойчивости бактерий к некоторым антимикробным препаратам.

Под влиянием различных физических (ультразвук, ультрафиолетовые лучи) и химических (пенициллин, лизоцим и др.) факторов, а иногда спонтанно синтез клеточной стенки нарушается и образуются клетки с измененной формой:

протопласты – бактерии, полностью лишенные клеточной стенки;

сферопласты – бактерии с частично разрушенной клеточной стенкой.

Сферопласты и протопласты в 3–10 раз крупнее исходных клеток. В условиях гипертонической среды они могут расти и даже размножаться, в обычных условиях – гибнут. При снятии ингибирующего фактора могут ревертировать в L-формы бактерий, выделенных в 1935 г. в Институте Листера, поэтому так и названы. Они более устойчивы, чем протопласты и сферопласты, обладают способностью к реверсии и являются возбудителями многих инфекционных болезней.

Функции клеточной стенки:

определяет и сохраняет постоянную форму клетки;

защищает клетку от осмотического шока и повреждающих факторов внешней среды;

обеспечивает связь с внешней средой через каналы и поры;

участвует в метаболизме клетки;

участвует в регуляции роста и размножения;

имеет на поверхности специфические рецепторы для взаимодействия с фагами и антителами;

содержит гидролитические ферменты, обеспечивающие рост клеточной стенки, а при гибели клетки – ее аутолиз;

является носителем пато-, анти-, токси- и иммуногенных свойств.

Цитоплазматическая мембрана (ЦМ), или плазмолемма, — полупроницаемая липопротеидная структура, отделяющая цитоплазму от стенки. На долю ЦМ приходится около 10 % сухой массы бактерий, 25–40 % фосфолипидов, 20–75 % белков, 6 % углеводов.

Плазмолемма образует инвагинаты (впячивания), т. е. цитоплазматические структуры, получившие название мезосом. *Мезосомы* — это мембранные системы, состоящие из трубочек, пузырьков и пластинок. Мезосомы, связанные с нуклеоидом бактерии, называются нуклеоидосомами. Считают, что эти образования участвуют в энергетическом обмене, дыхании клеток, делении бактерий, спорообразовании. Мезосомы хорошо выражены у грамположительных бактерий, хуже у грамотрицательных и совсем плохо — у риккетсий и микоплазм. Полностью значение мезосом не выяснено.

Цитоплазматическая мембрана — исключительно полифункциональная структура.

Функции ЦМ:

воспринимает всю информацию, поступающую в клетку из внешней среды;

является осмотическим барьером клетки;

принимает участие в процессах метаболизма;

содержит значительное количество ферментов;

с ЦМ связаны жгутики и аппарат их движения;

участвует в процессах роста и размножения клетки, ее энергетическом обмене;

участвует в репликации ДНК, синтезе клеточной стенки;

играет важную роль в стабилизации рибосом.

Цитоплазма — сложная коллоидная полужидкая система, содержащая до 90 % воды. Гомогенная фракция цитоплазмы называется *цитозолем*. Химический состав цитоплазмы очень сложный. Она содержит белки, полисахариды, липиды, минеральные вещества, микроэлементы. В ней находятся рибосомы и различные включения, которые могут быть жидкими, твердыми, газообразными. Цитоплазма образует внутреннюю среду клетки, она объединяет клеточные структуры и обеспечивает их взаимодействие. В цитоплазме находится нуклеоид.

Рибосомы — структуры, в которых идет синтез белка, это фабрики белка. Состоят они из белка и РНК. Их диаметр — 15–20 нм. В клетке их может быть от 5 до 10 000. В свободном состоянии они

могут быть в виде двух субъединиц с константой седиментации 30S и 50S. Перед синтезом белка они объединяются в одну рибосому с константой седиментации 70S (константы седиментации характеризуют скорость, с которой эти частицы осаждаются в центрифуге при определенных стандартных условиях). Рибосомы совместно с молекулами РНК и ДНК участвуют в синтезе белка не как изолированные частицы, а в виде агрегатов, называемых полирибосомами или полисомами.

В клетках цианобактерий присутствуют тилакоиды — фотосинтезирующие структуры, содержащие хлорофилл и каротиноиды. Светособирающие пигменты — фикобилины, находятся в специальных структурах, фикобилисомах, расположенных на поверхности тилакоидов. У зеленых бактерий светособирающие пигменты, участвующие в фотосинтезе, содержатся в особых структурах, называемых хлоросомами.

Разнообразные включения не являются структурами, абсолютно необходимыми для жизнедеятельности бактерий, и могут присутствовать в клетках или отсутствовать. Некоторые из включений окружены белковой мембраной. Например, газовые вакуоли — аэросомы, заполненные скоплением газовых пузырьков. Они встречаются в основном у водных видов бактерий и обеспечивают их плавучесть и глубину погружения в водной среде. Значительная часть включений представляет собой питательные вещества и продукты клеточного метаболизма. К ним относят полисахариды (гликоген, гранулеза), полифосфаты (гранулы волютина), отложения серы и др.

В цитоплазме протекает обмен веществ в клетке (метаболизм), т.е. ферментативные процессы, обеспечивающие ее питание, дыхание, синтез белков, углеводов, липидов, кислот, а также токсинов и ферментов, обуславливающих патогенность болезнетворных бактерий.

Нуклеоид, или *генофор*, — аналог ядра эукариот. Он располагается в центре клетки, представляет собой двойную нить ДНК, плотно уложенную наподобие клубка, замкнутую в кольцо. Длина нуклеоида — 1,1–1,6 мкм. Он не имеет ядерной оболочки, ядрышек, белков гистонов, его называют бактериальной хромосомой. В зависимости от стадии развития клетки нуклеоид может быть дискретным (прерывистым) и состоять из отдельных фрагментов. Это связано с тем, что деление бактериальной клетки происходит после завершения цикла репликации молекулы ДНК и формирования дочерних клеток. Кро-

ме нуклеоида в клетках многих видов прокариот обнаружены плазмиды. Они представляют собой небольшие кольцевые молекулы ДНК, способные к автономной репликации. Их присутствие детерминирует свойства микробов, связанные с размножением, устойчивостью к лекарственным веществам, патогенностью бактерий и др. Нуклеоид у бактерий отвечает за наследственность и изменчивость.

2.3. Необязательные и временные структурные компоненты бактериальной клетки, их характеристика и назначение

Некоторые виды бактерий экзополимеры в большом количестве выделяют слизистые, которые образуют рыхлый слизистый чехол. Он не имеет четких границ. Бактериальные экзополисахариды участвуют в адгезии (прилипанию к субстратам), их еще называют гликокаликсом. Слизистый чехол у бактерий является легко удаляемым (например, путем центрифугирования), неорганизованным слоем внеклеточного материала, который окружает бактериальную клетку. В основном этот материал представлен экзополисахаридами, гликопротеинами и гликолипидами. Слизистый чехол предохраняет бактерию от высыхания, так как вещество чехла является гидрофильным, хорошо связывает воду, препятствует действию защитных факторов макроорганизма и бактериофагов. Иногда слизистые образования могут служить источником запасных питательных веществ. С помощью слизи осуществляется связь между соседними клетками в колонии, а также прикрепление клеток к различным поверхностям.

Капсула — слизистая структура, расположенная на поверхности клеточной стенки и тесно связанная с ней. В отличие от слизистого слоя бактериальная капсула представляет собой организованную структуру, которая удаляется не так легко, как слои слизи. Толщина капсулы — более 0,2 мкм. Она четко отграничена от внешней среды. Ее можно выявить при световой микроскопии при окраске специальными методами (Ольга, Михина, Романовского—Гимзы, Ребигера, Бурри-Гинса и др.). Многие бактерии образуют микрокапсулу, выявляемую при электронной микроскопии или же химическими и иммунологическими методами. Капсула состоит из гетерополисахаридов (у эшерихий), из белков (у стрептококков), полипептидов (у возбудителя сибирской язвы).

Скопления бактерий, заключенных в одну капсулу, называются зооглеями (например, у сапрофитной бактерии лейконостока). Одни бактерии имеют капсулу, причем все особи и во всех средах (например, у *Klebsiella pneumoniae*). У других бактерий (пневмококков, возбудителя сибирской язвы, энтерококков, возбудителей энтеротоксемии) капсульное вещество образуется в организме хозяина, а на питательных средах синтез его прекращается.

Функции капсулы:

фактором вирулентности, антигенности, специфичности и иммуногенности, так как в ней локализуются капсульные антигены;

защищает бактериальную клетку от механических повреждений, высыхания, заражения фагами, токсических веществ, фагоцитоза, гуморальных факторов организма хозяина;

у некоторых видов способствует прикреплению клеток к субстрату.

В ветеринарной микробиологии выявление капсулы используют в качестве морфологического признака при исследовании на сибирскую язву, диплококковую септицемию и другие инфекционные болезни, что имеет значение для лабораторной диагностики.

Жгутики являются органоидами движения, представляют собой тонкие полые нити, берущие начало от цитоплазматической мембраны, диаметром 12–30 нм, длиной от 6–9 до 80 мкм и более. Жгутики состоят из белка флагеллина (от лат. *flagellum* – жгутик), который обладает сократительной способностью. Жгутик состоит из трех частей: спиральной нити, крюка и базального тельца. Крюк – изогнутый белковый цилиндр, выполняющий функцию гибкого связывающего звена между базальным тельцем и жесткой нитью жгутика. Базальное тельце – сложная структура, состоящая из центрального стержня (оси) и колец. Количество жгутиков может быть от 1 до 50. Жгутики типичны для палочковидных и извитых форм бактерий и редко встречаются у шаровидных микробов.

По характеру расположения и их количеству (рис. 2.2) бактерии подразделяют на:

монотрих – бактерии с одним полярно расположенным жгутиком,

амфитрих – бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющими по пучку жгутиков на обоих концах;

лофотрих — бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном конце клетки;

перитрих — бактерии со множеством жгутиков по бокам клетки или же по всему ее периметру;

атрихия — бактерия, не имеющая жгутиков.

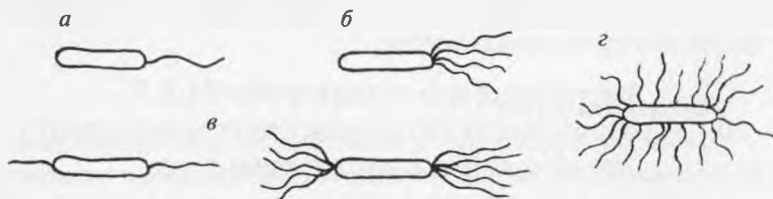


Рис. 2.2. Типы жгутикования у бактерий:
а — монотрих; б — лофотрих; в — амфитрих; г — перитрих

Бактерии движутся беспорядочно, но способны и к направленным движениям — таксисам, т. е. движутся в оптимальную зону обитания. Таксис может быть положительным и отрицательным. Хемотаксис вызывается разницей в концентрации химических веществ, аэротаксис — кислорода, фототаксис — интенсивностью освещения, магнитотаксис определяется способностью микробов ориентироваться в магнитном поле. В клетках этих микробов имеются включения магнетита Fe_3O_4 или грейгита (Fe_3S_4), выполняющие функцию магнитной стрелки компаса. Находящиеся в органеллах, называемых магнетосомами, неорганические кристаллы обеспечивают таким бактериям возможность ориентироваться в трехмерном пространстве, облегчая передвижение в водной среде по вертикали в зону благоприятного обитания. Вискозитаксис — это реакция бактерий на изменение вязкости среды: они способны двигаться в направлении ее увеличения или снижения. Считают, что таксисы можно рассматривать как элементарную форму поведения бактерий.

Скорость движения бактерий в среднем составляет 20–60 мкм в секунду. Определение подвижности микробов имеет значение при идентификации вида и, следовательно, постановке достоверного диагноза. Подвижность бактерий выявляют разными методами («висячая» и «раздавленная» капля, по Шукевичу, посевом в полужидкий агар).

Пили (ворсинки, фимбрии) — нитевидные образования толщиной 3–10 нм, длиной 0,3–10 мкм. Они отходят от поверхности клетки и со-

стоят из белка пилина. У бактерий их может быть от 1–2 до нескольких десятков, сотен и даже тысяч. Пили были обнаружены у подвижных и неподвижных бактерий (рис. 2.3). Известно несколько типов пилей, которые различаются выполняемыми ими функциями. Наиболее изучены пили первого типа или их называют фимбриями общего типа, которые ответственны за питание, водно-солевой обмен, адгезию. Эти пили помогают бактериям прикрепляться к клеткам живых организмов (эритроцитам и другим клеткам растений и грибов). Пили общего типа способствуют образованию пленок на поверхности питательных сред и вызывают агглютинацию эритроцитов. Пили второго типа, так называемые половые фимбриии, или F-пили, имеют внутри канал, через который генетический материал передается от клетки донора к реципиенту при конъюгации бактерий. Через пили в бактерии могут проникать вирусы (фаги).

На поверхности клеток некоторых видов бактерий обнаружены структуры под названием шипы. Это полые цилиндры длиной 1–1,5 мкм и шириной до 65 нм. Шипы состоят из белка спенина. Бактерии с шипами обычно неподвижны. Считают, что образование шипов способствует лучшему выживанию бактерий в естественной среде обитания. У ряда метиловых бактерий выявлены трубчатые выросты, количество которых может достигать 300–350. Диаметр трубочек — около 40 нм, длина — до 0,3 мкм. Значение трубчатых выростов для жизнедеятельности бактерий остается невыясненным.

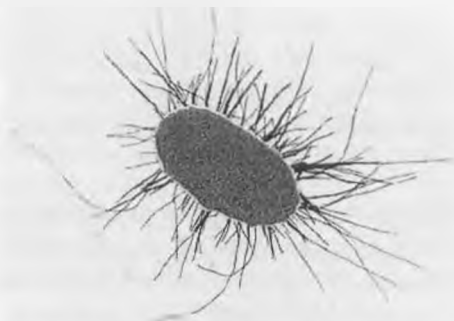


Рис. 2.3. Пили по всей поверхности клетки *Escherichia coli*

Споры — своеобразная форма покоящихся фирмикютных бактерий (рис. 2.4, а, б), т. е. бактерий с грамположительным типом строения клеточной стенки. Споры характеризуются резким снижением обмена

веществ, образуются при неблагоприятных условиях существования бактерий (высушивание, дефицит питательных веществ, изменение рН, повышение содержания кислорода, накопление в среде катионов калия и марганца и т. д.). В спорах отмечается репрессия генома, малое содержание воды, повышенная концентрация кальция, появление дипиколиновой кислоты в виде хелата кальция, который обеспечивает состояние покоя спор и их термоустойчивость. Внутри одной бактерии образуется одна спора. У отдельных видов бактерий обнаружены клетки с двумя и более спорами. Например, выделена бактерия *Anaerobacter polyendosporus*, клетки которой содержат от двух до пяти эндоспор. При формировании спор увеличения количества микробов не происходит, поэтому спорообразование не считают способом размножения бактерий. Образование спор способствует выживанию бактерии в неблагоприятных условиях среды.

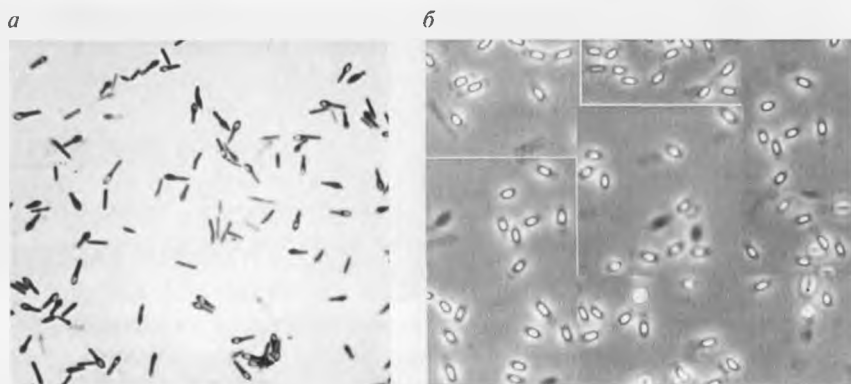


Рис. 2.4. Виды спор:
а — *Clostridium tetani* (терминальное расположение спор);
б — *Bacillus anthracis*

В световом микроскопе споры имеют вид округлых образований, сильно преломляющих свет, размером 0,8–1,5 мкм. Споры находятся в состоянии анабиоза. В патологическом материале споры могут быть как внутри бактериальной клетки, так и вне ее. Внутри клетки они могут располагаться центрально (*B. anthracis*), субтерминально — ближе к концу (*Cl. botulinum*), терминально — на конце палочек (*Cl. tetani*). Строение зрелой споры сложное и однотипное у разных видов бактерий. Центральная часть споры называется спороплазмой. Спороплазму обрамляет мембрана, затем следует зачаточный пептидо-

гликановый слой, затем массивный слой коры или кортекса. Снаружи спора надета многослойной оболочкой, которая обуславливает ее устойчивость. У многих бактерий по окружности наружного слоя спорной оболочки расположен экзоспорум. Бактерии, у которых спора не превышает диаметра клетки, называют бациллами, а у которых превышает — клостридиями.

Споры сохраняют жизнеспособность в условиях, когда вегетативные клетки погибают и кислото-, щелоче- и спиртоустойчивы. Они хорошо переносят высушивание, кипячение в течение нескольких часов, высокое давление, радиацию, действие агрессивных химических факторов, ферментов, антибиотиков. Споры бактерий могут существовать в покоем состоянии длительное время. Например, английский микробиолог П. Снис обнаружил жизнеспособные споры, хранившиеся в комочках почвы в течение 320 лет. В слое осадков на дне озера в штате Миннесота найдены споры, имеющие возраст 7500 лет. Немецкий микробиолог Г. Домбровский обнаружил жизнеспособные споры в образцах соли из месторождений в Германии и Северной Америке, сохранившиеся более 300 млн лет.

Существуют бактерии, у которых образуются другие, относительно устойчивые к неблагоприятным условиям внешней среды покоящиеся клетки. К ним относят цисты, экзоспоры. Цисты характерны для азотобактера, спирохет, миксобактерий, риккетсий, метилотрофных бактерий и бактерий рода *Bdellovibrio*. Зрелые цисты представляют собой округлые светопреломляющие образования. Цитоплазма у них окружена мембраной и двумя оболочками: интиной — толстой внутренней и экзиной — многослойной внешней оболочкой.

Экзоспоры образуются у некоторых почкующихся фотосинтезирующих бактерий и обладают значительно большей устойчивостью, чем вегетативные клетки, к высушиванию, ультрафиолетовому облучению, высокой температуре.

От спор нужно отличать параспоровые тельца, которые имеют размер 120–200 нм и расположены изолированно или на поверхности спор. В клетках *Bacillus thuringiensis* параспоровые тельца формируются в виде крупных белковых кристаллов. Они токсичны и используются для приготовления препарата, применяемого в борьбе с вредными насекомыми.

Спорообразование (споруляция) — сложный биологический процесс образования спор. Этот процесс включает ряд последовательных стадий

Стадии спорообразования

1. *Подготовительная* – характеризуется репликацией ДНК и ее концентрацией. Клетка содержит два или более нуклеоидов, один из которых локализуется в спорогенной зоне, остальные – в цитоплазме спорангия. Одновременно синтезируется дипиколиновая кислота.

2. *Стадия предспоры* – со стороны цитоплазматической мембраны клетки происходит вращение двойной мембраны, отделяющей нуклеоид с участком уплотненной цитоплазмы (спорогенная зона). В результате образуется проспора, окруженная двумя мембранами.

3. *Образование оболочек* – между мембранами проспоры формируется зачаточный пептидогликановый слой, затем над ним – толстый слой кортекса, а вокруг его – споровая оболочка.

4. *Созревание споры* – завершение образования всех структур споры. Она приобретает термоустойчивость, характерную форму и занимает определенное положение в клетке.

Глава 3. МОРФОЛОГИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП БАКТЕРИЙ



3.1. Морфология и структура шаро- и палочковидных и извитых форм микроорганизмов

Вселенная состоит из живой и неживой материи. Планета Земля населена огромным количеством разнообразных живых существ, которые совместно с продуктами своей жизнедеятельности составляют биосферу. Одна третья часть биосферы представлена микроорганизмами. Несмотря на огромное количество микробов, исчисляемое астрономическими цифрами, морфологические типы бактерий немногочисленны.

По форме клеток бактерии (от гр. *bacterion* – палочка), как уже упоминалось, подразделяют на шаро- (кокки) и палочковидные, извитые (рис. 3.1).

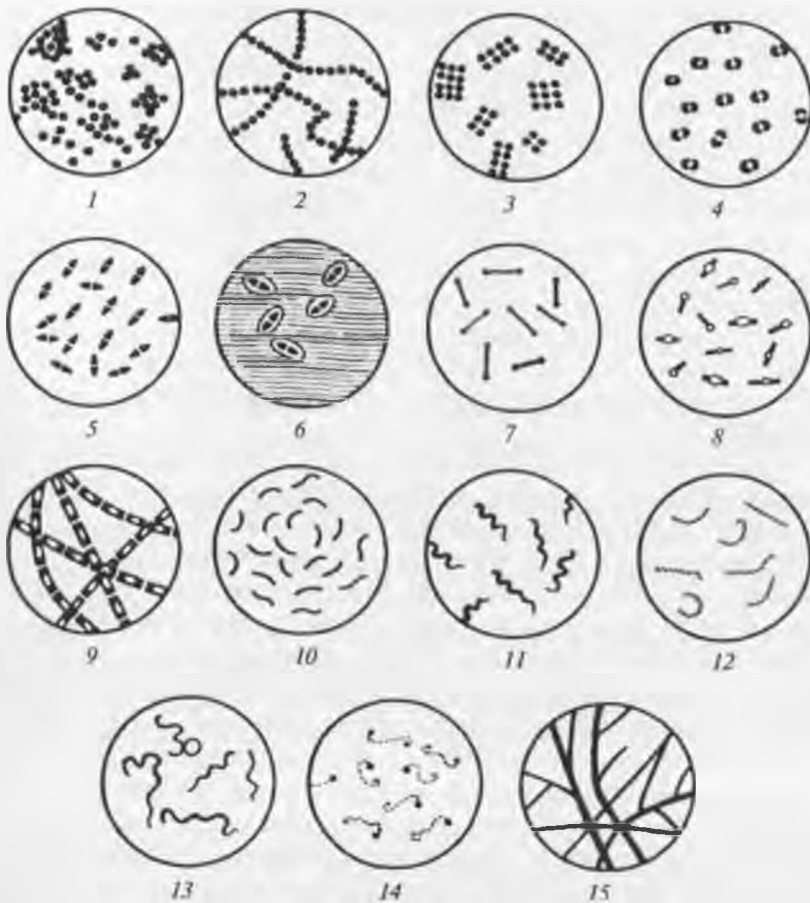


Рис. 3.1. Основные формы бактерий:

1 – стафилококки; 2 – стрептококки; 3 – сарцины; 4 – гонококки; 5 – пневмококки; 6 – капсула пневмококков; 7 – коринебактерии дифтерии; 8 – клостридии; 9 – бациллы; 10 – вибрионы; 11 – спириллы; 12 – трепонемы; 13 – боррелии; 14 – лептоспиры; 15 – актиномицеты

Шаровидные бактерии, или кокки (от гр. *kokkos* – зерно, от лат. *socius* – ягода). Имеют сферическую форму в виде шара, эллипса, боба, фасоли, зерна, ягоды. Они могут быть размером 0,5–1,5 мкм. В зависимости от взаимного расположения клеток после деления различают: микрококки (монококки); диплококки; стрептококки; стафилококки; тетракокки и сарцины.

Микрококки, или *монококки* (от лат. *micrococcus* — маленький) — делятся в различных плоскостях. После деления они располагаются одиночно, парами, беспорядочно неопределенными скоплениями. Кокки обитают в воде, почве, воздухе, сапротрофы. Они разрушают различные органические вещества и выполняют в природе в основном роль «мусорщиков». Кокки могут загрязнять лабораторные культуры, попадая в них из воздуха, например *Micrococcus luteus*.

Диплококки (от гр. *diploos* — двойной) — делятся в одной плоскости, образуя попарно соединенные кокки, так как после деления сохраняется связь между дочерними клетками. Клетки могут иметь слегка вытянутую форму, форму кофейных зерен. Среди них имеются патогенные: пневмококк — возбудитель пневмонии; менингококк — возбудитель эпидемического менингита; гонококк — возбудитель гонореи и бленнореи.

Стрептококки (от гр. *streptos* — цепочка) — кокки, расположенные в виде цепочки в результате деления бактерий в одной плоскости и сохранения связи между дочерними клетками. На препаратах в поле зрения микроскопа могут формироваться не только цепочками, но и одиночно, попарно, тетрадами, скоплениями неопределенной формы. Большинство стрептококков — сапротрофы, но есть и патогенные. У человека вызывают скарлатину, ангину, гнойные воспаления. У животных стрептококки могут быть возбудителями специфических болезней, например мыта у лошадей — *Str. equi*, мастита — *Str. agalactiae*.

Стафилококки (от гр. *staphyle* — виноградная гроздь) — кокки, делящиеся в различных плоскостях и располагающиеся в виде «гроздьев винограда», одиночно, парами, тетрадами, кучками. Стафилококки — сапрофиты и патогенные. Патогенные бактерии могут вызывать фурункулы, абсцессы, флегмоны, маститы, бронхиты, пневмонии, энтероколиты, пищевые токсикозы, стафилококкоз птиц.

Тетракокки (от гр. *tetra* — четыре) — кокки, делящиеся в двух взаимоперпендикулярных плоскостях и располагающиеся по четыре. Патогенные для человека и животных виды встречаются очень редко.

Сарцины (от лат. *sarcio* — связываю) — кокки, делящиеся в трех взаимоперпендикулярных плоскостях и образующие пакеты по 3—16 клеток и более. Среди них имеются условно-патогенные представители. В основном сарцины — сапротрофы. Особенно часто встречаются в воздухе. Обитают в почве, кишечнике животных и человека.

Шаровидные формы бактерий характеризуются рядом общих признаков. Диаметр кокков не превышает 1—2 мкм. Они хорошо ок-

рашиваются основными анилиновыми красителями. Большинство шаровидных форм грамположительны. Спорообразование у них отсутствует, за исключением немногих видов, например у *Sporosarcina ureae*. Кокки неподвижны. Некоторые образуют капсулу, например возбудитель диплококковой септицемии. В каждой морфологической группе кокков содержатся разные виды, отличающиеся друг от друга биологическими свойствами.

Патогенные виды шаровидных форм бактерий сосредоточены в родах *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Melissococcus*, *Neisseria*.

Палочковидные бактерии. Самая многочисленная группа прокариот. Они имеют осевую симметрию и цилиндрическую форму тела с резко обрубленными (сибиреязвенная бацилла), округлыми (кишечная палочка), булавовидными (коринебактерии) или заостренными (фузобактерии) концами. Палочковидные формы бактерий делят на две группы:

собственно бактерии (типичные представители – семейство *Enterobacteriaceae*);

спорообразующие бактерии (бациллы – род *Bacillus* и клостридии – род *Clostridium*).

Большинство палочек расположено беспорядочно, поодиночке, но может быть и другое расположение:

а) по две палочки – диплобактерии и диплобациллы;

б) палочки, образующие цепочки из нескольких клеток, – стрептобактерии и стрептобациллы;

в) под углом друг к другу в виде V или X (возбудители листериоза, дифтерии) или своеобразных скоплений в виде полисадов по пять и более клеток (листериин), глыбок, кучек (возбудитель паратуберкулеза).

Палочки, у которых диаметр споры не превышает ширину вегетативной клетки, называют бациллами (от лат. *bacillus* – палочка), а у которых превышают ширину клетки, – клостридиями (от лат. *clostridium* – веретенообразный). Однако у некоторых бацилл споры могут также превышать ширину вегетативной клетки (рис. 3.2), например *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus circulans* и др.

К палочковидным микробам относят коринебактерии (от гр. *korine* – булава) и фузобактерии. *Коринебактерии* – прямые или изогнутые палочки с булавовидными утолщениями на концах (род *Corynebacterium*). Среди них имеются сапрофиты, а также патогенные для животных и человека (рис. 3.3, а). *Фузобактерии* – длинные, толстые

с заостренными концами палочки (род *Fusobacterium*). Существуют патогенные виды, например возбудитель некробактериоза *F. necrophorum* (у животных), *F. nucleatum* (у человека) (рис. 3.3, б).

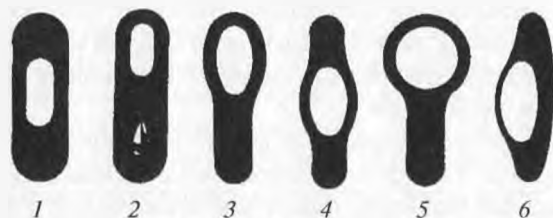


Рис. 3.2. Схематическое изображение типичных форм споробактериальных клеток (согласно Г. Шлегелю):

1 — центрально расположенная спора, не увеличивающая размер материнской клетками (*Bacillus megaterium*); 2 — терминальная спора, не увеличивающая размеров материнской клетки (*Bacillus thuringiensis*), с белковыми включениями; 3 — терминальная спора, расширяющая материнскую клетку булавовидно (*Paenibacillus macerans*); 4 — центральная спора, придающая материнской клетке веретенообразную (кlostридиеподобную) (*Paenibacillus polymyxa*); 5 — круглая терминальная спора, придающая материнской клетке форму барабанной палочки (плектридиальную форму) (*Bacillus sphaericus*); 6 — латеральная спора; материнская клетка увеличилась в размерах, приняв форму веретена (*Brevibacillus laterosporus*)



Рис. 3.3. Мазок из чистой культуры:

а — *C. diphtheriae* (окраска по Нейссеру); б — *F. nucleatum* (окраска по Граму)

Палочковидные формы бактерий обладают плеоморфизмом (изменение формы, связанное с развитием бактерий). Например, в молодой культуре *P. vulgaris* можно обнаружить клетки не только па-

лочковидной, но и овальной, кокковой и нитевидной формы. Среди палочкообразных некоторые виды бактерий в старых культурах приобретают разветвленную форму, например возбудители туберкулеза и паратуберкулеза.

Палочковидные бактерии имеют некоторые общие признаки. Собственно бактерии достигают в длину 1–4 мкм, в ширину – 0,2–0,6 мкм, бациллы и клостридии соответственно – 4–10 и 0,6–2,0 мкм. Они хорошо окрашиваются анилиновыми красителями и по Граму грамположительны и грамотрицательны. Некоторые виды бактерий имеют зернистое или же биполярное окрашивание. Среди палочковидных есть подвижные и неподвижные виды, образующие споры и капсулы. Из всех форм микробов палочковидные бактерии являются наиболее частыми возбудителями различных патологических процессов у животных и человека.

Извитые формы бактерий. Обладают спиральной симметрией. По *внешнему виду* различают: вибрионы; спириллы; спирохеты.

Вибрионы (от гр. *vibrio* – извиваюсь) – имеют цилиндрическую форму, образуя $1/4$ – $1/2$ завитка спирали и напоминают запятую (роды *Vibrio* и *Campylobacter*). Их длина составляет 5–7 мкм, ширина – 0,3–0,4 мкм. Спор и капсул не образуют, подвижны, хорошо окрашиваются анилиновыми красителями. Патогенные виды вызывают у человека холеру, у животных – кампилобактериоз.

Спириллы (от лат. *spira* – изгиб) – бактерии, имеющие вид штопорообразноизвитых клеток с 4–6 витками (род *Spirillum*). Их величина – 10–15 мкм. Анилиновыми красителями окрашиваются удовлетворительно. Спор и капсул не образуют, преимущественно сапротрофы, некоторые спириллы могут быть патогенными.

Спирохеты (от гр. *speira* – изгиб, *chaite* – длинные волосы) – прокариоты спирально извитой формы (представители типа *Spirochaetes*). У спирохет выявляются два типа витков: первичные – образованные витками протоплазматического цилиндра и вторичные – представляющие собой изгибы всего тела. Спирохеты – эластичные, спиральевидные, длинные клетки, состоящие из осевой нити (аксостилия), цитоплазмы с рибосомами и включениями, нуклеоида, мезосом, цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. Тонкая эластичная клеточная стенка имеет наружную липопротеидную мембрану и неплотный слой пептидогликана. Основная нить растянута на всю длину клетки, выполняет опорную и локомоторную функции, содержит пучок из 2–150 опорных фибрилл, состоящих из аминоксахара кутина.

Фибриллы прикреплены к дисковидным образованиям — базальным тельцам (блефоропластам).

Движение спирохет осуществляется за счет активного сокращения осевой нити и протоплазматического цилиндра. Формы движения разнообразны: вращательное, поступательное, сгибательное. По сравнению с длиной (5—500 мкм) толщина спирохет незначительна (0,1—0,6 мкм). Благодаря активным движениям, они проходят через мелкопористые фильтры (с порами 0,2—0,45 мкм), которые задерживают большинство бактерий. Спирохеты в неблагоприятных условиях могут образовывать *цисту* — укороченную и свернутую в спираль, окруженную прочной оболочкой клетку. Спирохеты плохо воспринимают красители. Ввиду этого, а также незначительного диаметра, морфологию их изучают в неокрашенном виде, применяя фазово-контрастную и темнопольную микроскопию.

По *морфологии* (размерам, числу и форме завитков), количеству осевых фибрилл, характеру движения, типу биологического окисления, патогенности в пределах группы эти микроорганизмы дифференцируют на: спирохеты; кристоспиры; трепонемы; боррелии; лептоспиры.

Спирохеты и кристоспиры обитают в открытых водоемах, сточных водах, иле. Кристоспиры — гигантские прокариоты (28—150 мкм) спирально изогнутой формы с плоской килевидной мембраной (кристой), расположенной вдоль тела клетки. Количество фибрилл у них может достигать более 100.

Трепонемы — спиралевидно извитые эластичные бактерии, имеющие 8—12 равномерных мелких завитков. Патогенными представителями являются *Treponema pallidum subsp. pallidum* — возбудитель сифилиса и *Treponema pallidum subsp. pertenue* — возбудитель тропической болезни — фрамбезии у человека, *Treponema paraluis-cuniculi* — возбудитель трепонемоза кроликов. Существуют и сапротрофы — обитатели полости рта у человека и ила водосмов.

Боррелии — извитые нитевидные бактерии шириной 0,2—0,5 мкм и длиной от 5 до 30 мкм. Осевая нить состоит из 15—20 параллельных фибрилл. Они имеют от 3 до 8 крупных завитков. Патогенными являются возбудители возвратного тифа — *Borrelia recurrentis*.

Лептоспиры — спиралевидные бактерии 0,1—0,25 × 6—30 мкм, формирующие около 20 мелких тесно расположенных первичных завитков и 1—2 вторичных, придающих клетке разные формы — Г, С, S. Концы этих спирохет утолщены и изогнуты наподобие крючков. Осевая нить

состоит из двух фибрилл. Главный тип движения — вращательно-поступательное. Сапротрофные лептоспиры обитают в воде. Патогенные могут вызывать лептоспироз у животных и человека.

3.2. Морфология и структура микоплазм, риккетсий, хламидий, актиномицетов

Микоплазмы, или *молликуты* (от гр. *mykes* — гриб, *plasma* — лепная фигура) — мелкие одноклеточные полиморфные микроорганизмы размером от 125 до 600 нм, различной формы. Могут иметь вид шаров, палочек, нитей, колец, звездочек. Эти формы можно обнаружить при фазово-контрастной микроскопии. В основном неподвижные. Спор и капсул не образуют (за исключением *Mycoplasma mycoides mycoides*), грамотрицательны. По методу Романовского—Гимзы слабо окрашиваются в голубой или розовый цвет. Существуют микоплазмы, обладающие скользкой подвижностью (подобно амебе), некоторые обладают жгутиком. Описаны микоплазмы, растущие в условиях высокой кислотности среды (ацидофилы) и повышенной температуры (термофилы).

Микоплазмы не синтезируют пептидогликан, у них нет ригидной клеточной стенки. Ее роль выполняет трехслойная цитоплазматическая мембрана толщиной 7,5–10 нм. Основным липидным компонентом мембраны являются стерины, в цитоплазме расположены рибосомы и нуклеоид. Цитоплазматическая мембрана регулирует процесс метаболизма, энергетический обмен, обеспечивает рецепцию токсинов, адсорбцию эритроцитов, сперматозоидов, эпителиальных клеток. Снаружи цитоплазматической мембраны обнаруживают капсулоподобный слой.

Микоплазмы чрезвычайно пластичны, чувствительны к лизису под влиянием осмотического шока, алкоголя. Способны проходить через мембранные фильтры, устойчивы к антибиотикам, могут инфицировать культуры тканей, сосуществовать как комменсалы с бактериями, грибами, растениями, животными и человеком.

Способность микоплазм культивироваться на искусственных питательных средах сближает их с микробами, а фильтруемость — с вирусами и L-формами бактерий.

Морфологию микоплазм изучают в живом состоянии в фазово-контрастном микроскопе и путем электронной микроскопии ультратонких срезов их клеток.

Микоплазмам присущ множественный путь репродукции: простое деление, почкование, сегментация и т. д. Для роста и размножения они нуждаются в стеролах, жирных кислотах, нативном белке. На агаризованных питательных средах с сывороткой образуют небольшие колонии, похожие на яичницу-глазунью.

Открыли микоплазмы французские ученые Э. Нокар и Э. Ру в 1989 г. при исследовании плевральной жидкости коров, больных плевропневмонией. Первоначально их называли плевропневмоподобными организмами (PPLO). Термин *Mycoplasma* введен Д. Новаком в 1929 г.

Микоплазмы не имеют широкого распространения в природе, вызывают болезни под названием микоплазмозы: контагиозную перипневмонию крупного рогатого скота, инфекционную агалактию мелкого рогатого скота (овец, коз), респираторный микоплазмоз кур и индеек. Эти микроорганизмы патогенны для человека, насекомых, растений.

Риккетсии — это одноклеточные полиморфные микроорганизмы. Они занимают промежуточное положение между бактериями и вирусами. Существуют четыре морфологических типа риккетсий (рис. 3.4, 3.5):

- кокковидные, или монозернистые (0,3–1 мкм);
- бактериальные, или гантелевидные (1–1,5 мкм);
- бациллярные (3–4 мкм);
- нитевидные, или полизернистые (10–40 мкм).

Риккетсии спор и капсул не образуют, неподвижны, грамотрицательны. По Циллю–Нильсену и Романовскому–Гимзе окрашиваются в красный цвет.

Особенностью риккетсий является зернистое расположение ядерного вещества. У риккетсий бактериального типа оно расположено по полюсам клетки, у риккетсий бациллярного типа имеет вид четырех гранул, у нитевидных — представлено множеством гранул.

Риккетсии обладают некоторыми свойствами вирусов и бактерий. В лабораторных условиях культуры риккетсий получают путем выращивания на куриных эмбрионах, культуре клеток, в организме лабораторных животных. Впервые способ культивирования их в желточном мешке куриных эмбрионов разработал Г. Р. Кокс. От вирусов отличаются тем, что содержат ДНК и РНК, а клеточная стенка — мурамную кислоту. Одни и те же виды риккетсий паразитизируют не только в клетках млекопитающих, но и в клетках различных членистоногих (вши, блохи, клещи, пухоеды, пауки, комары).



Рис. 3.4. Морфологические формы риккетсий:
 а — кокковидные; б — палочковидные; в — бациллярные; з — нитевидные;
 д — дробление нитевидных форм



Рис. 3.5. Различная степень заселения клеток при риккетсиозном периорхите у морской свинки (окраска по Здродовскому)

В 1909 г. американский ученый Х. Риккетс, изучая пятнистую лихорадку Скалистых гор, описал в качестве возбудителя этой болезни микроорганизм, который отличался от всех ранее известных. Затем, работая в Мексике, он показал, что сходный микроб вызывает сыпной тиф. Он заразился возбудителем сыпного тифа и умер.

В 1916 г. бразильский ученый Э. да Роша Лима в честь Риккетса предложил родовое название *Rickettsia*, а также и видовое название — в честь Станислава Провачека, который умер, изучая сыпной тиф. С тех пор возбудитель сыпного тифа, передающийся вшами, называется *Rickettsia prowazekii*. Этот вид является типовым для рода *Rickettsia*.

В природе риккетсии циркулируют среди насекомых, грызунов, птиц и сельскохозяйственных животных, от которых могут передаваться человеку. Распространение бактерий среди людей и сельско-

хозяйственных животных происходит через кровососущих членистоногих, которые выделяют риккетсии или только с фекалиями (вши, блохи), или же и с секретом слюнных желез (клещи). Перенос риккетсий от членистоногих к животным и человеку возможен не только при укусе, но и при попадании испражнений членистоногих в мелкие царапины и повреждения кожи.

Риккетсии могут вызывать инфекционную патологию у крупного рогатого скота, собак, мелкого рогатого скота. Болезнь может протекать в форме бессимптомной инфекции (Ку-лихорадка у крупного рогатого скота) или в форме тяжелой, часто с летальным исходом болезни (гидроперикардит). У человека риккетсии вызывают лихорадку с характерными высыпаниями на коже и поражением мелких кровеносных сосудов. Летальность достигает до 90 %.

Хламидии (от гр. *chlamydis* – плащ, мантия) – кокковидные, мелкие (0,5 мкм), грамотрицательные прокариотные облигатные внутриклеточные паразиты. Спор, капсул не формируют, неподвижны. Содержат два типа нуклеиновых кислот: ДНК и РНК. В отличие от риккетсий не паразитируют в организме членистоногих, развиваются только в живых клетках, на куриных эмбрионах и в тканевых культурах. Их размножение без живой клетки-хозяина невозможно. Своеобразие паразитирования хламидий состоит в том, что они способны размножаться в клетках, не нарушая на первых порах их функций.

В процессе размножения микроорганизмы проходят две стадии жизненного цикла. Одна – инфекционная стадия – элементарные тельца (ЭТ) – они приспособлены к внеклеточному существованию, их размер – 0,2–0,5 мкм, другая – ретикулярные тельца (РТ) – внутриклеточная неинфекционная форма. РТ лабильны, обладают выраженной метаболической активностью. Их размер – 0,3–1,0 мкм, содержат нуклеоид, в клеточной стенке аналог пептидогликана грамотрицательных бактерий. Элементарные тельца проникают в клетку при фагоцитозе. Из поверхностных мембран клетки-хозяина вокруг ЭТ образуется вакуоль, и ЭТ превращаются в крупные РТ. Внутри вакуоли РТ многократно делятся. Вакуоль через 8–12 циклов деления превращается в микроколонию, содержащую ЭТ нового поколения. Мембрана, окружающая колонию, разрывается, и хламидии выходят в цитоплазму и дальше за пределы клетки. Весь цикл развития занимает около 3 сут.

При окраске по Стемпу хламидии ярко-красные, цитоплазма клеток хозяина бледно-зеленая, ядра клеток окрашены в бледно-зеленый цвет

несколько интенсивнее, чем цитоплазма. При окраске по Маккиавелло хламидии приобретают рубиново-красный цвет, цитоплазма клеток — светло-синяя, ядра — темно-синие, а по Романовскому—Гимзе — возбудитель хламидиоза окрашивается в темно-фиолетовый цвет, цитоплазма клеток хозяина фиолетово-голубая, ядра сине-фиолетовые.

У человека хламидии вызывают трахому, орнитоз, всенерический лимфогранулематоз, у других млекопитающих — пневмонии, аборт, энтериты, менингоэнцефалиты, конъюнктивиты, полиартриты.

В природе хламидии циркулируют среди птиц и многих видов млекопитающих. Отличают их от членистоногих, рыб, моллюсков.

Актиномицеты (от гр. *actis* — луч, *mykes* — гриб) — лучистые грибы — одноклеточные микроорганизмы, тело которых состоит из тонких (0,2–2 мкм) длинных нитей (гиф). Гифы могут быть прямыми или спиралевидными, имеют единую оболочку и протопласт. Кроме нитчатой встречаются палочковидные и кокковидные формы. Расположены гифы радиально и напоминают лучи, расходящиеся от центра. Отчасти этим и объясняется название микроорганизмов. В препаратах наряду с длинными клетками наблюдают довольно короткие в форме букв V, Y, T. Среди актиномицетов бывают подвижные и неподвижные. Капсул, спор не образуют, грамположительны. Некоторые актиномицеты образуют микрокапсулу.

Размножаются с помощью спор, которые образуются в результате сегментации и фрагментации. Могут размножаться почкованием. Строение актиномицетов аналогично грамположительным бактериям: они имеют клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, в цитоплазме нуклеоид, рибосомы, мезосомы, внутриклеточные включения. Клеточная стенка содержит пептидогликан, но не имеет, как у грибов, хитина и целлюлозы. В отличие от грибов у актиномицетов нет четко оформленного ядра.

На плотных средах актиномицеты образуют субстратный (врастающий в среду) и воздушный (возвышающийся над средой) мицелий. На воздушных гифах актиномицеты могут образовывать споры для размножения, которые называют конидиями. Конидии могут быть подвижными и неподвижными. Для актиномицетов характерен гетеротрофный тип питания и аэробный тип дыхания, обнаружены и анаэробы.

Отдельные виды актиномицетов синтезируют пигменты: розовый, желтый, синий и др. Колониям многих бактерий и грибов свойственна розовая окраска, обусловливаемая выделением окрашенного продукта в окружающую среду или же пигментацией самой клетки. Среди пиг-

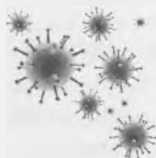
ментов могут быть представители различных классов веществ: каротиноиды, фенозиновые красители, пироллы и др. Пигменты играют защитную роль, предохраняя клетки от действия видимого и ультрафиолетового спектра света. Бактерицидное действие видимого света проявляется только в присутствии кислорода и обусловлено фотоокислением. Каротиноиды находятся в плазматической мембране и защищают чувствительные области клетки от эффектов фотоокисления.

Актиномицеты обитают преимущественно в почве, обнаруживают их в воде, на растениях, коже и слизистых оболочках животных. Они разлагают органические субстраты, в том числе недоступные для других микроорганизмов. Эти бактерии участвуют в круговороте веществ и энергии, образовании почвы и ее плодородии. Многие актиномицеты являются продуцентами антибиотиков, витаминов, аминокислот, ферментов.

Морфологию актиномицетов изучают в окрашенных препаратах при помощи фазово-контрастной и электронной микроскопии.

Патогенные актиномицеты вызывают у животных и человека болезни под названием актиномикозы. В тканях больных животных отдельные виды актиномицетов образуют скопления, иногда состоящие из нескольких клеток, так называемые друзы. Радиально расходящиеся нити в друзах на концах имеют булавовидные утолщения, размер которых может достигать до 300 мкм.

Глава 4 ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ



Физиология микроорганизмов — раздел микробиологии, изучающий жизнедеятельность микробов, процесс их питания, дыхания, роста и размножения, закономерности взаимодействия с окружающей средой и т. д. Знание физиологических процессов — научная основа для решения таких проблем, как культивирование, особенно промышленное, для получения иммуностимулирующих препаратов, аминокислот, ферментов, антибиотиков, вакцин, гипериммунных сывороток и т. д.

4.1. Химический состав прокариотной клетки

Химический состав бактериальной клетки сходен с химическим составом клеток всех живых организмов. В состав всех клеток входят в основном одинаковые минеральные и органические вещества. Клетка – универсальная структурная единица живой материи. Подтверждением тому является сходство химического состава бактерий и клеток млекопитающих, хотя по относительному объему клетка млекопитающих во много раз превосходит клетку бактерий. Примерный химический состав типичной бактерии и типичной клетки млекопитающих представлен в таблице.

Таблица. Химический состав бактерии и клетки млекопитающих

Компонент	Доля от общей массы клетки, %	
	Бактерии	Млекопитающие
Вода	Около 70–85	Около 70
Неорганические ионы (Na, K, Mg, Ca, Cl)	1	1
Разнообразные низкомолекулярные вещества	3	3
Белки	15	18
РНК	6	1,1
ДНК	1	0,25
Фосфолипиды	2	3
Полисахариды	2	2

Общий объем бактериальной клетки равен $2 \cdot 10^{-12}$ см³, а клетка млекопитающих превосходит по объему бактериальную клетку в 2000 раз.

В состав микроорганизмов входят вода, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, минеральные вещества.

Основной компонент бактериальной клетки – вода, составляющая 70–85 % ее массы. Вода играет большую роль в физиологии микробной клетки. Она служит средой для коллоидов, растворителем для минеральных веществ, обеспечивает тургор (давление внутри клетки), является источником водородных и гидроксильных ионов. В водной среде клетки протекают сложные гидролитические процессы расщепления многих веществ и синтеза многих новых молекул. Уменьшение воды в клетке ведет к замедлению ее жизнедеятельности (анабиозу), а высушивание – даже к гибели вегетативных форм. Больше воды содержат молодые бактериальные клетки, меньше –

зрелые, а споры — не больше 40 %. Некоторая часть воды в клетке находится в свободном состоянии, а часть — в связанном. Свободная вода служит средой, в которой происходит движение ионов и электрических зарядов.

Ведущую роль в жизнедеятельности клетки играют четыре органиогены — О, Н, С, N. По отношению к сухому веществу бактерии содержат: С — 45–55 %, О — 30, N — 8–15, Н — 6–8 %.

Минеральные вещества бактерий представлены макро- и микроэлементами. К макроэлементам относят 10 элементов, содержащихся во всех организмах: С, О, Н, N, S, P, K, Ca, Mg, Fe.

К микроэлементам относят молибден, никель, кобальт, бор, марганец, медь, цинк и др. Они стимулируют рост и размножение бактерий. Минеральные вещества составляют от 3 до 10 % сухого вещества микроорганизмов. Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот. Железо является необходимым элементом для осуществления процессов дыхания и энергетического обмена. Магний обеспечивает активность ряда ферментов.

Белки — высокомолекулярные биологические полимерные соединения, составляющие 50–80 % сухого вещества микробной клетки. Различают два вида белков: протеины и протеиды. Протеины (флагеллин, уреазы, пилин и др.) при гидролизе распадаются на аминокислоты. Протеиды — сложные соединения простых белков с небелковыми группами, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами, жироподобными и другими веществами. С учетом этого различают нуклеопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды и др. Белки являются одним из компонентов клеточных мембран и выполняют различные функции: каталитическую, двигательную, транспортную, защитную, запасную, гормональную и др.

Белки бактериальной клетки обуславливают антигенность, иммуногенность, вирулентность, видовую принадлежность бактерий.

Кроме обычных аминокислот в состав бактерий входит диаминопимелиновая кислота (ДАП), которая отсутствует в клетках человека и животных.

В состав бактерий входят ДНК и РНК (матричная, транспортная, рибосомная). ДНК является носителем наследственности, РНК участвует в синтезе белка.

Углеводы в микробной клетке составляют 12–18 % от сухого вещества и представлены многоатомными спиртами, моно- и полисахаридами. Углеводы служат источником углерода и энергии. Некоторые

полисахариды (крахмал, гликоген) являются запасными питательными веществами.

В состав бактерий входят *липиды* – истинные жиры и *липоиды* – жироподобные вещества (например, каротиноиды некоторых бактерий и актиномицетов). Общее содержание липидов варьирует от 5 до 40 % (риккетсии, микобактерии). Бактериальные липиды состоят из свободных жирных кислот, нейтральных жиров, восков и фосфолипидов. Особого внимания заслуживают фосфолипиды – сложные эфиры высших спиртов и кислот, содержащие азот и фосфор. Они входят в состав токсической фракции ряда микробов. В микробной клетке липиды распределены неравномерно. Их больше содержится в поверхностных слоях цитоплазмы и оболочке клетки.

Основная масса липидов в бактериальной клетке связана с другими компонентами (белками, полисахаридами). Они выполняют разнообразные функции: являются аккумуляторами энергии у некоторых бактерий (поли- β -оксимасляная кислота), служат структурными компонентами клетки (цитоплазматическая мембрана), участвуют в метаболизме углеводов, в энергетическом обмене, входят в состав глицидолипидных комплексов, обуславливающих токсигенные и антигенные свойства некоторых патогенных бактерий (например, входят в состав эндотоксина грамотрицательных бактерий, в составе ЛПС формируют антигены), определяют кислотоустойчивость бактерий (например, микобактерий) и их термотолерантность и термофильность. Липиды играют роль резервных веществ и в ряде случаев могут использоваться как исходные компоненты для синтеза белков.

4.2. Питание бактерий

Животные, простейшие способны заглатывать плотные и жидкие частицы пищи. Такой способ питания называется *голозойным*. Проглоченная пища подвергается перевариванию под действием гидролитических ферментов. У многоклеточных животных это происходит в желудочно-кишечном тракте, а у одноклеточных, например у простейших, – в пищеварительных вакуолях.

Бактерии, дрожжи, плесени, риккетсии, микоплазмы, хламидии не имеют желудка, пищеварительных органов или органелл. Питательные вещества в виде небольших молекул в водном растворе проникают

в микроорганизм через всю поверхность клетки. Такой способ питания получил название *голофитного*. В качестве питательных веществ микробные клетки используют различные органические и минеральные соединения.

Известно несколько механизмов питания микробных клеток. Питательные вещества могут проникать в клетку через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану. В основе механизма такого проникновения лежит осмотическое явление, основанное на разнице концентрации питательных веществ в микробной клетке и питательном растворе.

Механизмы проникновения питательных веществ в клетку

1. Простая диффузия – питательные вещества поступают в клетку вследствие разницы их концентрации по обе стороны цитоплазматической мембраны. Пассивная диффузия протекает без затраты энергии.

2. Облегченная диффузия – происходит в результате разницы концентрации веществ по обе стороны цитоплазматической мембраны. Однако этот процесс осуществляется с помощью белков-переносчиков, которыми могут быть пермеазы. Местом их нахождения является периплазма и цитоплазматическая мембрана. Облегченная диффузия протекает без затраты энергии.

3. Активный транспорт происходит с помощью пермеаз и заключается в переносе веществ в направлении от меньшей концентрации к большей, поэтому данный процесс сопровождается затратой метаболической энергии (АТФ), образующейся в результате окислительно-восстановительных реакций в клетке.

4. Перенос (транслокация) группы молекул сходен с активным транспортом и отличается тем, что переносимая молекула видоизменяется в процессе переноса, например фосфорилируется.

Одно из основных свойств живого – *обмен веществ*. Он включает два процесса:

поступление из окружающей среды питательных веществ, необходимых для синтеза составных частей клетки;

выделение в окружающую среду продуктов жизнедеятельности клетки.

Обмен веществ (метаболизм) организмов состоит из двух взаимосвязанных процессов: ассимиляции (анаболизм) и диссимиляции (ка-

таболизм). Анаболизм – это преимущественно конструктивный обмен веществ, катаболизм – энергетический обмен.

Типы питания. Широкому распространению бактерий способствует разнообразие типов их питания. Микробы могут получать углерод из неорганических и органических углеродсодержащих соединений. По способу углеродного питания микроорганизмы делят на аутотрофы и гетеротрофы.

Аутотрофы (гр. *autos* – сам, *trophe* – пища, питание) – это микроорганизмы, способные усваивать или фиксировать углекислый газ воздуха в качестве единственного источника углерода и синтезировать из него органические вещества своих клеток. К ним относят нитрифицирующие бактерии, серобактерии, железобактерии и др. Они превращают углекислоту в сложные органические соединения путем хемосинтеза, т. е. путем окисления химических соединений (аммиак, нитриты, сероводород и др.). Аутотрофы обладают способностью синтезировать органические вещества из неорганических. Они не нуждаются в органических соединениях углерода, входящих в состав клеток животных и человека, поэтому они не являются патогенными. Среди аутотрофов встречаются микроорганизмы, обладающие способностью усваивать углерод из углекислого газа воздуха и из органических соединений. Такие микроорганизмы называют *миксотрофами*.

Гетеротрофы (от гр. *heteros* – другой, *trophe* – пища) получают углерод из готовых органических соединений. Гетеротрофы – возбудители различного рода брожений, гнилостные и болезнетворные микроорганизмы. Их подразделяют на метатрофы, или сапротрофы, и паратрофы. **Сапротрофы** (от гр. *sapros* – гнилой, *phyton* – растение) – гнилостные микроорганизмы. **Паратрофы** (гр. *parasitos* – нахлебник) – паразиты, питающиеся за счет организма, в котором они живут. В качестве источника углерода гетеротрофы чаще всего используют углеводы, спирты, различные органические кислоты.

С учетом источника энергии доноров – электронов микроорганизмы подразделяют на следующие группы:

хемолитотрофы – получают углерод из углекислого газа (CO_2) воздуха и создают органическое вещество при помощи энергии, освобождающейся в процессе окисления некоторых минеральных соединений;

фотолитотрофы (цианобактерии, пурпурные, серобактерии) – синтезируют органическое вещество, используя углерод из углекислого газа воздуха и энергию солнца, т. е. как и растения. Они содержат пигменты, близкие по своему составу к хлорофиллу растений;

хемоорганотрофы – микробы, которые получают необходимую энергию для осуществления своей жизнедеятельности в результате окисления органических веществ;

фотоорганотрофы – необходимую энергию получают от солнца и в процессе окисления органических веществ.

По способу усвоения азотистых веществ микроорганизмы разделяют на следующие группы:

протеолитические, способные расщеплять нативные белки, пептиды и аминокислоты;

дезаминирующие, способные разлагать только отдельные аминокислоты, но не белковые вещества;

нитритно-нитратные, усваивающие окисленные формы азота;

азотфиксирующие, обладающие свойством усваивать атмосферный азот.

4.3. Дыхание бактерий

Под термином «дыхание» следует понимать все окислительно-восстановительные процессы живой клетки, связанные с освобождением энергии в виде аденозинтрифосфата (АТФ). Дыхание – это эволюционно наиболее совершенный способ получения энергии. Его совершенство в том, что энергия используемого субстрата утилизируется наиболее полно. При дыхании происходят процессы окисления и восстановления: окисление – отдача донорами (молекулами или атомами) водорода или электронов; восстановление – присоединение водорода или электронов к акцептору. Акцептором водорода или электронов может быть молекулярный кислород – такое дыхание называется *аэробным*, а если акцепторами служат нитрат, сульфат, фумарат, то такое дыхание называется *анаэробным*.

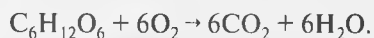
Анаэробноз (от гр. отрицательная приставка – *an* + *aeros* – воздух + *bios* – жизнь) – жизнедеятельность, протекающая при отсутствии свободного кислорода.

Все физиологические процессы: движение, рост, размножение, образование спор, капсул, выработка токсинов – осуществляются при постоянном притоке энергии. Микробы добывают энергию за счет окисления различных химических соединений, углеводов (чаще глюкозы), спиртов, органических кислот, жиров. Основную роль в дыхании большинства микроорганизмов играет цикл трикарбоновых кислот, где ор-

ганические вещества как источник энергии окисляются до углекислого газа, а отнятый от них электрон передается по дыхательной цепи активированному кислороду. Освободившаяся в результате этих процессов энергия закрепляется в АТФ или других органических фосфатах.

Если донорами и акцепторами водорода являются органические соединения, то такой процесс называют *брожением*. При брожении происходит ферментативное расщепление органических соединений (преимущественно углеводов) в анаэробных условиях. По конечному продукту расщепления различают спиртовое, молочнокислое, уксуснокислое и другие виды брожения. Следовательно, дыхание, или биологическое окисление, – совокупность сложных биохимических процессов, вследствие которых происходит освобождение энергии, необходимой для жизнедеятельности микробных клеток.

Процесс дыхания состоит в том, что углеводы и другие запасные вещества окисляются при участии кислорода воздуха до CO_2 и H_2O . Субстратами дыхания могут быть белки, жиры, углеводы и многие другие вещества. Наиболее типичный случай дыхания – окисление углеводов, а именно: шестиуглеродных сахаров. В суммарном виде дыхание может быть выражено следующим уравнением:



За этой суммарной формулой скрывается сложная цепь превращений. Данная цепь ферментативных реакций универсальна, т. е. в принципе одинакова у животных, растений и многих микроорганизмов.

Типы биологического окисления. С биохимической точки зрения окисление субстрата микроорганизмами достигается по типу прямого и непрямого окисления (или дегидрогенирования).

1. *Прямое окисление* – осуществляется с помощью оксидаз путем непосредственного окисления вещества кислородом воздуха или же путем дегидрогенирования – отнятия от субстрата водорода, точнее, его электрона.

2. *Непрямое окисление* – происходит путем дегидрогенирования, сопровождается одновременным переносом двух электронов, причем от субстрата отщепляются два протона (H^+). Аэробное дегидрогенирование происходит в присутствии кислорода, акцептором водорода является кислород, в результате чего в зависимости от набора ферментов образуется H_2O или H_2O_2 . Анаэробное дегидрогенирование осуществляется в отсутствие молекулярного кислорода. Акцепторами водорода являются нитраты, сульфаты и карбонаты, которые превращаются

при этом в более восстановленные соединения – аммиак, метан, сероводород. При анаэробном дыхании выход энергии меньше, чем при аэробном, хотя в некоторых случаях его энергетическая эффективность только на 10 % ниже аэробного окисления.

По типу дыхания микробы делят на облигатные (строгие) аэробы; облигатные анаэробы; факультативные (необязательные) анаэробы; микроаэрофилы.

Облигатные (строгие, безусловные) аэробы растут, размножаются, осуществляют свою деятельность при доступе кислорода (например, *Ps. aeruginosa*, *Bor. pertussis*, *Myc. tuberculosis*). У них дыхание происходит так же, как у животных и растений, т. е. с использованием молекулярного кислорода воздуха, который осуществляет биологическое окисление органических (гетеротрофы) или неорганических (аутотрофы) веществ с освобождением определенного количества энергии.

Облигатные анаэробы развиваются при полном отсутствии кислорода (например, возбудители столбняка, некробактериоза, эмкара). Наличие свободного кислорода для строгих анаэробов является губительным, так как у них нет ферментов (каталаз), способных расщеплять H_2O_2 , понижен окислительно-восстановительный потенциал, отсутствуют цитохромы.

До классических работ Л. Пастера биологи считали, что без кислорода нет жизни. Пастер открыл явление анаэробнозиса. Он писал: «Жизнь возможна и без кислорода, за счет брожения. Брожение есть способ существования бактерий без воздуха».

Для выделения и культивирования анаэробных микроорганизмов используют физический, химический, биологический и комбинированный методы создания анаэробнозиса.

Сущность физического метода сводится к удалению воздуха из эксикатора или анаэрозоата с помощью вакуумного электронасоса.

Химический метод основан на применении поглотителей кислорода, которые помещают в эксикатор, где находятся питательные среды с засеянными анаэробами.

Биологический метод основан на культивировании на плотной питательной среде аэробов и анаэробов (метод Фортнера). В специальную чашку Петри, где питательная среда разделена валиком на две половины, высевают на одну половину аэробы, на другую – анаэробы.

Чашку Петри тщательно изолируют от доступа атмосферного воздуха. Вначале растут аэробы, а затем в результате поглощения ими кислорода воздуха начинают размножаться анаэробы.

Комбинированный метод представляет собой использование двух методов, например физического и химического.

Факультативные анаэробы растут, размножаются как при доступе воздуха, так и при его отсутствии (возбудитель рожи свиней, сальмонеллы, эшерихии, иерсинии). Среди факультативных анаэробов различают аэротолерантные бактерии, которые растут при наличии молекулярного кислорода, но не используют его.

Микроаэрофилы требуют для своего развития до 1 % кислорода (лептоспирь, актиномицеты). Различают микроаэрофильные аэробы (например, гонококки, которые лучше культивируются при уменьшенном содержании кислорода – около 5 %) и макроаэрофильные анаэробы, которые способны расти в анаэробных и микрофильных условиях, но не растут в обычной воздушной среде или CO_2 . Выделяют также капнофильные микроорганизмы – бактерии, растущие в повышенных концентрациях углекислого газа (3–5 %). К ним относят бактериоиды, фузобактерии, гемофильные бактерии и др.

В ряде случаев микробы не используют для осуществления жизненно необходимых процессов всю выработанную при дыхании тепловую энергию. В связи с этим большое количество теплоты выделяется во внешнюю среду. Часто такая избыточная энергия образуется при размножении микробов-термофилов в навозе, торфе, мусоре и может привести к их самовозгоранию. Это явление имеет и положительное значение – экзотермическая реакция (при этой реакции температура достигает 60–70 %) лежит в основе биологического метода дезинфекции, применяемого с целью уничтожения в навозе вегетативных форм патогенных микробов.

4.4. Рост и размножение микроорганизмов

Под *ростом* понимают увеличение размеров отдельной особи и упорядоченное воспроизведение всех химических компонентов и структур, увеличение цитоплазматической массы отдельной клетки или популяции в результате синтеза клеточного материала.

Размножение – процесс воспроизведения себе подобных особей, обеспечивающий продолжение существования вида, увеличение количества бактерий в микробной популяции. Бактерии размножаются в основном путем бинарного деления пополам, реже путем почкования, фрагментации нитевидных клеток, спорами. Грамположитель-

ные бактерии делятся путем вставания синтезирующихся перегородок деления внутрь клетки, а грамотрицательные — путем перетяжки в результате образования гантелевидных фигур, из которых затем образуются две одинаковые клетки.

Шаровидные формы микробов делятся в разных плоскостях, в результате чего образуются одиночные, парные клетки или расположенные в виде цепочек, гроздьев и т. д.

Микроскопические грибы чаще всего размножаются спорами, половым путем, почкованием.

В процессе деления происходит репликация ДНК, которая осуществляется ДНК-полимеразами. Удвоение происходит с определенной скоростью, что зависит от возраста культуры, вида бактерий, качества питательной среды. Например, время между двумя последовательными делениями у кишечной палочки составляет 15–20 мин, у туберкулезной палочки — 18–20 ч.

Бактерии, засянные в определенный неизменяющийся объем жидкой питательной среды, размножаясь, потребляют питательные вещества, что приводит к истощению среды и прекращению их роста. Культивирование микробов в такой системе называется *периодическим*, а культура — *периодической*. Если культивирование поддерживается путем подачи свежей питательной среды и оттока такого же объема культуральной жидкости, такое культивирование называют *непрерывным*, а культуру — *непрерывной*. При выращивании бактерий на жидкой питательной среде наблюдают: придонный рост, диффузное помутнение среды, образование пленки на поверхности среды, пристеночного кольца и т. д. При выращивании на плотной питательной среде бактерии формируют колонии в R- и S-форме. Колонии могут быть в O-, D-, M- и L-форме. Подвижные бактерии при засеве их в полужидкий агар путем укола вызывают помутнение питательной среды, а неподвижные растут по месту укола в виде серо-белого стержня. Характер роста микробов на жидкой, полужидкой и плотной питательной средах довольно разнообразен и зависит от вида культивируемых микроорганизмов.

Рост периодической культуры подразделяют на несколько фаз, или периодов (рис. 4.1). Многие исследователи различают восемь фаз роста бактерий, сменяющих друг друга в определенной последовательности. Большинство авторов подразделяют рост периодической культуры на четыре фазы.



Рис. 4.1. Фазы размножения бактерий (по А. А. Воробьеву и др.)

1. Лаг-фаза (от англ. *lag* — запаздывание) — начальная фаза, или фаза покоя, — период между посевом бактерий и началом их размножения. В этой фазе в клетках повышается количество нуклеиновых кислот, белка и других компонентов, бактерии увеличиваются в размерах и готовятся к делению. Продолжительность этой фазы составляет 4–5 ч.

2. Фаза логарифмического (экспоненциального) роста — период наиболее интенсивного роста и деления бактерий. Бактерии делятся через 20–40 мин (время генерации — интервал между делениями клетки). Продолжительность фазы — 5–6 ч. В данной фазе бактерии наиболее зависимы от условий культивирования, состава среды и т. п., что объясняется высокой чувствительностью интенсивно растущих клеток к ингибиторам синтеза белка, нуклеиновых кислот и других соединений.

3. Стационарная фаза, или период зрелости, — графически представляет собой участок кривой, почти параллельный оси абсцисс. Наступает равновесие между числом вновь образованных и погибших клеток. Уменьшается количество питательных веществ в среде, увеличивается количество продуктов метаболизма, а плотность популяции клеток остается постоянной.

4. Фаза отмирания характеризуется отмиранием клеток в связи с истощением питательных веществ в среде и накоплением в ней продуктов метаболизма бактерий. Продолжительность этой фазы исчисляется десятками часов и даже несколькими неделями.

При развитии микробной популяции выделяют два основных процесса — размножение и отмирание клеток, поэтому популяцию бактерий в определенный момент времени можно количественно оха-

рактировать двумя параметрами: концентрацией живых клеток и величиной, указывающей на общее количество как живых, так и погибших микробов.

Количество живых клеток в популяции определяют путем посева разведенных проб растущей культуры на плотную питательную среду, на поверхности которой каждая клетка формирует колонию. Подсчет числа колоний характеризует количество жизнеспособных клеток в единице объема питательной среды.

Общее число бактерий определяют по оптической плотности культуральной жидкости с помощью фотоэлектроколориметров или спектрофотометров, используют микроскопический метод подсчета клеток в счетной камере и другие методы.

4.5. Ферменты микроорганизмов

Наука о ферментах – *энзимология* возникла сравнительно недавно, в первой половине XIX в. Особенно бурное развитие она получила в последние десятилетия XXI в. Современная энзимология – это обширная область знаний о более чем 2000 ферментах, их основных свойствах, физико-химических характеристиках. Кроме того, разработаны методы количественного определения ферментов и их очистки. Первые работы по получению ферментов в чистом виде были проведены Р. Вильштеттером (1922–1928). В 1926 г. американский биохимик Дж. Самнер получил фермент уреазы в кристаллическом виде.

Жизнь зависит от сложной совокупности химических реакций, осуществляемых специфическими ферментами, любое изменение их деятельности может повлечь за собой серьезные последствия для живого организма. В отличие от химических катализаторов, которые ускоряют многие химические реакции и действуют в широком диапазоне, ферменты являются биологическими катализаторами. По словам И. П. Павлова, «биокатализаторы есть возбудители жизни».

Ферменты – это биологические катализаторы, глобулярные белки, молекулярная масса которых колеблется от 15 кДа до нескольких тысяч, участвующие в процессах анаболизма и катаболизма.

Клетки микроорганизмов способны синтезировать большое количество ферментов. Например, геном *E. coli* содержит 4391 ген, из которых 4288 генов кодируют белки. В числе продуктов экспрессии

генов кишечной палочки, как минимум, 607 являются ферментами, участвующими в метаболизме бактерии, причем 311 представляют собой комплексные соединения, а остальные 296 являются мономерами. Благодаря этому микроорганизмы в состоянии осуществлять одновременно ряд различных реакций в среде, где они находятся.

Основные свойства ферментов:

- 1) не входят в состав конечных продуктов реакции и не изменяются в ее процессе;
- 2) ускоряют только те реакции, которые, подчиняясь законам термодинамики, могут протекать и без их участия;
- 3) в природе все ферменты синтезируются только живыми клетками;
- 4) в большинстве случаев основной составной частью фермента является белок;
- 5) отличаются высокоспецифическим действием, каждый из них ускоряет или катализирует только одну или группу сходных между собой реакций;
- 6) ферменты в цитоплазме бактериальной клетки находятся в коллоидном состоянии.

От химических катализаторов ферменты отличаются по структуре и характеру действия:

- 1) являются в своем большинстве белками;
- 2) отличаются узким спектром действия на субстраты;
- 3) при производстве различных веществ обеспечивают почти 100% -й выход чистых продуктов;
- 4) в организме регулируют и координируют процессы образования и именно необходимых веществ, участвуя в поддержании гомеостаза;
- 5) скорость протекания ферментативных реакций в организмах на несколько порядков выше, чем реакций *in vitro* с участием химических катализаторов.

Ферменты классифицируют на: экзоферменты (катализирующие процессы расщепления сложных веществ вне клетки) и эндоферменты (катализируют реакции метаболизма, протекающие внутри клетки).

Экзоферменты выделяются в субстрат при жизни микробной клетки, растворимы в питательной среде, проходят через бактериальные фильтры. Эти ферменты расщепляют сложные высокомолекулярные вещества (белки, крахмал, клетчатку и др.) и подготавливают

их к усвоению микробной клеткой, т. е. они обеспечивают процесс питания.

Эндоферменты прочно связаны с клеткой бактерий и действуют только внутриклеточно. Они осуществляют разложение питательных веществ, поступающих в клетку, и их включение в составные части бактерий.

По объекту действия выделяют ферменты:

- 1) белкового синтеза — связаны с рибосомами;
- 2) энергетического обмена и транспорта питательных веществ, расположены в ЦПМ и мезосомах;
- 3) метаболизма белка и других органических веществ;
- 4) расщепляющие углеводы.

Все известные ферменты разделяют на шесть классов.

1. *Оксидоредуктазы* — ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, они играют ведущую роль в процессах биологического получения энергии (дегидрогеназа, каталаза и др.).

2. *Гидролазы* — катализируют реакции расщепления и синтеза таких сложных соединений, как белки, жиры, углеводы с участием молекул воды (эстеразы, фосфотазы, глюкозидазы).

3. *Трансферазы* — переносят отдельные радикалы и атомы от одних соединений к другим (ацетилтрансфераза, фосфотрансфераза, аминотрансфераза и др.).

4. *Лиазы* — разрывают связи между атомами углерода без участия воды (например, карбоксилазы).

5. *Изомеразы* — ферменты, превращающие органические соединения в их изомеры (фосфогексоизомераза).

6. *Лигазы, или синтетазы*, — ускоряют синтез сложных соединений из более простых (аспарагинсинтетаза, глутаминсинтетаза и др.).

Кроме того, различают конститутивные и индуцибельные (индуктивно-адаптивные) ферменты.

К конститутивным относят ферменты, которые синтезируются клеткой непрерывно, независимо от наличия в питательной среде соответствующего субстрата (лиазы, оксидазы).

Индукцибельные ферменты синтезируются бактериальной клеткой только при наличии в среде субстрата данного фермента. Например, β -галактозидаза кишечной палочки на среде с глюкозой практически не образуется, но ее синтез резко возрастает при выращивании *E. coli* на среде с лактозой.

Патогенные микробы имеют ферменты агрессии, которые способствуют проникновению, распространению и паразитированию микроорганизмов в макроорганизме:

плазмокоагулаза — свертывает плазму крови;

нейраминидаза (сиалидаза) — расщепляет нейраминную (сиаловую) кислоту, которая входит в состав поверхностных рецепторов клеток слизистых оболочек. Это делает оболочки доступными для взаимодействия с микробами и их токсинами;

гиалуронидаза — расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества тканей, что способствует проникновению микробов в глубь тканей организма;

коллагеназа — фермент, разрушающий коллаген мышечных волокон, что ведет к интенсивному расплавлению мышечной ткани;

лецитиназа (фосфолипаза) — разрушает лецитин, входящий в состав клеточных и митохондриальных мембран самых разнообразных клеток;

дезоксирибонуклеаза — разрушает дезоксирибонуклеиновую кислоту, которая в основном содержится в клеточных ядрах;

фибринолизин — фермент, растворяющий сгусток фибрина, который образуется в процессе воспаления и препятствует проникновению микробов в глубь органов и тканей.

Переоценить значение ферментов в жизнедеятельности микробов невозможно. Они катализируют процессы питания, дыхания, роста и размножения. Все процессы обмена и базирующиеся на них вирулентность, патогенность, антигенная структура зависят от набора и локализации ферментов. Каждый вид бактерий обладает определенным набором ферментов, что обусловлено генотипом. Скорость реакций, катализируемых ферментами, различна и зависит от количества и активности ферментов, концентрации субстрата, значения pH, температуры, присутствия в среде активаторов и ингибиторов. Активаторы — соединения, содержащие сульфгидрильную группу. Например аминокислота цистин интенсифицируют деятельность ферментов. Ингибиторы — соли тяжелых металлов (свинца, ртути), трихлоруксусная кислота, танин. Они осаждают любой фермент и дают вместе с белками нерастворимые осадки.

Различия в ферментном составе используют для идентификации бактерий, поскольку они обуславливают различные биохимические свойства бактерий: сахаролитические (расщепление сахаров), протеолитические (разложение белков), гемолитические (лизис эритроци-

тов), редуцирующие (окисление или восстановление тех или иных соединений) и др.

Ферменты микробов используют в генной инженерии. С их помощью получают уксусную, молочную, лимонную и другие кислоты. Кроме того, ферменты применяют в приготовлении молочных продуктов (сыр, ацидофилин, кумыс, кефир и др.), в виноделии, пивоварении, хлебопечении, силосовании кормов для животных.

4.6. Основные принципы культивирования микробов

В лабораторных условиях микроорганизмы выращивают на питательных средах, которые должны быть стерильными, прозрачными, влажными, содержать определенные питательные вещества (белки, углеводы, витамины, микроэлементы и др.), обладать определенной буферностью, иметь соответствующую рН (реакция среды обуславливается содержанием в ней H^+ и OH^- ионов. Наиболее благоприятной для большинства бактерий является нейтральная или слабощелочная реакция – рН 7,0–7,6), окислительно-восстановительный потенциал питательной среды (соотношение веществ, отдающих и принимающих электроны). Величину окислительно-восстановительного потенциала обозначают символом gH_2 – отрицательный логарифм парциального давления газообразного водорода. Он измеряется потенциометром (в милливольтх) или на универсальном ионометре (от 0 до 42,6). Строгие анаэробы растут при 0 до 12, факультативные – при 0 до 20 и аэробы – от 14 до 35.

Питательные среды классифицируют:

а) *по происхождению* на:

естественные – молоко, сыворотка крови, картофель и др.;
искусственные – мясо-пептонный бульон (МПБ), МПА;
синтетические, состоящие из набора химически чистых

веществ: аминокислот, углеводов, солей, витаминов (например, среда Ван Итерсона, Сабуро);

б) *по консистенции* на:

жидкие – МПБ, молоко;
полужидкие – среды, содержащие 0,15–0,5 % агар-агара;
плотные – среды, содержащие 2–3 % агар-агара (МПА, агары Эндо, Плоскирева, Левина и др.) или 10–20 % желатина (МПЖ);

сухие, выпускаемые промышленным способом в виде порошков;

в) по назначению на:

простые (обычные), служащие для культивирования многих видов патогенных и непатогенных бактерий (МПБ, МПА);

специальные, используемые для культивирования микробов, не размножающихся на простых средах (МППБ, Сабуро);

элективные (избирательные) среды и среды обогащения, благоприятствующие размножению бактерий определенных видов и подавляющие рост других микробов (Петраньяни, Гельберга, селенитовый бульон);

дифференциально-диагностические, применяемые для дифференциации микробов по их ферментативной активности (среды Гисса, агар Эндо).

Для длительного хранения микробов применяют среды с глицерином, мелом и др.

Культивирование микроорганизмов производят в аэробных, анаэробных или микроаэрофильных условиях, что зависит от вида изучаемого микроорганизма. Культивируют микробы при определенном температурном режиме (для плесневых грибов — 15–25 °С, для большинства сапротрофов — 25–30, а для патогенных — 35–37 °С), определенное время (чаще 24 ч) и при отсутствии света, в термостатах.

Изучение характера роста патогенных микроорганизмов на питательных средах имеет определенное диагностическое значение.

При выращивании бактерий на жидкой питательной среде наблюдается придонный, диффузный или поверхностный (в виде пленки) рост культуры.

Бактерии, растущие на плотных питательных средах, образуют инкутированные колонии различной величины, округлой формы с ровными или неровными краями (S- и R-формы), консистенции и цвета, различающиеся также по характеру поверхности, рельефа, прозрачности.

Микроорганизмы в процессе жизнедеятельности синтезируют различные вещества — пигменты, придающие колониям разнообразный цвет и оттенки, что учитывается при дифференциации микроорганизмов. Пигменты бактерий представлены различными веществами — каротиноидами, феназиновыми производными, пирролами, птоцианами и др. Пигменты бактерий — вторичные метаболиты,

т. е. они не являются веществами, обязательно присутствующими у всех бактерий. Например, даже внутри одного вида *Serratia marcescens* есть пигментообразующие и беспигментные штаммы. Бактерии этого вида называют «чудесной палочкой» (или «палочкой чудесной крови») из-за ярко-красного пигмента продигиозина, который они синтезируют. Различают пигменты, растворимые в воде (у псевдомонад — пиоцианин, окрашивающий питательную среду в сине-зеленый цвет; флюоресцин (пиовердин) — в желто-зеленый; пиорубин — в красно-вишневый и пиомеланин — в темно-коричневый цвет), в спирте (пигменты стафилококков, сарцин, микобактерий — желтый, красный, золотистый, лимонно-желтый, желтый, оранжевый) и нерастворимые ни в воде, ни в спирте (черные пигменты дрожжей, грибов, азотобактера), выделяющиеся в окружающую среду (хромонарные), остающиеся в теле микроорганизмов (хромофорные).

Способность к пигментообразованию выражена у видов *Sarcina*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и др. Образование пигментов происходит в присутствии кислорода при комнатной температуре и слабом освещении. Данный признак генетически детерминирован, поэтому его используют в качестве дифференцирующего критерия.

Пигменты защищают бактерии от действия видимого света и УФ-лучей. Мутанты, лишенные способности к пигментообразованию, быстро погибают на свету. Искусственно окрашенные бактерии (например, метиленовым синим) также проявляют повышенную лабильность к инсоляции. Бактерицидное действие солнечного света проявляется в присутствии кислорода и обусловлено фотоокислением. При этом клеточные пигменты (флавины и цитохромы) действуют как катализаторы. Каротиноиды ингибируют этот процесс. У некоторых бактерий образование пигментов происходит только на свету (например, каротиноидов у туберкулезной палочки).

Многие пигменты проявляют антибиотические свойства. Между пигментацией и образованием вторичных метаболитов существует такая тесная корреляция, что при наличии пигментов можно с большей долей вероятности ожидать образования антибиотиков и других биологически активных веществ.



В естественной среде обитания и в случае искусственного культивирования микроорганизмов на них оказывают влияние многочисленные факторы, которые условно разделяют на: физические; химические и биологические.

Физические, химические и биологические факторы окружающей среды оказывают различное воздействие на микроорганизмы: бактерицидное, приводящее к гибели клетки; бактериостатическое — подавляющее рост и размножение микроорганизмов; мутагенное — вызывающее изменение наследственных свойств микробов.

5.1. Влияние физических факторов на микроорганизмы

К физическим факторам относят температуру, замораживание, высушивание, давление, различные виды излучений, аэрилизацию, ультразвук, электричество.

Температура. Микроорганизмы лишены механизмов, регулирующих температуру тела, поэтому их существование определяется температурой окружающей среды. Для каждого вида микроорганизмов существует минимальная температура, ниже которой их рост не наблюдается, оптимальная — при которой микроорганизмы растут с наибольшей скоростью и максимальная — выше которой роста не происходит. Данные три температурные точки называют кардинальными. Они весьма характерны для определенных видов и даже штаммов бактерий.

Микроорганизмы по их адаптации к определенным температурным условиям разделяют на несколько групп.

Психрофилы (от гр. *psichros* — холодный, *phileo* — люблю) — микроорганизмы, для которых температурный минимум составляет 0 °С, оптимум — 15–20, максимум — 30–35 °С. Эти бактерии являются обитателями холодных районов земного шара, горных ледников, пещер, воды колодцев и родников, сточных вод.

Согласно современным представлениям психрофилы могут развиваться при низкой температуре благодаря следующим особенностям:

клетки содержат ферменты, имеющие низкую температуру активации и способны эффективно функционировать при низкой температуре; при температуре выше 30 °С ферменты психрофилов прекращают свою деятельность;

проницаемость мембран психрофилов является невысокой в связи с содержанием в них большого количества жирных кислот и поэтому мембраны не замерзают;

психрофилы не утрачивают способности образовывать полисомы при низкой температуре.

Для психрофилов характерны очень длительная лаг-фаза и небольшая скорость роста. Они могут вызывать порчу продуктов в холодильниках, погребах, ледниках. К психрофилам относятся светящиеся бактерии, некоторые железобактерии, иерсинии, псевдомонады, возбудители паратуберкулеза.

Мезофиллы (от гр. *mesos* — средний, *phileo* — люблю) — микробы, для которых температурный минимум составляет 10 °С, оптимум — 30–38 °С, максимум — 40–45 °С. К мезофиллам относят большинство сапротрофов, условно-патогенных и патогенных микробов. Например, сальмонеллы, эшерихии, возбудитель сибирской язвы и др.

Термофилы (от гр. *termos* — теплый, *phileo* — люблю) — теплолюбивые микроорганизмы, для которых температурный минимум составляет 35 °С, оптимум — 50–60, максимум — 70–75 °С. Средой их обитания могут быть пищеварительный тракт животных, почвы районов с жарким климатом, горячие источники. Термофилов обнаруживают во всех широтах. Развиваются они очень быстро. Эти микробы участвуют в процессах самонагревания навоза, мусора, зерна, комбикорма, сена. Термофилов, вырабатывающих тепло, принято называть термогенными. Под их влиянием происходит самонагревание в основном растительной массы и выделение большого количества тепла. Тепло образуется вследствие разложения органических веществ, при этом выделяются горючие газы метан и водород, что часто приводит к самовозгоранию разлагающихся масс.

Для экстремально-термофильных бактерий температурный минимум колеблется в пределах 25–30 °С, оптимум – 50–60, максимум –80–93 °С.

Возможность существования термофилов при высокой температуре объясняют:

высоким содержанием в клеточных мембранах длинноцепочечных C_{17} – C_{19} насыщенных жирных кислот с разветвленными цепями; высокой термостабильностью белков и ферментов; термостабильностью клеточных структур.

Постоянное место обитания термофильных бактерий – термальные (горячие) источники. В таких источниках могут развиваться эубактерии и архебактерии, аэробные и анаэробные, фототрофные, хемолитотрофные и гетеротрофные микроорганизмы, цианобактерии.

Замораживание. При воздействии на микробы низкой температуры они переходят в состояние анабиоза, в котором бактерии могут оставаться жизнеспособными в течение нескольких месяцев и даже лет. Например, листерии остаются жизнеспособными при –10 °С в течение трех лет. Микробы могут переносить температуру до –190 °С и даже –252 °С. Наибольшую опасность при замораживании представляет не сама низкая температура, а кристаллы льда внутри клетки, которые могут повредить ее механически. Низкая температура прерывает действие гнилостных и бродильных процессов. Недаром продукты хранят в холодильниках, погребах, ледниках.

При промышленном производстве живых вакцин применяют метод, который получил название лиофилизация (от гр. *lyo* – растворять, *phileo* – люблю). При лиофилизации вода подвергается замораживанию, а затем происходит сублимация льда – переход его из твердого в парообразное состояние, жидкая фаза выпадает.

Губительно действует на микробы высокая температура. В основном бактерицидного действия высокой температуры лежат угнетение ферментов, денатурация белков, нарушение осмотического барьера. Воздействие высокой температуры является основой многих методов термической стерилизации. Под термином стерилизация понимают мероприятие, направленное на полное уничтожение всех микробов в стерилизуемом материале (биоматериал от павших или убитых с диагностической целью животных, лабораторная посуда, питательные среды, использованные микробные культуры и др.). Известны различные способы стерилизации:

- прокаливание на огне;
- кипячение;

стерилизация сухим жаром;
стерилизация текучим паром;
стерилизация паром под давлением (автоклавирование);
тиндализация;
пастеризация.

Высушивание. Отрицательно влияет на микробы обезвоживание. В высушенном состоянии они не могут расти и размножаться. Клетки переходят в анабиотическое состояние. Наиболее чувствительны к высушиванию вегетативные формы микробов, особенно патогенные. Споровые формы микробов в высушенном состоянии не теряют своей жизнеспособности многие годы. Высушивание под вакуумом из замороженного состояния — лиофилизацию — используют для получения ценных производственных и музейных штаммов культур микробов в сухом виде, что позволяет хранить их без потери жизнеспособности и биологических свойств в течение длительного срока (годами). Высушивание применяют для консервирования овощей, фруктов, лекарственных трав, кормов.

Давление. Большое влияние на микроорганизмы оказывает гидростатическое и осмотическое давление. Бактерии, устойчивые к высокому давлению, называют *барофильными* (от гр. *baros* — тяжесть, *phileo* — люблю). На дне Тихого и Индийского океанов обитают бактерии, которые выдерживают давление до 1160 кг/см^2 . Большинство микробов при давлении выше $500 \cdot 10^4 \text{ Па}$ погибают, так как давление вызывает денатурацию белков, инактивацию ферментов, повышает диссоциацию. Повышенное давление в сочетании с высокой температурой используют в автоклавах с целью стерилизации различных материалов и лабораторной посуды.

Осмотическое давление определяется концентрацией растворенных в среде веществ. Оно играет важную роль в процессе питания. Бактерии питаются путем осмоса и диффузии. Осмотическое давление внутри клетки равно примерно давлению 10–20%-го раствора сахаразы. В среде с низким осмотическим давлением вода поступает в клетку и наступает ее разрыв — *плазмолитиз*. В среде с высоким осмотическим давлением вода покидает клетку и происходит ее гибель — *плазмолиз*. Существуют микробы, способные расти и размножаться при высокой концентрации солей в среде, — *галофилы* (любящие соль). Например, микрококки, сарцины, стафилококки. Их ферменты активны при повышенном содержании соли.

Излучение. Различные виды излучений действуют на микробы бактерицидно. Степень бактерицидности зависит от вида излучения,

его дозы, длительности (экспозиции) воздействия на микроорганизмы. К излучениям относят видимый свет; инфракрасные лучи; ионизирующая радиация; ультрафиолетовые лучи.

Видимый свет отрицательно действует на микроорганизмы, поэтому культивирование микробов на питательных средах проводят в полной темноте в термостатах. Прямые солнечные лучи губительно действуют на все виды микробов, за исключением пурпурных и зеленых серобактерий. Свет вызывает образование в клетке гидроксильных радикалов, которые и являются причиной ее гибели.

Более устойчивы к видимому свету сапротрофы, так как они эволюционно адаптированы к нему. Патогенные микробы весьма чувствительны к свету, что имеет гигиеническое значение.

Ультрафиолетовые лучи высокобактерицидны, они подавляют репликацию ДНК и РНК. В качестве источника ультрафиолетовых лучей служат ртутно-кварцевые (ПРК) и бактерицидные (БУВ) лампы. Ультрафиолетовые лучи используют для санации воздуха в животноводческих помещениях, стерилизации боксов в биологической промышленности, медучреждениях, ветлабораториях, научно-исследовательских институтах.

Ионизирующая радиация – радиоактивные гамма- и рентгеновские лучи применяют для уничтожения микробов на инструментах, в перевязочном материале, биопрепаратах и др. В отличие от УФ-лучей, ионизирующая радиация действует на биополимеры не прямо, а опосредованно, вызывая образование свободных радикалов и органических перекисей, которые затем реагируют с нуклеиновыми кислотами и белками, вызывая разрывы цепей ДНК, изменения азотистых оснований, окисление сульфгидрильных групп белков и т. д. Чувствительность микроорганизмов к ионизирующей радиации проявляется в различной степени. Например, *Cl. botulinum* сохраняет жизнеспособность при дозе 1,5 Мрад, *E. coli* – только 0,18 Мрад. Наиболее устойчивой является бактерия *Deinococcus radiodurans*, которая обитает в водах атомных реакторов, встречается в залежах урановых руд. Тем не менее ионизирующая радиация применяется для стерилизации значительно реже, так как стерилизуемые объекты надо располагать в непосредственной близости от источника излучения.

Ультразвук. Механические колебания с частотами более 20 000 колебаний в секунду (20 кГц) называются *ультразвуком*. Колебания такой частоты находятся за пределами слышимости человека. Ультразвуковые волны могут распространяться в твердых, жидких и газовых

средах. Обладают большой механической энергией и вызывают ряд физических, химических и биологических явлений. Механизм бактерицидного действия ультразвука объясняется двумя теориями: кавитационно-механической и кавитационно-электрохимической. Согласно первой теории ультразвуковые волны, распространяясь в упругой среде, вызывают в ней попеременные сжатия и разрежения. В клетке создаются огромные давления, достигающие десятков и сотен мегапаскалей, что вызывает механическое разрушение цитоплазматических структур и гибель клетки (кавитация).

Кавитационная электрохимическая теория объясняет ионизацию паров жидкостей и присутствующих в ней газов при образовании кавитационного пузырька. При разрыве пузырька происходит электрический разряд, сопровождающийся резким повышением температуры и образованием в кавитационной полости электрического поля высокого напряжения. При этом пары жидкости и высокомолекулярные соединения в кавитационной полости расщепляются на водород и гидроксильную группу с образованием активного кислорода, водорода пероксида, азотистой и азотной кислот, в результате чего происходят инактивация ферментов и коагуляция белков. Все это обуславливает гибель микробной клетки.

Эффективность действия УЗ при одной и той же интенсивности и частоте колебаний зависит от продолжительности воздействия, химического состава облучаемой среды, ее вязкости, температуры, pH и исходной степени обсемененности микроорганизмами. Чем больше микроорганизмов, тем продолжительнее должно быть воздействие для достижения стерилизующего эффекта.

Устойчивость микроорганизмов к действию ультразвука зависит от их биологических свойств. Вегетативные клетки более чувствительны, чем споры, кокковые формы погибают медленнее, чем палочковидные. Более крупные клетки микроорганизмов отмирают быстрее, чем мелкие. Ультразвук применяют для стерилизации пищевых продуктов (молоко, фруктовые соки, вина), изготовления вакцин, мойки и стерилизации стеклянной тары, а также для извлечения внутриклеточных ферментов, токсинов, витаминов, нуклеиновых кислот и других компонентов клетки. Ведутся исследования по применению УЗ энергии для стерилизации питьевой воды.

Электроток ультравысокой частоты приводит в колебание молекулы всех ингредиентов клетки, происходит нагревание всей массы микробов, наблюдаются необратимые деструктивные изменения, что вызывает гибель микробов.

Высокочастотные колебания (ультразвук) вызывают образование внутри бактерий пены, состоящей из мельчайших пузырьков газа. В пузырьках возникает высокое давление, что приводит к дезинтеграции цитоплазматических структур и гибели клетки.

Аэрионизация. Аэроионы могут нести положительный или отрицательный заряд. Они возникают в результате искусственной или естественной ионизации воздуха. Наибольшее влияние на бактерии оказывают отрицательно заряженные ионы. Сила действия ионов зависит от дозы (количества аэрогенов на 1 см^3 воздуха), длительности экспозиции, расстояния от источника ионов.

5.2. Действие химических веществ

Микробы, как и все живые существа, высокочувствительны к факторам внешней среды, обладают раздражимостью, т. е. ответной реакцией клетки на воздействие различного рода раздражителей. Реакция подвижных бактерий на химические вещества и их соединения получила название *хемотаксиса*. Движение бактерий в сторону веществ, благоприятно действующих на них (мясной экстракт, пептон), называется положительным хемотаксисом, а от веществ, неблагоприятно действующих на микробные клетки (кислоты, щелочи, красители и др.), — отрицательным хемотаксисом.

Химические вещества могут действовать на микробную клетку бактериостатически, т. е. вызывать задержку развития и роста или же бактерицидно — вызывать гибель клетки.

Химические вещества могут различным образом влиять на бактерии: повреждать клеточную стенку (мыло, жирные кислоты); повреждать оболочку и белки клетки (фенол); денатурировать белки (формалин); инактивировать ферменты клетки (соли тяжелых металлов).

По механизму действия и своему строению химические вещества, обладающие противомикробной активностью, можно подразделить на несколько групп.

Поверхностно-активные вещества (жирные кислоты, мыла и прочие детергенты) вызывают снижение поверхностного натяжения, что приводит к нарушению функционирования клеточной стенки и цитоплазматической мембраны микроорганизмов.

Красители (бриллиантовый зеленый, риванол и др.) обладают свойством задерживать рост бактерий. Растворы ряда красителей применяют

в качестве антисептических средств, а также вводят в состав некоторых питательных сред для угнетения роста сопутствующей микрофлоры.

Спирты свертывают белки микробной клетки.

Кислоты изменяют концентрацию H^+ -ионов, коагулируют белки. Применяют как средства уничтожения микробов (карболовая, серная, соляная) и для консервирования продуктов (уксусная, лимонная).

Щелочи гидролизуют коллоидные системы, вследствие чего микробная клетка гибнет.

Фенол и его производные вызывают коагуляцию микробных белков. Они используются для дезинфекции заразного материала в микробиологической практике и инфекционных больницах.

Соли тяжелых металлов (ртуть, свинец, цинк, золото и др.) коагулируют белки микробной клетки, вызывая их гибель. Ряд металлов (серебро, золото, ртуть и др.) оказывают бактерицидное действие на микроорганизмы в ничтожно малых концентрациях. Это свойство получило название олигодинамического действия (от лат. *oligos* – малый, *dinamu* – сила). Доказано, что вода, находящаяся в сосудах из серебра, не загнивает благодаря бактерицидному действию ионов серебра. Для профилактики бленнореи (воспаление конъюнктивы глаза, вызванное гонококками) новорожденных долгое время служил 1%-й раствор нитрата серебра. Коллоидные растворы органических соединений серебра (протаргол, колларгол) используют также в виде местных антисептических средств.

Сильным антимикробным действием обладают препараты ртути. Издавна для дезинфекции применяли ртуть бихлорид, или сулему (в разведении 1:1000). Однако она оказывает токсическое действие на ткани макроорганизма и использование ее ограничено.

Окислители, взаимодействуя с микробными белками, нарушают деятельность ферментов, вызывают денатурацию белков. Активными окислителями являются хлор, озон, которые используют для обеззараживания питьевой воды. Хлорпроизводные вещества (хлорная известь, хлорамин) широко употребляют в целях дезинфекции. Окисляющими свойствами обладают водорода пероксид, калия перманганат, иод и др.

Альдегиды в основном убивают вегетативные и споровые формы микроорганизмов. Из их числа чаще используются формальдегид в виде 40%-го раствора (формалин) для дезинфекции. Формалин блокирует аминокислотные группы белков микробной клетки и вызывает их денатурацию.

Действие химических веществ на микроорганизмы зависит от природы вещества, физико-химического состава среды, concentra-

нии, продолжительности контакта бактерий с химическими веществами, температуры, при которой происходит воздействие вещества на микробы. При повышении температуры раствора до 60–70 °С действие химических веществ на микробы усиливается.

Имеет значение и характер материала, в котором необходимо уничтожить микробов. В навозе, трупях животных, гное микробы менее доступны, и для их обеззараживания следует длительно воздействовать высококонцентрированными растворами химических веществ.

Антимикробное действие химических веществ лежит в основе дезинфекции – мероприятия, направленного на уничтожение патогенных микробов определенного вида. В отличие от стерилизации при дезинфекции не происходит уничтожения всех видов – многие сапрофиты нечувствительны к тому или иному дезинфектанту и сохраняют жизнеспособность. Для уничтожения вегетативных форм бактерий наиболее часто применяют 5%-й раствор фенола, лизола или хлорамин-а, 10–20%-й раствор негашеной извести, 2%-й раствор формальдегида, 4%-й горячий раствор натрия гидроксида, вызывающие их гибель в среднем через 1–2 ч. Споры бацилл погибают при воздействии 3%-го раствора формальдегида, 20%-го раствора хлорной извести, 5%-го раствора фенола в течение 10–24 ч.

В некоторых случаях химические средства применяют в виде аэрозоля или газообразного вещества.

5.3. Действие биологических факторов

В природных условиях микробы существуют в разнообразных ассоциациях, которые создаются в результате различных взаимовлияний. Это взаимовлияние проявляется либо в форме антагонизма, т. е. уничтожения одного вида другим, либо в форме симбиоза, т. е. благоприятного сожительства.

К биологическим факторам относят антибиотики, бактериоцины и бактериофаги.

Антибиотики (*anti* – против, *bios* – жизнь) вещества микробного, животного и растительного происхождения, подавляющие развитие и биохимическую активность чувствительных к ним микробов.

По происхождению антибиотики делят на:

- 1) образуемые грибами;
- 2) продуцируемые актиномицетами;

- 3) бактериального происхождения;
- 4) животного происхождения;
- 5) растительного происхождения;
- 6) синтетические, полученные искусственно путем биосинтеза.

Большая часть антибиотиков имеет природное происхождение, и их основным продуцентом являются микроорганизмы. Микроорганизмы, находясь в своей естественной среде обитания (в основном в почве), образуют антибиотики в качестве средства борьбы за существование с себе подобными.

Наиболее активными продуцентами антибиотиков являются плесневые грибы и актиномицеты.

В 1871–1872 гг. В. А. Манасеин и А. Г. Полотебнев установили, что плесень из рода *Penicillium* оказывает лечебное действие при гнойных язвах.

В Англии в 1929 г. А. Флеминг заметил, что случайно выросшая в чашках Петри плесень угнетала рост стафилококков. Было ясно, что плесень выделяет вещество, угнетающее рост стафилококка. В чистом виде оно было выделено английскими химиками Э. Чейном, Г. Флори, Э. Эбрахемом в 1940 г. В СССР пенициллин был получен в 1942 г. З. В. Ермольевой.

Пенициллин могут вырабатывать многие виды *Penicillium* (*P. notatum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans*, *P. turbatum*, *P. steckii*, *P. corylophilurri*), а также некоторые виды *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. flavipes*, *A. janus*, *A. nidulans* и др.). Есть сведения, что пенициллин образуется и термофильным организмом *Malbranchea pulchella*.

К антибиотикам грибного происхождения также относят продуцируемый плесенью рода *Aspergillus* фумигацин и аспергиллин, рода *Mucor* – клавицин, грибами *C. acremonium* из рода *Cephalosporium* – цефалоспорин и др.

К группе антибиотиков, продуцируемых актиномицетами (например, род *Streptomyces*), относят стрептомицин, левомицетин, эритромицин, нистатин, неомицин, канамицин, тетрациклин, хлортетрациклин, тилозин, тобрамицин, новобиоцин и др. Около 80 % антибиотиков получено из актиномицетов.

Группа антибиотиков, продуцируемых бактериями, менее обширна, чем группа грибного и актиномицетного происхождения. Способностью продуцировать антибиотики обладают в большинстве своем сапротрофные бактерии, обитающие в почве. К данной группе отно-

сят колицин, грамицидин, пиоцианин, субтилин, полимиксин. Некоторые из этих антибиотиков токсичны при парэнтеральном введении и применяются местно.

К антибиотикам животного происхождения относят вещества, образуемые тканями животных: эритрин, выделяемый из эритроцитов некоторых животных; экмолин, полученный из тканей рыб; лизоцим.

Растения выделяют вещества, называемые фитонцидами. Они открыты в 1928 г. Б. Н. Токиным. Фитонциды могут выделять лук, чеснок, хрен, горчица, алоэ, крапива, можжевельник, почки березы, листья черемухи и др. Их антимикробное действие обусловлено эфирными маслами, органическими кислотами, смолами и др. Некоторые фитонциды получены в чистом виде: аллицин — из чеснока, рафанин — из семян редиски, иманин — из зверобоя. Такие антибиотические вещества, как лишенин и усниновая кислота вырабатываются лишайниками.

В основе механизма действия антибиотиков лежит нарушение синтеза клеточной стенки, ДНК, РНК, белка.

Антибиотики могут оказывать на микроорганизмы бактерицидное или бактериостатическое действие. Данное свойство зависит от вида антибиотика, его концентрации, чувствительности микроорганизма к нему и других факторов.

Бактерицидный эффект предполагает разрушение бактерий. В обычных дозах таким эффектом обладают все антибиотики, блокирующие рост клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины). По отношению к грибам им обладают антибиотики типа нистатина или деворина (фунгицидный эффект). Бактериостатический эффект предполагает замедление роста и размножения бактерий под действием антибиотиков. Бактериостатическим действием обладают антибиотики, блокирующие синтез белков и нуклеиновых кислот (тетрациклины, макролиды и пр.). В больших дозах бактериостатический эффект данных антибиотиков может перерасти в бактерицидный.

Антибиотики обладают избирательным действием на микробы, в связи с чем их делят на антибиотики узкого и широкого спектра действия.

Необоснованное, спонтанное применение антибиотиков вместо пользы приносит вред — токсикозы, воспаление желудочно-кишечного тракта, угнетение функции кроветворных органов, дисбактериоз, кандидоз, колиты. Ко многим антибиотикам может развиваться аллергия. В связи с широким и длительным использованием антибиотиков в качестве лекарственных препаратов в природе возникли и очень рас-

пространились антибиотикоустойчивые формы микробов, в частности L-формы, являющиеся возбудителями различных инфекционных болезней.

Антибиотикорезистентность микроорганизмов может быть первичной и приобретенной. Первичная резистентность связана с отсутствием мишени у микроорганизма для действия данного антибиотика; приобретенная – с изменением мишени в результате модификаций, мутаций, рекомбинаций. В первом случае речь идет о естественной (видовой) резистентности, например у микоплазм к пенициллину из-за отсутствия у них клеточной стенки. Однако чаще всего резистентность к химиотерапевтическим препаратам, в том числе антибиотикам, приобретается микробными клетками с генами резистентности (β -гены), которые они получают в процессе своей жизнедеятельности от других клеток данной или соседней популяции. При этом наиболее эффективно и с высокой частотой β -гены передаются плазмидами и транспозонами. Один транспозон передает резистентность только к одному препарату. Плазмиды могут нести несколько транспозонов, контролирующих резистентность к разным химиотерапевтическим препаратам, в результате чего формируется множественная резистентность бактерий к различным препаратам. Устойчивость к антибиотикам бактерий, грибов и простейших также возникает в результате мутаций в хромосомных генах, контролирующих образование структурных и химических компонентов клетки, являющихся «мишенью» для действия препарата. Так, например, резистентность дрожжеподобных грибов рода *Candida* к нистатину и леворину может быть связана с мутационными изменениями цитоплазматической мембраны.

Механизмы резистентности микроорганизмов к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам сложны и разнообразны. Главным образом они объясняются следующими причинами:

- 1) превращением активной формы антибиотика в неактивную форму путем ферментативной инактивации и модификации;
- 2) утратой проницаемости клеточной стенки для определенного химиотерапевтического препарата;
- 3) нарушениями в системе специфического транспорта данного препарата в бактериальную клетку;
- 4) возникновением у микроорганизмов альтернативного пути образования жизненно важного метаболита, заменяющего основной путь, блокированный препаратом.

Предварительное определение чувствительности микроорганизмов позволяет выбрать наиболее активный антибиотик и затем использовать его как лечебный препарат. Определение чувствительности микробов к антибиотикам проводят методом диффузии в агар или методом серийных разведений.

Бактериоцины синтезируются представителями всех семейств и называются по виду бактерий – колицины, синтезируются *E. coli*, туберкулоцины – синтезируются *Myc. tuberculosis*. Эти вещества угнетают рост и развитие филогенетически родственных бактерий.

Бактериофаги – вирусы, способные поражать бактериальную клетку.

Впервые лизис бактерий под воздействием неизвестного фактора описал Н. Ф. Гамалея в 1898 г. Затем более подробно закономерности лизиса бактерий (стафилококков) были описаны Ф. Твортом в 1915 г.

В 1917 г. Ф. Д. Эррель выделил из испражнений человека, выздоравливающего от дизентерии, особый агент, проходящий через бактериальные фильтры и лизирующий бульонные культуры возбудителя дизентерии (*B. schiga*). Он утверждал, что фаг – живое существо, которое было названо бактериофагом (от гр. *phagos* – пожирающий), а феномен лизиса культуры – бактериофагией.

Современное название бактериофагов – вирусы бактерий. Бактериофаги широко распространены в природе. Их обнаруживают в почве, воде, экскрементах больных и здоровых животных, человека.

Бактериофаги обнаружены более чем у 100 видов бактерий. Их хозяевами являются эшерихии, сальмонеллы, стафилококки, стрептококки, микобактерии, листерии, коринебактерии и др.

Размеры бактериофагов, как и других вирусов, невелики – 8–100 нм. Их форма напоминает сперматозоид – от округлой или многогранной головки отходит хвостовой отросток различной длины. Однако иногда встречаются фаги, лишенные отростка. Бактериофаг – неклеточное образование. У него нет оболочки, ядра, цитоплазмы, т. е. элементов, присущих клетке. Он состоит из молекулы нуклеиновой кислоты (чаще ДНК, реже РНК) и окружающего ее белкового чехла (рис. 5.1, а, б). Белковая оболочка головки называется капсидом. Морфологические субъединицы капсида получили название капсомеров. Нуклеиновая кислота (40–50 %) находится внутри головки, белковый чехол (50–60 %) покрывает как головку, так и хвостовой отросток, на конце ко-

того имеются специальные волокна, облегчающие прикрепление фага к оболочке микробов. Липиды и ферменты в фаговой частице находятся в минимальных количествах — около 2 %.

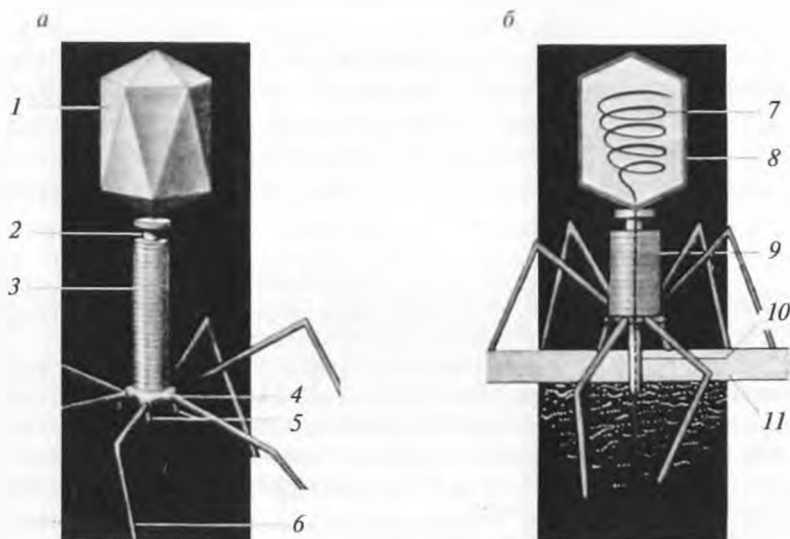


Рис. 5.1. Схема анатомического строения Т4 колифага: а — общий вид; б — фаг, инъецирующий свою ДНК в бактериальную клетку; 1 — головка; 2 — шейка; 3 — отросток; 4 — базальная пластинка; 5 — зубцы; 6 — нити; 7 — ДНК фага; 8 — капсид; 9 — чехол отростка (сократившийся); 10 — внутренний стержень; 11 — клеточная стенка бактерии

Бактериофаги обладают антигенностью, иммуногенностью, специфичностью. В зависимости от взаимодействия фага с клеткой различают вирулентные и умеренные фаги.

Вирулентные фаги проникают в клетку и вызывают ее лизис. Умеренные не вызывают лизиса клетки, но клетка становится носителем бактериофага. Такое явление носит название лизогении, а бактериальные культуры называются лизогенными. При лизогении бактериофаг находится в состоянии профага, при котором бактериальная клетка не погибает.

В ветеринарной практике фаги применяют для терапии, профилактики и диагностики многих инфекционных болезней (сальмонеллез, в том числе пуллороз, колибактериоз).



6.1. Понятие о генетике, краткая история ее развития

Генетика (от гр. *geneticos* – относящийся к происхождению) – наука о наследственности и изменчивости. Она изучает материальные основы наследственности, типы размножения организмов, роль белков в жизненных процессах клетки, биологический синтез белка, генетические основы индивидуального развития, мутационные процессы, изменчивость организмов и т. д. Генетика разрабатывает методы управления наследственностью и изменчивостью с целью получения нужных человеку форм растений, животных, микроорганизмов, предлагает приемы направленного воздействия на индивидуальное развитие организмов.

Являясь одной из ведущих наук современной биологии, генетика, с одной стороны, тесно связана с точными науками, зависит от их принципов и методов исследований, а с другой – в ней самой идет необычайно быстрый процесс дифференциации и превращения отдельных разделов в самостоятельные науки. Так, наряду с общей генетикой возникли генетика растений, генетика животных, генетика человека, цитогенетика, генетика микроорганизмов, математическая генетика, генетика поведения и т. д.

Считают, что органическая жизнь на Земле возникла 3,5 млрд лет тому назад. Первую попытку объяснить историю органической природы сделал Ж. Л. Бюффон (1707–1788). Затем изучением наследственности и изменчивости занимался Ж. Б. Ламарк (1744–1829). Он предложил первую эволюционную теорию и пытался ее доказать.

Большое влияние на возникновение и формирование генетики как науки оказали работы Ч. Дарвина (1809–1882). Он показал, что в основе эволюции лежит

действие изменчивости, наследственности и отбора. Дарвин изложил свою теорию в труде «Происхождение видов путем естественного отбора при сохранении благоприятствуемых пород в борьбе за жизнь» (1829). Дарвин выдвинул так называемую «временную гипотезу пангенезиса», сущность которой сводилась к тому, что в половые клетки стекаются со всех органов и тканей тела особые зачатки — «геммулы», которые и являются представителями определенных частей организма. Однако наблюдения, опыты, практика этого не подтвердили. Тем не менее догадка Дарвина содержала ценные мысли. Он представлял наследственность в виде отдельных элементов, корпускул, существующих отдельно друг от друга. По мнению Дарвина, некоторые «геммулы» могут быть в скрытом состоянии и проявляться в следующих поколениях. Эти представления ученого подтверждаются современной генетикой.

Однако основоположником генетики все-таки считают Грегора Иоганна Менделя (1822—1884). В 1865 г. в обществе естествоиспытателей г. Брно (бывшая Чехословакия) он доложил результаты своих опытов над растительными гибридами. Г. Мендель показал, что наследственность дискретна (делима). Отдельные признаки развиваются на основе материальных наследственных факторов и могут наследоваться независимо друг от друга. В книге «Опыты над растительными гибридами» (1866) ученый изложил результаты своих экспериментов и открытые им законы наследования — закон доминирования, закон расщепления признаков в потомстве и закон независимого распределения наследственных факторов при расщеплении. Данные законы переоткрыли в 1900 г. три ботаника — голландец Г. Де Фриз, немец К. Корренс, австриец Ф. Чермак. Именно 1900 г. считается официальной датой рождения генетики. Это название науке о наследственности и изменчивости было дано в 1906 г. английским генетиком В. Бэтсоном.

В истории развития генетики выделяют *три этапа*. Первый этап связан с подтверждением открытий Г. Менделя. Датируется этот этап с 1900 по 1925 г. В это время было доказано, что законы наследственности едины для всего органического мира, в том числе и для микроорганизмов. Датский генетик В. Иоганнсен ввел в генетику такие понятия, как ген, генотип, фенотип (1909).

Второй этап (1925—1953) связан с установлением материальных основ наследственности. Была обоснована хромосомная теория наследственности и установлено, что наследственные факторы находятся в хромосомах и расположены в них в линейном порядке. В 1944 г.

О. Эвери доказал, что материальным носителем наследственности являются не белковые компоненты хромосомы, а ее ДНК.

Третий этап в истории развития генетики начинается с 1953 г. Английский ученый Ф. Крик и американский Дж. Уотсон создали модель строения ДНК. В последующие годы были выявлены мутации, изучен механизм синтеза ДНК и РНК, установлена молекулярная структура нуклеиновых кислот и их значение в передаче генетической информации, открыт механизм синтеза белка, расшифрован генетический код и выяснена его роль в жизнедеятельности организмов, более глубоко изучены структурная организация клетки и функциональная роль ее отдельных компонентов.

6.2. Генетика микроорганизмов и ее значение

Генетика микроорганизмов – это наука о наследственности микроорганизмов, их наследуемой и ненаследуемой изменчивости. Она изучает организацию различных структур микробной клетки и их функционирование, цитологические и биохимические основы наследственности, мутагены различной природы, фенотипическую и генотипическую изменчивость, внехромосомные генетические детерминанты (плазмиды), законы наследования и т. д.

Необходимо отметить, что общая генетика явилась важной основой для развития молекулярной биологии, а генетика микроорганизмов – базой для изучения многих вопросов наследственности и изменчивости, т. е. для развития самой генетики.

Датой рождения генетики микроорганизмов считают 1943 г., когда появились работы С. Лурия и М. Дельбрюка, которые показали, как следует проводить опыты с микробами, вести учет их признаков, проводить количественный анализ результатов. Микробы (бактерии, грибы, простейшие) оказались удобной моделью для проведения генетических исследований. Они были использованы как наиболее подходящий объект для изучения природы генетического материала, его организации и функционирования благодаря их особенностям.

Микробы гаплоидны, у них одна хромосома. Она представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, не связанной с белком. Большинство бактерий делятся через 20–30 мин, дают многочисленное потомство. Это позволяет уловить генетические события с частотой –

одно событие на 1 млн клеток. Микробам присущ бесполой способ размножения. Они обладают рядом хорошо регистрируемых признаков: форма, размер колоний, окраска, характер поверхности и т. д. Важным преимуществом микроорганизмов как удобного объекта для генетических исследований являются их относительно простое химическое строение, простота культивирования, возможность воздействовать на условия выращивания клеток, высокая частота мутаций, способность к комбинированной и мутационной изменчивости.

Благодаря использованию в генетических исследованиях микроорганизмов, генетика была обогащена рядом выдающихся открытий: установлена химическая природа наследственного материала, решена проблема генетического кода, изучена структура гена, расшифрован способ репликации ДНК, установлены механизм мутаций и репликаций, выявлено наличие информационной РНК и т. д. Достижения в области генетики микроорганизмов явились основой для создания генной инженерии — важнейшей прикладной отрасли во многих сферах человеческой деятельности.

Генетика микроорганизмов имеет большое практическое значение. Генетические знания позволяют сознательно, целенаправленно селекционировать микробы с заданными свойствами, изменять их биологические свойства, понижать вирулентность, получать высокоиммуногенные штаммы, создавать эффективные профилактические, лечебные и диагностические препараты.

С помощью методов генетики можно получить полезные штаммы, формы, варианты бактерий — продуцентов антибиотиков, витаминов, ферментов, гормонов, ростовых факторов, кислот, кормового белка и других ценных веществ. Генетические знания являются основой для получения рекомбинантных молекул ДНК с заданной генетической информацией и разработки способов переноса их в клетки прокариотов и эукариотов. Например, из организма человека выделены гены, синтезирующие инсулин и интерферон, а затем эти гены перенесены в геном *E. coli*. В результате бактерии стали продуцировать упомянутые вещества. Следует подчеркнуть, что возможности микробиологического синтеза весьма велики, так как время деления микробной клетки составляет 0,3–2 ч, а скорость образования биомассы в 500 раз выше, чем у растений, и в 1000 раз больше, чем у животных. Одна микробная клетка синтезирует около 100 000 молекул белка в минуту. Такой высокой производительностью не обладает ни один современный органический синтез, предложенный человеком.

Можно с уверенностью утверждать, что генетика вообще, а генетика микроорганизмов в частности является фундаментом для генетической инженерии — основы биотехнологии. *Биотехнология* — это та сфера деятельности, которая на основе изучения процессов жизнедеятельности живых организмов, главным образом клеток микроорганизмов, животных и растений, использует эти процессы и сами объекты для промышленного производства продуктов, необходимых в жизни человека, а также получения биоэффектов, ранее не встречавшихся в природе.

6.3. Строение и функции генетического аппарата

Генетический аппарат бактерий представлен молекулой ДНК, которая состоит из большого количества элементарных единиц нуклеотидов. ДНК в прокариотной клетке является аналогом ядра в эукариотической. Расположена она в центральной части цитоплазмы и называется нуклеоидом. Нуклеоид бактерий условно можно назвать хромосомой. Длина молекулы ДНК в развернутом виде может составлять более 1 мм. Элементарными единицами ДНК являются нуклеотиды. Каждый нуклеотид представляет собой соединение из фосфата, сахара и азотистого основания.

Молекула ДНК состоит из двух нитей (рис. 6.1), спирально закрученных одна вокруг другой. Ее сравнивают с винтовой лестницей. Если свернутую в спираль ДНК развернуть, то она принимает вид лестницы. Сахар и фосфат составляют основу продольных нитей, «перекладины» состоят из попарно соединенных азотистых оснований. Азотистые основания — плотные кольцевидные соединения из атомов С и N (аденин, гуанин, тимин, цитозин). Они одни и те же у всех видов организмов. ДНК разных видов различается порядком чередования указанных азотистых оснований. Последовательность четырех азотистых оснований определяет порядок расположения аминокислот в белке.

В состав белков входят 20 аминокислот. Каждой из них соответствует определенный триплет — три азотистых основания. Совокупность всех триплетов получила название генетического кода. Код одинаков у бактерий, вирусов, простейших, животных, человека, т. е. команды чередования в молекуле триплетов и в молекуле белка оказываются едиными во всем органическом мире. В этом единстве стро-

ения и функции ДНК – величайшее единство органического мира. Азотистые основания в ДНК двух типов:

- 1) двухкольцевые (пуриновые) – аденин, гуанин (1,2 нм);
- 2) однокольцевые (пиримидиновые) – тимин, цитозин (0,8 нм).

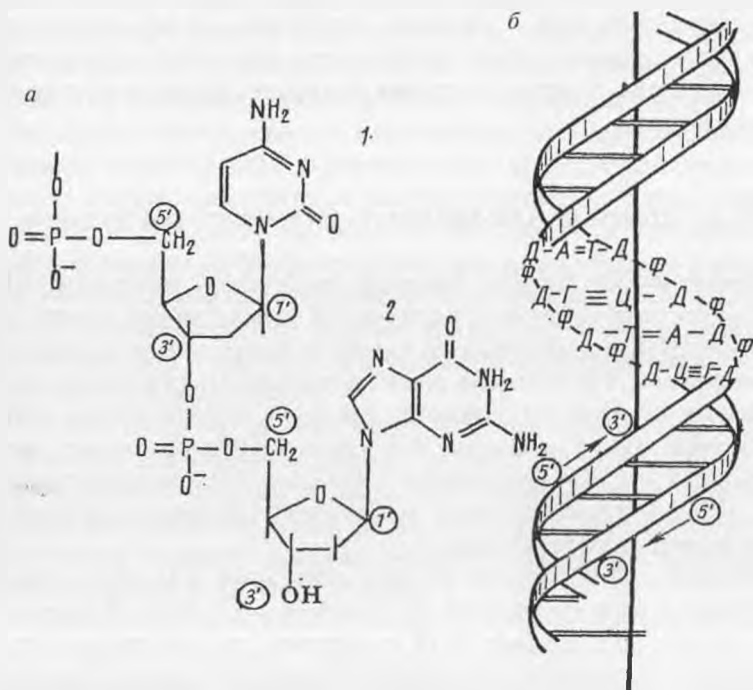


Рис. 6.1. Строение ДНК (по М. В. Гусеву и Л. А. Минееву):

a – фрагмент нити ДНК, образованной чередующимися остатками дезоксирибозы и фосфорной кислоты. К первому углеродному атому дезоксирибозы присоединено азотистое основание: 1 – цитозин; 2 – гуанин; *б* – двойная спираль ДНК: Д – дезоксирибоза; Ф – фосфат; А – аденин; Т – тимин; Г – гуанин; Ц – цитозин

Аденин комплементарен тимину, гуанин – цитозину, т. е. в молекуле ДНК аденин соединяется с тиминном, гуанин – с цитозином. Принцип комплементарности азотистых оснований в молекуле ДНК очень важен. Комплементарность азотистых оснований в молекуле ДНК представляет главную сущность молекулярных основ наследственности. Эта закономерность позволяет понять, как при делении клетки синтезируются тождественные молекулы ДНК. В результате

удвоения (редупликация или репликация) из одной молекулы ДНК возникает подобная же молекула с такой же последовательностью оснований, какая была в исходной. Если последовательность оснований определяет характер белков собаки, кошки, микроорганизма, вируса, то соответствующая наследственность может передаваться из поколения в поколение. ДНК непосредственного участия в синтезе белка не принимает. Она находится в ядре клетки, а синтез белка происходит в рибосомах – мельчайших структурах.

Для синтеза белка в рибосомы направляются точные копии генетической информации. Осуществляется это с помощью мРНК или иРНК, которая синтезируется на ДНК и точно копирует ее структуру. *Матричная*, или *информационная*, РНК несет в рибосомы информацию о составе белка. Туда же в рибосомы идет из цитоплазмы поток материала, из которого строится белок, т. е. аминокислоты. Аминокислоты попадают в рибосому несамостоятельно. Их несут к рибосомам молекулы РНК, специально приспособленные для транспорта аминокислот. Такая РНК называется *транспортной* (тРНК) и представляет собой короткие цепочки, состоящие из нескольких десятков нуклеотидов. Биосинтез белка происходит в два этапа:

1) первый – ДНК → мРНК называется транскрипцией (переписыванием);

2) второй – мРНК → белок – трансляцией (переводом).

Приблизительно 1500 нуклеотидов составляют ген средней величины. *Ген* – это участок хромосомы. Хромосома состоит из сотен генов и тысяч нуклеотидов. В генах запрограммировано проявление и развитие определенных биологических признаков. В молекуле ДНК (нуклеоиде), представляющей собой основной генетический аппарат бактерии, содержится информация обо всех белках, обеспечивающих жизнедеятельность бактериальной клетки. Некоторые бактерии имеют дополнительные генетические внехромосомные детерминанты, получившие название *плазмид*. Плазмиды представляют собой замкнутые молекулы ДНК, способные к самоподдержанию и воспроизводству. Они локализируются в цитоплазме в свободном состоянии или же соединены с основной хромосомой. В последнем случае их называют *эписомами* (*epi* – на, *при*, *soma* – тело). У бактерии наиболее изучены половой фактор (F), фактор множественной лекарственной устойчивости (R), фактор бактериоциногенности (Col), плазмиды, контролирующие у кишечной палочки синтез энтеротоксинов (Hly), плазмиды, обеспечивающие синтез поверхностных анти-

генов у эшерихий (K88, K99, F41), и др. Общим свойством для всех плазмид является то, что они придают бактериям дополнительные полезные им функции. Например, фактор F обуславливает конъюгацию у бактерий, фактор R – лекарственную устойчивость бактериальных клеток, плазмиды Col – синтез колицинов, которые подавляют рост и размножение близкородственных бактерий. Плазмиды обеспечивают определенные преимущества бактерий в естественной среде обитания, участвуя в естественном отборе и в эволюции микроорганизмов.

Кроме плазмид к генетическим образованиям относят мигрирующие элементы: транспозоны и IS-элементы. Они входят в состав хромосом, но способны переходить из хромосомы в плазмиду. Эти образования представляют собой линейные молекулы двухнитевой ДНК размером от 200 до 6000 пар нуклеотидов. Мигрирующие элементы не способны к автономной репликации. IS-элементы содержат информацию, необходимую только для ее переноса внутри клетки. Их роль в жизнедеятельности клетки до конца не выяснена. Транспозоны устроены более сложно, так как содержат некоторые гены. Выявлены транспозоны, содержащие гены, обеспечивающие устойчивость бактерий к антибиотикам, ионам тяжелых металлов.

Функции генетического аппарата бактериальной клетки:

обеспечивает передачу биологических свойств по наследству в период размножения бактерий половым или неполовым путем; отвечает за проявление инфекционных свойств бактерий; программирует синтез белка с определенными свойствами; участвует в процессе изменчивости бактерий; способствует сохранению индивидуальности вида.

Б.4. Понятие о наследственности и изменчивости

Характерными свойствами всего живого являются движение, рост, питание, дыхание, раздражимость и способность размножаться. Жизнь как особое явление характеризуется продолжительностью существования во времени. В основе непрерывного существования жизни во времени лежит способность живых систем к самовоспроизведению. Сохранение жизни в меняющихся условиях оказалось воз-

можным благодаря эволюции живых организмов в результате появления у них изменений, обеспечивающих возможность существования в новой среде обитания.

Непрерывность существования и историческое развитие живой природы обусловлено фундаментальными свойствами жизни наследственностью и изменчивостью. Наследственность и изменчивость – свойства всего живого, в том числе и микроорганизмов. Наследственность ярко выражается в сходстве потомства и родителей, братьев и сестер, в сходстве близких родственников между собой.

Каждая порода сельскохозяйственных животных характеризуется определенными, присущими ей особенностями, которые передаются из поколения в поколение в течение столетий. Еще более стойкая наследственность у многих видов диких животных. Так, по мнению Ч. Дарвина, плеченогие осьминоги неотличимы от своих предков, живших сотни миллионов лет тому назад.

Наиболее ярко выражено явление сходства у растений.

Явление сходства морфологических, биохимических и других особенностей обнаруживается и у микроорганизмов несмотря на исключительную интенсивность их размножения, роста и смены нескольких поколений за короткий промежуток времени.

Наследственность обеспечивает определенный консерватизм в организации живых систем.

В учебниках по микробиологии и иммунологии, генетике, вирусологии, биологии наследственность трактуют относительно клетки и организма. Однако необходимо иметь в виду, что она проявляется и на надорганизменных уровнях. На клеточном и организменном уровне организации живой материи под наследственностью понимают свойство клеток или организмов обеспечивать материальную и функциональную преемственность между поколениями, а также обуславливать специфический характер индивидуального развития в определенных условиях внешней среды.

Кроме термина «наследственность», генетики применяют термины «наследование» и «наследуемость».

Под *наследованием* понимают передачу наследственных признаков или информации из поколения в поколение и формирование определенных признаков, характерных для родительских особей, под *наследуемостью* – долю генетической изменчивости в общей фенотипической изменчивости признака в конкретной позиции микроорганизмов, животных, растений.

В определении «наследственность» важно подчеркнуть, что воспроизведение признаков и его материальная основа выработались в ходе эволюции и что для проявления характерных особенностей организмов необходимы определенные факторы среды.

Наследственность — это свойство организмов воспроизводить в поколениях сходный тип обмена веществ, сложившийся в процессе исторического развития вида и проявляющийся при определенных условиях внешней среды.

На популяционно-видовом уровне организации жизни наследственность проявляется в поддержании постоянного соотношения различных генетических форм в ряду поколений данной популяции. На биоценотическом уровне наследственность обеспечивает сохранение определенных соотношений видов организмов, образующих биогеоценоз.

Наследственность и изменчивость проявляются через признаки (свойства) организмов. Понятие «признак» («свойство») является единицей морфологической, физиологической или биохимической дискретности организма. *Признак* — одно из важнейших понятий в генетике. Животным присущи видовые, породные, индивидуальные признаки и свойства, которыми организмы отличаются друг от друга.

Микроорганизмы различаются между собой по морфологическим, культуральным, биохимическим, антигенным, иммуногенным и другим признакам. Например, признаком, по которому бактерии одного штамма отличаются от бактерий другого, но того же вида, является биохимическая особенность продуцировать фермент, контролирующий синтез или гидролиз определенного вещества.

Изучение передачи признака от одного поколения к последующему — главная задача генетики.

Признаки условно подразделяют на качественные и количественные. К качественным относят такие признаки проявления, которые можно охарактеризовать словесно (у животных — масть, форма рогов, ушей и др.; у микроорганизмов — форма клетки, окраска по Граму, взаиморасположение), а к количественным — признаки, которые изучают путем измерения, подсчета (у животных — масса, длина шерсти, жирность молока и т. д.; у микроорганизмов — длина и ширина бактериальной клетки, величина колоний, интенсивность роста и т. д.). Степень наследуемости количественных признаков определяется сложными математическими методами вариационной статистики.

Признаки могут быть сложными в том случае, если их формирование требует синтеза сложных специфических веществ, ферментов, сократительных, структурных и других белков. Признак считают элементарным (простым), если его появление осуществляется в результате синтеза белковой молекулы, которая зависит от последовательности нуклеотидов в ДНК конкретного гена. Признаки формируются в результате индивидуального развития особи и на их проявление влияют факторы внешней среды.

Ведущую роль в передаче признаков играют ядро клетки и в незначительной степени цитоплазма. Дело в том, что основная наследственная информация закодирована в молекулах ДНК, находящихся в хромосомах ядра клетки и только незначительная часть наследственной информации, отвечающая за некоторые признаки, может быть локализована в ДНК органоидов цитоплазмы (митохондрии, пластиды, плазмиды, эписомы). В силу этого различают ядерную (хромосомную) и цитоплазматическую (внеядерную, внехромосомную) наследственность. Ядерную и цитоплазматическую наследственность определяют как истинную, т. е. проявление признака контролируется собственными генами данного организма. Кроме того, выделяют ложную и переходную наследственность. Ложная наследственность — это проявление признаков и свойств в потомстве, обусловленных генами возбудителей болезней (бактерий, вирусов), а также симбионтов или включением в клетки экзогенных веществ. Ложная наследственность у животных и человека наблюдается редко. При заражении некоторыми вирусами они способны проникать в ДНК клеток организма и вызывать нарушение их функций. Примером ложной наследственности служит появление зеленой окраски тела у некоторых видов червей в результате развития в их клетках одноклеточных зеленых водорослей (симбионтов). Примером ложной наследственности, вызванной поступлением в клетки экзогенных веществ, служит явление окрашивания желтка яиц кур в результате поступления в него каротина.

Переходную наследственность определить сложно, так как ее признаки сочетают в себе черты истинной и ложной наследственности. Например, у инфузорий *Paramecia aurelia* есть штаммы, продуцирующие парамедин, убивающий инфузории другого штамма, но не токсичный для организмов, его вырабатывающих. В цитоплазме инфузорий — продуцентов парамедина есть ДНК-содержащие каплевидные частицы. Однако роль этих частиц не установлена. Неясно, индук-

торами какой наследственности они являются, — истинной цитоплазматической или ложной.

Продолжительное существование живой природы во времени на фоне меняющихся условий было бы невозможным, если бы организмы не были способны к приобретению и сохранению полезных изменений в новых условиях окружающей среды, т. е. если бы живые организмы не обладали изменчивостью.

Изменчивость — это способность организмов изменяться под действием наследственных (генотипических) и ненаследственных (фенотипических) факторов. Наследственность ответственна за стабильность вида, изменчивость определяет его способность адаптироваться к постоянно меняющимся условиям среды обитания. Изменчивость отражает динамичность организмов и наряду с наследственностью является ведущим фактором эволюции. По своим результатам наследственность и изменчивость разнонаправленные, но, несмотря на это, образуют динамическое единство, благодаря которому обеспечивается сохранение и приобретение биологически целесообразных качеств, делающих возможным существование жизни во времени и пространстве.

У отдельных клеток, организмов, микроорганизмов одного вида изменчивость, затрагивая их индивидуальное развитие, проявляется в возникновении различий между ними. На популяционно-видовом уровне жизни изменчивость проявляется в генетических различиях, что является основой образования новых видов. Появление новых видов вносит изменения в межвидовые отношения в биоценозах.

Изменчивость организмов выражается в двух формах: наследственной и ненаследственной.

6.5. Фенотипическая и генотипическая изменчивость

Совокупность генов бактериальной клетки называют ее *генотипом*, а совокупность всех признаков и свойств, проявляемых определенной культурой, — ее *фенотипом*.

Изменчивость микроорганизмов начал изучать Л. Пастер. Он доказал возможность ослабления вирулентных свойств микроорганизмов при воздействии на них различных факторов — физических, химических, биологических. Например, при длительном выдерживании

культуры возбудителя холеры в термостате она утрачивала свои вирулентные свойства, но сохраняла иммуногенность. Именно поэтому такая культура была использована Пастером в качестве вакцины для специфической профилактики холеры птиц.

В 1885 г. Л. Пастер путем 183 последовательных интрацеребральных заражений кроликов вирусом бешенства изменил его свойства. Вирус оказался авирулентным, поэтому ученый применил его в качестве вакцины для профилактики бешенства у людей.

Различают *изменчивость наследуемую*, связанную с изменением наследственной основы клетки, ее генотипа, и *ненаследуемую*, возникающую в результате неоднородности условий развития особей одного поколения и приводящую к изменению фенотипа.

Фенотипическая изменчивость имеет значение для отдельных индивидов, генерации, популяции, но не для вида бактерий в целом. Фенотипические изменения выражаются в вариациях форм и размеров бактерий, биохимической активности, культуральных и биологических свойств. Например, при добавлении стрептомицина к питательной среде клетки сальмонелл значительно удлиняются. При длительном росте бактерий в одной и той же среде возникает полиморфизм, обусловленный влиянием накопившихся в ней продуктов жизнедеятельности (так, у палочковидных появляются коккообразные нитевидной формы различной длины и формы палочки). В ходе пересевов микробных культур они теряют свои патогенные свойства, что необходимо учитывать в ходе бактериологических исследований.

Фенотипическая изменчивость проявляется через модификацию, инволюцию и диссоциацию.

Модификация (от лат. *modificatio* — видоизменение, адаптация) — изменение фенотипа, сохраняющееся на время действия какого-либо фактора внешней среды. Например, возбудитель сибирской язвы не образует спор при 42,5 °С, но приобретает способность формировать их при 37 °С. Этот микроорганизм не образует спор без доступа кислорода, но они возникают при его доступе.

Инволюция (от лат. *involutio* — изгиб, завиток) — возникновение в культуре уродливых форм. Например, при длительном выращивании сальмонелл в МПБ появляются шарообразные формы этих микробов.

Диссоциация (от лат. *dissociation* — разъединять) — образование в культуре колонии разного типа (S-, O-, R-, M-, D-, L-форм колоний) в культуре микробов одного вида. Большинство видов бактерий образуют колонии S (от англ. *smooth* — гладкий) и R (от англ. *rough* — шероховатый)

типов. Кроме того, бывают О-формы колоний (переходные), которые по своим признакам занимают среднее положение между S- и R-колониями, а также М-формы – слизистые (от англ. *mucoid* – слизеподобный), D-формы – карликовые (от англ. *dward* – карлик), L-формы – колонии, формирующиеся на плотной питательной среде при посеве L-форм бактерий.

Для большинства патогенных микробов S-форма колоний является нормой. Лишь для некоторых видов патогенных микробов R-форма бактерий является типичной (возбудители сибирской язвы, туберкулеза). Считают, что диссоциацию вызывают мутации, спонтанно возникающие в естественной среде обитания бактерий, а также при культивировании их на искусственных питательных средах в условиях термостата.

Колонии S-типа прозрачные, с гладкой блестящей поверхностью, круглые с ровными краями, выпуклые, а колонии R-типа шероховатые, непрозрачные, с неровными краями, морщинистые, плоские. Они более прочно связаны с питательной средой, чем колонии в S-форме. Некоторые виды бактерий образуют колонии небольших размеров, напоминающих росинки (пастереллы, гемофилы), но многие виды микроорганизмов формируют колонии, диаметр которых может быть от 2–4 до нескольких миллиметров (сальмонеллы, эшерихии, микроскопические грибы).

Бактерии, составляющие колонии S-типа, обладают следующими свойствами: подвижные виды имеют жгутики; у капсульных видов хорошо выражена капсула или слизистый чехол; биохимически более активны; у патогенных видов выражены вирулентные свойства; полноценны в антигенном отношении; чувствительны к фагу; фагоцитируются слабо; взвесь бактерий в физиологическом растворе гомогенная, стойкая, клетки нормальной величины.

Для бактерий, формирующих колонии R-типа, характерны такие свойства, как: жгутики часто отсутствуют; не имеют капсулы или слизистого чехла; биохимически менее активны; слабовирулентные или совсем авирулентные; легко фагоцитируются; неполноценны в антигенном отношении; слабочувствительны к фагу; взвесь клеток в физиологическом растворе быстро оседает, осадок крошковидный, клетки полиморфные.

Необходимо иметь в виду, что бактерии, формирующие на плотной питательной среде колонии в R-форме, могут утрачивать специфическую агглютинабельность, что затрудняет их идентификацию.

Генотипическая (наследуемая) изменчивость проявляется у бактерий в двух вариантах: мутация и рекомбинация.

1. *Мутация* (от лат. *mutare* — превращаться) — это необратимое изменение генетического материала (генотипа), наступающее под влиянием факторов внешней среды, т. е. мутагенов, действующих на молекулярном уровне (на уровне структуры ДНК). Различают спонтанные и индуцированные мутации. Бактерии с измененными признаками под влиянием мутагенов называют мутантами. Мутагенами могут быть физические, химические и биологические факторы. К мутагенам относятся различные виды радиации, температура, ряд химических соединений (нитраты, нитриты, бромурцил, 2-аминопурин, нитрозогуанидин и др.).

Спонтанные мутации являются следствием ошибок в репликации и репарации (репарация — восстановление целостности) ДНК, воздействия химических и физических факторов. Они возникают в естественной среде обитания бактерий. Одним из типов спонтанной мутации микроорганизмов является ауксотрофность, т. е. утрата клетками способности синтезировать, например, лейцин, который могли продуцировать родительские клетки. В данном случае мутант будет расти и размножаться только в той среде, в которую добавлен лейцин. Такой мутант будет называться ауксотрофным по лейцину, т. е. требующим для своего развития данной аминокислоты.

Спонтанные мутации — источник естественной изменчивости микроорганизмов, обуславливающей адаптацию их к условиям обитания. Эти мутации являются основой эволюционного процесса, фактором возникновения разнообразных видов бактерий. Спонтанные мутации могут вызывать благоприятные и неблагоприятные генетические изменения. Примерный уровень спонтанного мутирования — одна мутация на каждые 10^6 – 10^7 клеток. Численная доля мутантов в клеточной популяции для разных признаков различна и может варьировать от 10^{-1} до 10^{-11} . Обратные мутации (реверсии) возвращают спонтанно мутировавшую клетку к исходному генетическому состоянию. Их находят с частотой одна клетка на 10^7 – 10^8 (т. е. по меньшей мере в 10 раз реже, чем прямые спонтанные мутации).

Индукцированные (направленные) мутации появляются в результате обработки микроорганизмов специальными мутагенами (химическими веществами — азотистая кислота, гидросиламин, тиоцистый или серный иприт и др.; физическими — температурой, ультрафиолетовым и ионизирующим излучениями и др. В основе меха-

низма действия мутагенов лежит их прямое или косвенное влияние на ДНК или на ее предшественников — основания.

Индукцированные мутации называют искусственными, так как их вызывают экспериментальным путем с целью получения вакцинных штаммов некоторых микроорганизмов — продуцентов антибиотиков, витаминов, ферментов и других веществ, использующихся в медицине, ветеринарии, промышленности и сельском хозяйстве.

Появление в природе лекарственно- и антибиотикоустойчивых форм, а также L-форм патогенных бактерий — следствие мутаций. Указанные формы бактерий, приобретшие ряд новых свойств, существенно отличаются от типовых представителей вида, что затрудняет их идентификацию и выявление возбудителя инфекционной болезни.

Мутации могут быть медленными, ступенчатыми или скачкообразными, быстрыми.

2. *Рекомбинация (гибридизация)* — это химическое необратимое изменение генетического аппарата бактерий, наступающее в результате обмена частями хромосом (генами) с бактериями другого вида, штамма. Различают три вида обмена генетическим материалом — трансформация, трансдукция и конъюгация.

В результате генетического обмена между бактериями образуются *рекомбинанты*, т. е. микробы, обладающие свойствами обоих родителей. Клетки-рекомбинанты в основном сохраняют генотип бактерии-реципиента, приобретая отдельные свойства бактерии-донора.

Трансформация (от лат. *transformio* — превращать) — вид гибридизации, при котором осуществляется перенос участков бактерий (не более 5 % от всего генома) ДНК от клетки донора в клетку-реципиент. В последней в результате рекомбинации изменяется специфическая последовательность генома. При этом ее ДНК выступает как трансформирующий агент без каких-либо живых посредников. Трансформация часто происходит вследствие захвата бактериями ДНК из питательной среды, содержащей убитую культуру либо экстракт микроорганизмов иного вида или штамма. Трансформацией переносятся гены, контролирующие синтез капсульного вещества, устойчивость к антибиотикам, синтез ферментов и многие другие свойства.

Впервые явление трансформации было описано Ф. Гриффитсом. Он одновременно ввел мышам две культуры пневмококков: одну — непатогенную бескапсульную живую (R-штамм), вторую патогенную

капсульную (S-штамм), но инактивированную нагреванием. Затем из крови погибших мышей исследователь выделил патогенные бактерии с капсулой — пневмококки третьего типа. Следовательно, инактивированные нагреванием капсульные бактерии передали способность образовывать капсулу непатогенному, но живому бескапсульному штамму.

Изучение бактериальной трансформации позволило установить роль ДНК как материального субстрата наследственности. При изучении генетической трансформации у бактерий были разработаны методы экстракции и очистки ДНК, биохимические и биофизические методы ее анализа.

Трансдукция (от лат. *transduction* — перенос) — вид гибридизации, совершающийся путем переноса ДНК из клетки донора в родственную фагочувствительную клетку с помощью умеренного бактериофага. Размножаясь в бактериальной клетке, фаги включают в состав собственной ДНК участки бактериальной ДНК и передают эти участки клетке-реципиенту при проникновении в нее. Трансдукция была открыта в 1951 г. Н. Циндером и Д. Ледербергом.

Существуют два типа трансдукции:

а) *общая* (неспецифическая) — перенос бактериофагом фрагмента любой части бактериальной хромосомы. Этот процесс происходит вследствие того, что бактериальная ДНК фрагментируется после фаговой инъекции и кусочек бактериальной ДНК того же размера, что и фаговая ДНК, проникает в вирусную частицу с частотой приблизительно 1 на 1000 фаговых частиц;

б) *специфическая* — наблюдается в том случае, если фаговая ДНК интегрирует в бактериальную с образованием профага. При неслучайном включении ДНК фага из бактериальной хромосомы в результате случайного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК фрагмент бактериальной хромосомы. Так как большинство умеренных бактериофагов интегрирует в бактериальную ДНК в специфических участках, для таких бактериофагов характерен перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК донора.

Конъюгация (от лат. *conjugation* — объединение) — процесс гибридизации, осуществляющийся путем передачи генетического материала через половые ворсинки (секс-пили). Этот вид генетического обмена между бактериями описан Дж. Ледербергом и Э. Татумом (1946), работавшими с мутантами кишечной палочки. Конъюгация бактерий

состоит в переходе генетического материала (ДНК) из клетки-донора («мужской») в клетку-реципиент («женскую») при контакте клеток между собой.

Способность бактериальной клетки конъюгировать связана с наличием в ней полового фактора F (фактор фертильности) – плазмиды. Клетки-реципиенты F^- не имеют таковой. При контакте клетки-доноры F^+ передают бактерии-реципиенту плазмиду F в виде цельной структуры, не теряя при этом своей донорской способности, и клетки-реципиенты становятся способными к конъюгации. Это явление в микробиологии получило название полового процесс и в литературе иногда неправильно трактуется как половое размножение бактерий, которые увеличивают свою популяцию только бесполым способом (бинарным делением). Конъюгацию, трансдукцию и трансформацию следует называть способами генетического обмена или способами горизонтального переноса генов. Результатом половых процессов у бактерий является комбинативная изменчивость, сходная с подобной изменчивостью высших (эукариотических) организмов, у которых она реализуется во время полового размножения.

Среди популяции клеток-доноров есть бактерии, которые могут при конъюгации передавать и фрагменты бактериальной хромосомы, что наблюдается в случае, если плазида F находится в интегрированном состоянии с хромосомой. Соотношение клеток F^+ и F^- в популяции примерно равно $1:1 \cdot 10^7$.

Конъюгация является одним из основных поставщиков измененных форм бактерий и важным фактором их эволюции. В отличие от полового процесса у эукариотов, конъюгация бактерий возможна между особями, относящимися к различным видам и родам, например между эшерихиями и сальмонеллами, сальмонеллами и шигеллами. При конъюгации происходит только частичный перенос генетического материала, поэтому ее не следует отождествлять полностью с половым процессом у других организмов.



7.1. Микробиота почвы

Почва, особенно чернозем, очень богата микроорганизмами. В ней существуют амёбы, грибы, инфузории, бактерии. Наибольшее количество микроорганизмов находится на глубине 5–15 см. На каждый гектар малоплодородной почвы приходится 5–6 т микробной массы, высокоплодородной – до 16 т. Наиболее богаты микроорганизмами возделываемые почвы, бедны песчаные, лишённые растительности, и горные. Содержание микробов в почвах Северного полушария увеличивается с севера на юг. К типичным почвенным микробам относят: *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. pumilus* (син. *B. mesentericus*), *Cl. tetani*, *Cl. perfringens*, *Cl. novyi*, и др., составляющие 80–90 % всей микробиоты почвы.

В почве постоянными обитателями являются спорообразующие бактерии, могут встречаться бактерии других видов, плесневые грибы, актиномицеты, ризиккетсии. Помимо сапрофитов, многие из которых участвуют в почвообразовании (азотфиксирующие бактерии – свободноживущие, клубеньковые и др.) в почве могут размножаться и долго сохраняться патогенные микроорганизмы (туберкулезные бактерии, возбудитель бруцеллеза, рожи, споры сибирской язвы, столбняка, газовой гангрены и др.). Споры могут сохраняться в почве десятилетиями. Микробы в почве могут не только выживать, но месяцы и даже годы сохранять свои вирулентные свойства.

Микробиота почвы полностью зависит от окружающих условий – влажности, температуры, pH, характера и количества питательных веществ, солнечной инсоляции, окислительно-восстановительного потенциала и т. д.

Основным показателем, характеризующим загрязненность почвы органическими веществами, является микробное число, т. е. количество микробов в 1 г. Почвы считаются чистыми, если микробное число не превышает 2 млн особей в 1 г, слабозагрязненными – 2–2,4 млн, умеренно загрязненными – 2,5–3 млн, сильнозагрязненными – более 3 млн.

Основными показателями, характеризующими санитарное состояние почвы, являются общая микробная загрязненность почвы и количество санитарно-показательных микроорганизмов. Первый показатель определяют по общему количеству микроорганизмов в 1 г почвы, а второй – по установлению титра санитарно-показательных микроорганизмов: *E. coli* (а также бактерии группы кишечной палочки (БГКП) – цитробактера, энтеробактера и клебсиеллы), *Ent. faecalis* и *Cl. perfringens*.

7.2. Микробиота воды

Вода имеет большое санитарное значение. Она необходима для поения животных, подготовки кормов, приготовления пищи, обработки посуды, мойки, дезинфекции, личной гигиены.

Различают морскую, озерную, речную, артезианскую, атмосферную, промышленную, сточную, хозяйственно-бытовую и другие виды воды. Промышленные воды бывают разнообразны по химическому составу. Сточные воды кожевенных, шерстеобрабатывающих производств, боен, мясокомбинатов могут нести прямую угрозу загрязненности водоемов патогенными для животных и человека микроорганизмами.

Хозяйственно-бытовые сточные воды также опасны в эпидемиологическом и эпизоотическом отношении.

В воде различают автохтонные (живут в воде, поступают из окружающей почвы) и аллохтонные (поступают из различных источников загрязнения: выделения людей, животных, сточные воды животноводческих помещений, хозяйственно-бытовые, промышленные воды) микроорганизмы.

Микробную обсемененность воды выражают *сапробностью*. Различают следующие зоны:

полисапробную – нет кислорода, но много гниющей массы. Таковую воду не используют ни для каких нужд;

мезасапробную — происходит минерализация, окисление, нитрификация;

олигосапробную — минерализация протекает очень активно — в 1 мл такой воды содержится небольшое количество микробов, она прозрачна, может использоваться для различных нужд.

Автохтонная микробиота является решающим фактором в процессе самоочищения водоемов от органических веществ, трупов животных, погибших растений.

Аллохтонная микробиота является опасной с точки зрения возможности заражения людей и животных патогенными микроорганизмами.

В воде микробов значительно меньше, чем в почве, так как она бедна питательными веществами и облучается солнечными лучами. В сточных и стоячих водах микробов много. В проточной воде микробов меньше, поскольку они подвергаются различным механическим воздействиям. Наименьшее количество микробов в артезианской воде, где довольно много органических веществ, бывает большое количество микробов среди которых и патогенные (лептоспиры, сальмонеллы, эшерихии, рожистая палочка и др.). Постоянно живут в воде *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus vulgaris*, *Kocuria rosea* (сун. *Micrococcus roseus*) и др. Определить конкретного возбудителя сложно, поэтому санитарную оценку воды производят косвенно, по наличию в ней кишечной палочки (*E. coli*). Для бактериологического исследования отбирают 400–500 мл воды в стерильную бутылку и закрывают стерильной пробкой. Из глубоких водоемов пробы воды берут на глубине 10–15 см от поверхности, а из мелких — на уровне 10–15 см от дна. Пробу воды доставляют в лабораторию не позднее чем через 3 ч после их взятия.

Санитарную оценку воды проводят по результатам ее санитарно-бактериологического исследования с определением показателей микробного числа, коли-титра и коли-индекса. Нормы санитарной оценки воды позволяют дополнительно исключить присутствие отдельных групп микроорганизмов: термотолерантных и общих колиформных бактерий (не допускаются в 100 см³ воды); спор сульфитредуцирующих клостридий (не допускаются в 20 см³ воды).

Общее микробное число устанавливают по количеству микробов в 1 мл воды. Водопроводная вода считается хорошей, если общее число микробов в 1 мл равно 100, сомнительной — 100–150, загрязненной — 400 и более. В воде колодцев и открытых водоемов в 1 мл не должно быть более 1000 микробов.

Степень санитарного загрязнения воды оценивают по коли-титру и коли-индексу. Коли-титром называется наименьший объем воды (в миллилитрах), в котором обнаруживается хотя бы одна *E. coli*. Коли-индексом называется число кишечных палочек, обнаруженных в 1 л воды. Вода считается качественной, если ее коли-индекс не более 3, а коли-титр не менее 300.

7.3. Микробиота воздуха

Микробиота воздуха зависит от микробиоты почвы и воды, откуда она поступает с пылью и капельками влаги. Воздух — неблагоприятная среда для микробов. В воздухе нет питательных веществ. Солнечные лучи и высушивание губительно действуют на микробы, вследствие чего микробиота воздуха менее обильна, чем почвы и воды. В воздухе часто встречаются пигментные сапрофитные бактерии (микрочкокки, сарцины), споровые (сенная, картофельная и др.) палочки, актиномицеты, плесневые грибы, дрожжи, споры грибов из родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*.

В животноводческих помещениях аэрозоли возникают при кашле, чиханье, быстром перемещении животных. Доказано, что в 1 м³ воздуха содержится до 2 млн микробных клеток, в том числе патогенных. В плохо вентилируемых помещениях микробов в 5–6 раз больше, чем в хорошо вентилируемых. Воздух полей, лугов, лесов, водных пространств и подальше от населенных пунктов более чистый. Количество микробов в воздухе зависит от времени года, максимальное количество микробов обнаруживают в июне-августе, минимальное — в декабре-январе.

Бактериологическое исследование воздуха осуществляется с использованием седиментационных, аспирационно-фильтрационных (сорбционных) методов, основанных на осаждении микроорганизмов из воздуха на поверхности твердых питательных сред или задержке их в жидкой среде путем сифонирования и барботаж. Метод Коха: бактериологические чашки с МПА оставляют открытыми в разных точках помещения на 5–10 мин, затем их закрывают и переносят в термостат при температуре 37–38 °С на 48 ч для получения колоний. Принято считать, что на площадь 100 см² агара за 5 мин оседает приблизительно столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха.

Санитарное состояние воздуха оценивается по микробному числу – количеству микроорганизмов, обнаруженных в 1 м³ атмосферного воздуха, а в помещениях для животных по микробному числу и наличию в них санитарно-показательных микробов: *Staph. aureus*, *Str. haemoliticus*, *E. coli*.

В воздухе животноводческих помещений не должно быть более 500–1000 бактерий в 1 м³.

7.4. Микробиота организма животных

У здоровых животных присутствует разнообразная микробиота. Одни из ее представителей (молочнокислые бактерии, в частности кислотофильные) обитают временно, другие постоянно (облигатные) выполняют ряд полезных функций: разлагают трудноперевариваемые корма, целлюлозу, синтезируют белок и витамины, являются антагонистами гнилостных и патогенных микробов). Нормальная микробиота концентрируется в ротовой полости, желудочно-кишечном тракте, в верхних дыхательных путях, легких, в наружных половых органах, на коже, в молочной железе ее меньше. Внутренние органы – селезенка, почки, печень, полость матки, мочевого пузыря свободны от микробов. С изменением состава нормальной микробиоты или нарушением функций может наступить дисбактериоз – болезненное угнетенное состояние, сопровождающееся расстройством деятельности желудочно-кишечного тракта, снижением аппетита, привесов.

Микробиота кожи в основном включает стафилококки, стрептококки, актиномицеты, сарцины, микрококки, вызывающие воспалительные процессы: фурункулы, гнойники, флегмоны. Из кишечных бактерий обнаруживают кишечную, синегнойную, псевдодифтерийную палочки, аэробы, анаэробы. На 1 см² кожи может быть 1–2 млрд микробных тел.

Микробиота вымени представлена микрококками (например, *Mic. luteus*), стафилококками, стрептококками. На коже вымени могут обитать все микробы из почвы, воздуха, навоза и т. д.

Микробиота конъюнктивы содержит только небольшое количество микробов: стафилококки, стрептококки, сарцины, микрококки, микоплазмы, актиномицеты, дрожжи, плесневые грибы.

Дыхательные пути у новорожденных животных не содержат микробов. У взрослых особей микробиота респираторного тракта пред-

ставлена в основном стафилококками, стрептококками, микрококками.

Пищеварительный тракт у новорожденных животных также не содержит микробов, однако в процессе жизни он активно заселяется микроорганизмами. Микробиоту пищеварительного тракта принято делить на факультативную (временную) и облигатную (постоянную), представленную молочнокислыми палочками, молочнокислыми стрептококками, кишечной палочкой.

Микробиота полости рта наиболее обильна и разнообразна. В ротовой полости обнаружено более 100 видов микроорганизмов: диплококки, стафилококки, сарцины, микрококки, дифтероиды, анаэробы и аэробы, спирохеты, грибы, дрожжи, целлюлозоразрушающие микробы. Разнообразие микробов в ротовой полости зависит от кормов и способов их приготовления, воды, вида животных.

Микробиота желудка относительно бедна по количественному и качественному составу. Желудочный кислый сок бактерицидно действует на микробы, тем не менее в желудке выживают споровые, бактерии типа *B. subtilis*, кислотоустойчивые микобактерии *Myc. bovis*, *Myc. avium*, молочнокислые бактерии, актиномицеты, энтерококки. При заболевании желудка в его содержимом могут присутствовать гнилостные бактерии, дрожжи и плесневые грибы.

В желудке свиньи находятся молочнокислые микробы, различные кокки, сбраживающие углеводы, дрожжи, спорообразующие аэробы, клостридии, в частности *Cl. perfringens*. У лошади микробиота желудка более многочисленна и разнообразна, отсутствуют гнилостные бактерии, на дне желудка много молочнокислых бактерий. У жвачных животных в желудке и преджелудках много гнилостных бактерий, возбудителей различных брожений. С кормом в рубец попадает много почвенных микробов и эпифитной микробиоты: содержится она преимущественно в вегетативной форме численностью от 1 тыс. до 10 млн микробных клеток в 1 мл содержимого рубца. Очень важны для пищеварения целлюлозоразрушающие микробы: *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Cl. cellobioparum*, *Cl. cellulolyticum* и др. Эти микробы с помощью фермента целлюлазы разрушают целлюлозу до глюкозы, которая легко усваивается организмом животных. Пектиновые вещества расщепляет *Paenibacillus macerans*. Стрептококки и энтерококки (*Ent. faecalis*) сбраживают крахмал, глюкозу с образованием молочной кислоты. Пропионово-кислые бактерии сбраживают лактаты с образованием пропионовой кислоты, частично масляной и уксуснокислой,

продуцируют витамины группы В. Микробы, заселяющие рубец, расщепляют белки, нитраты, мочевины, синтезируют все витамины, за исключением А, Е, D.

Микробиота тонкого кишечника наиболее бедная. В двенадцатиперстной и тощей кишках ослабляется деятельность целлюлозных микробов, и чаще всего присутствуют устойчивые к желчи энтерококки, ацидофильные, споровые микробы *Cl. perfringens*, актиномицеты, *E. coli*. Количественный и качественный состав микробиоты зависит от вида животных и характера их кормления.

Микробиота толстых кишок наиболее богата и многочисленна. Ее постоянными обитателями являются энтерококки, стафилококки, актиномицеты, ацидофилы, термофилы, споровые формы, дрожжи, плесени, гнилостные бактерии. Обилие микробиоты толстого кишечника объясняется наличием больших объемов переваренного корма. В ряде случаев в толстом кишечнике обнаруживают патогенные микроорганизмы – возбудитель столбняка, инфекционного аборта кобыл, сибирской язвы, рожи, пастереллеза, сальмонеллеза, анаэробной и других инфекций.

На слизистой мочеполовых органов обнаруживают стафилококки, стрептококки, микрококки, дифтероиды, кислотоустойчивые микобактерии. Матка, яичники, семенники, мочевой пузырь в нормальном физиологическом состоянии стерильны.

Таким образом, организм животных содержит разнообразную микробиоту. При нормальных условиях в организме поддерживается определенный полезный микробиоценоз. Взаимоотношения организмов между собой и с окружающей средой занимается экология. Основной единицей в экологии является экосистема – система связей и взаимоотношений сообщества живых организмов (биоценоз) и среды их обитания (биотоп) для обмена веществами и энергией между собой.

Отдельные элементы среды, действующие на макро- и микроорганизмы, называют экологическими факторами. Различают абиотические и биотические факторы. Абиотические факторы включают в себя все элементы неживой природы, влияющие на организм: к их числу можно отнести свет, температуру, влажность, состав водной, воздушной, почвенной среды. Биотические факторы объединяют все влияющие на организм окружающие его живые существа.

Местообитание – это участок, в котором обычно живет данный организм, жизненное пространство организма. Иными словами, мес-

тообитание — это «улица» и «номер дома» данного организма, некоторые микроорганизмы могут иметь по нескольку адресов. В отличие от термина «местообитание» понятие «экологическая ниша» отражает не место в пространстве, а функцию какого-то вида или популяции в сообществе организмов.

Обитатели экосистемы в 1925 г. С. Н. Виноградским разделены на две категории — автохтонные и аллохтонные. Автохтонные являются типичными обитателями данной экосистемы (например, почвы, кишечника) и присутствуют там всегда. Под аллохтонными, или зимогенными, понимают случайных обитателей экосистемы, наличие которых в ней зависит от повышения концентрации питательных веществ или от добавления определенных веществ.

Микробы находятся в различных взаимоотношениях как между собой, так и с макроорганизмом. Эти отношения сложились в процессе эволюции. Основные формы таких взаимоотношений следующие:

комменсализм — взаимоотношение между нормальной микробиотой тела и макроорганизмом. Бактерии живут за счет макроорганизма, не принося ему ни вреда, ни пользы;

метабиоз — взаимоотношения, сопровождающиеся сменой видов микробов в одной и той же среде, например при брожении, вначале развиваются дрожжи, ферментирующие углеводы и способствующие образованию спирта, затем уксуснокислые бактерии, что сопровождается образованием уксусной кислоты, далее начинается развитие плесневых грибов, приводящее к зашелачиванию почвы и размножению гнилостных бактерий;

мутуализм — длительное взаимовыгодное сожительство макро- и микроорганизма. Так, целлюлозоразрушающие бактерии получают для питания клетчатку, улучшая переваримость и усвоение грубого корма макроорганизмом;

сателлизм — наблюдается в тех случаях, когда один из микробов-симбионтов (сарцины, дрожжи), продуцируя аминокислоты, витамины и иные питательные вещества, стимулирует рост другого;

синергизм — форма взаимоотношений, при которой усиливаются физиологические функции всей группы синергистов (дрожжи, спирохеты, уксуснокислые бактерии);

виорофория — сосуществование бактерий или дрожжей с вирусами, например бактериофаг — вирус бактерий длительное время может находиться в бактериальных клетках;

антагонизм — угнетение одного вида другим. Гнилостные не могут развиваться в присутствии молочнокислых бактерий;

паразитизм — микробы-паразиты наносят вред, вызывая инфекционные болезни.

Для микробов характерны антагонистические взаимоотношения (антагонизм, антибиоз), т. е. угнетение одного вида другим. Многие бактерии погибают при воздействии антибиотических веществ, выделяемых плесневыми грибами и актиномицетами.

Вообще все микробы могут быть подразделены на две основные группы:

полезные для человека и животных;

патогенные микроорганизмы, вызывающие инфекционные болезни животных и человека.

7.5. Микробиота кормов

Обычно источником изготовления кормов для сельскохозяйственных животных являются растения. В зависимости от технологии изготовления кормов и условий хранения микробиота кормов может быть различной. На поверхности растущих и свежескошенных растений находится эпифитная микробиота. Как правило, эта травяная палочка *Pantoea agglomerans*, занимающая около 40 % всей эпифитной микробиоты, молочнокислые стрептококки и палочки, сенная и картофельная бациллы, флюоресцирующие бактерии, протей, сарцины, актиномицеты, плесени, дрожжи и др.

Эпифитная микробиота представлена главным образом безвредными сапрофитами, однако при скашивании растений они могут интенсивно размножаться, вызывая гнилостные и бродильные процессы, приводящие к порче и разложению корма. Для предотвращения этих процессов растительные корма консервируют. Наиболее эффективным способом консервирования скошенной травы, зерна и других кормов является сушка. В высушенном сене приостанавливаются все микробиологические процессы, многие микробы постепенно вымирают в процессе хранения, и преобладающей микробиотой сена становятся споровые формы бактерий.

Значительно различается микробиота консервированных кормов, в частности силоса или сенажа. В этом случае происходит созревание и ферментация массы за счет активных микробиологических процессов. Со-

зревание зеленой массы при силосовании проходит три последовательные фазы:

первая — развития смешанной микробиоты — связана с бурным размножением эпифитной микробиоты, кишечной палочки, псевдомонад, дрожжей, молочнокислых и гнилостных бактерий. Ее длительность составляет в среднем 1–3 дня. В это время силос разогревается и подкисляется, создаются анаэробные условия, в результате чего большая часть смешанной микробиоты погибает;

вторая — характеризуется вначале бурным размножением молочнокислых стрептококков, а затем молочнокислых палочек, продуцирующих молочную кислоту, которая подавляет размножение гнилостных и маслянокислых микроорганизмов, кроме спорообразующих. Ее длительность составляет от 2 нед. до 3 мес.;

третья (конечная) — связана с постепенным отмиранием в созревающем силосе возбудителей молочнокислого брожения (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salarius subsp. thermophilus*). За счет активных литических процессов углеводов концентрация молочной кислоты достигает 60 % и более, рН силосной массы снижается до 4,2–4,5. Кроме молочной кислоты в силосе накапливаются уксусная и даже масляная кислоты. Однако концентрация уксусной кислоты не должна превышать 40–60 % всех органических кислот, а масляной кислоты — должно быть не более 0,2 %.

При несоблюдении технологии приготовления силоса и его хранения он может заплесневеть, прогоркнуть и перекиснуть. Для профилактики пороков силоса микробного происхождения используют бактериальные закваски молочнокислых бактерий (*Lac. plantarum*), пропионово-кислых и других бактерий.

Данная технология относится к консервированию кормов, имеющих нормальную влажность (около 75 %). Если влажность консервируемой массы ниже (50–65 %), то происходит хорошая ферментация даже при дефиците углеводов и получается корм высокого качества — сенаж. При этом рН корма может быть довольно высоким — около 5, так как гнилостные бактерии обладают меньшим осмотическим давлением, чем молочнокислые. При подсушивании корма в нем приостанавливаются гнилостные процессы, но продолжают действовать возбудители молочнокислого брожения. На этом основано приготовление сенажа, когда несколько подсушенную массу закладывают для консервирования, как при холодном силосовании.

Доминирующей микробиотой в консервируемом корме очень быстро становятся молочнокислые бактерии. Эта группа довольно

специфических микроорганизмов близка к *Lac. plantarum*, но отличается способностью расти в условиях значительно более сухой среды и сбрасывать крахмал. Их развитие в корме приводит к накоплению в нем некоторого количества молочной и уксусной кислот.

При длительном хранении кормов эпифитная микробиота вытесняется плесневыми грибами, главным образом аспергиллами, пенициллами, мукооровыми и другими грибами. Очень часто грибы, встречающиеся на кормах, условно делят на две основные группы: полевые грибы и плесени хранения. В первую включают виды, способные проникать или развиваться на зерне еще в период вегетации растений. Они отличаются высокой требовательностью к уровню влажности — 20–25 %. Это грибы рода *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*.

Вторую группу составляют грибы преимущественно из родов *Aspergillus* и *Penicillium*, содержащиеся в почве, но только в некоторых случаях присутствующие на вегетирующих растениях, однако характерные для хранящейся массы зерна. Такие грибы могут развиваться при более низкой влажности, чем влажность зерна в процессе хранения, — 13–18 %, хотя при этом значительно повышают влажность продукта.

Кроме данных двух групп выделена еще и третья, к которой отнесены грибы, вызывающие вторичную порчу зерна, — *F. graminearum*, *Chaetomium*, *Sordaria*, *Papylaspora*. Они сравнительно редко поражают зерно до его уборки.

7.6. Микробиота молока и молочных продуктов

Молоко и большинство молочных продуктов являются благоприятной средой для различных микроорганизмов, как патогенных, так и микроорганизмов порчи. Кроме того, молоко, полученное от больных животных, опасно для здоровья, являясь причиной инфекционных заболеваний, стафилококкового токсикоза и других пищевых отравлений.

Парное молоко, полученное от здоровых животных, обладает бактерицидными свойствами. Однако бактерицидная фаза продолжается от нескольких до 45 мин, если молоко находится при температуре не выше 0 °С. Затем микробная обсемененность увеличивается в зависимости от температуры хранения: чем она выше, тем быстрее протекает процесс. Основными источниками бактериального обсеменения яв-

ляются сами животные, помещения, воздух, корма, плохо промытые доильные установки, молокопроводы и средства его транспортировки. Все это может быть следствием того, что в сыром молоке могут появляться патогенные для человека микрококки, стрептококки, а также клебсиеллы, иерсинии, протейные и кишечные палочки (колиформы) и др. Кроме того, в молоко могут попадать гнилостные микробы – споровые (сенная, картофельная бациллы) и неспоровые (бактерия гниения, протей) бактерии, микрококки и отдельные виды молочнокислых бактерий, обладающих протеолитической активностью. Они в основном не опасны для человека, но, быстро размножаясь, приводят к появлению неприятного вкуса, изменению свойств молока и его порче.

Если в молоке начинают преобладать молочнокислые бактерии и повышается кислотность, то молоко прокисает, а развитие многих других бактерий подавляется. Затем молочнокислая микробиота постепенно отмирает, создаются условия для роста дрожжей, плесневых грибов, а затем и микроорганизмов гниения.

Во избежание порчи молока и уничтожения возможных патогенных микроорганизмов проводится его пастеризация. Обычно молоко пастеризуют при 76 °С с выдержкой 15–20 с. Тем не менее после пастеризации остается некоторое количество термофильных и терmostойких бактерий (в том числе энтерококки) и споры. Такое молоко следует хранить при температуре +4 °С не более 36 ч. Стерилизованное молоко микроорганизмов практически не содержит и может храниться длительное время.

Кисломолочные продукты (сметана, творог, кефир, простокваша и др.) обладают большей стойкостью при хранении, чем молоко. Они являются неблагоприятной средой для развития многих патогенных бактерий. Это объясняется повышенной кислотностью продуктов и антибиотическими свойствами некоторых заквасок.

При изготовлении кисломолочных продуктов применяют закваски, содержащие чистые культуры молочнокислых стрептококков, болгарской и ацидофильной палочек или их смеси – в основном те микроорганизмы, продуктом брожения которых является молочная кислота. К ним относят *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* и др., используемые для изготовления сливок, масла и сыра соответствующих сортов.

Для выработки кефира используют так называемый кефирный грибок — симбиоз дрожжей и других микроорганизмов.

Сыры получают путем заквашивания молока молочнокислыми бактериями, а затем вводят сычужный фермент, активизирующий свертывание молока. Далее происходит процесс созревания сыра — под действием микробов закваски идет молочнокислое и пропионово-кислое брожение. В результате молочный сахар сбраживается, белки частично расщепляются, появляются специфический вкус и аромат.

При выработке некоторых мягких сыров используют культуры плесневых грибов из рода *Penicillium*. Порча сыров чаще всего происходит из-за плесневения, развитие маслянокислых бактерий приводит к вспучиванию, а некоторых молочнокислых стрептококков — к появлению горечи.

Таким образом, все микроорганизмы, встречающиеся в молоке и молочных продуктах в зависимости от их роли в формировании качества молочных продуктов можно разделить на три группы:

1) технически полезная микробиота — делится на полезную микробиоту (микробиоту заквасок: молочнокислых и пропионово-кислых бактерий, бифидобактерий, дрожжей, уксуснокислых бактерий) и технически вредную микробиоту (микробиоту, вызывающую пороки молочных продуктов);

2) патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие пищевые заболевания. Патогенные микроорганизмы — возбудители инфекционных болезней (бруцеллеза, туберкулеза, ящура и др.) — в молоке и молочных продуктах не размножаются, но могут длительное время сохранять свою жизнеспособность. Из патогенных микроорганизмов во всех молочных продуктах нормируется наличие сальмонелл. Условно-патогенные микроорганизмы являются возбудителями пищевых отравлений: токсикоинфекций и интоксикаций. Многие условно-патогенные микроорганизмы (например, *B. cereus*, *C. perfringens*, *Staph. aureus*) способны размножаться в молочных продуктах, влияя на их органолептические показатели и накапливая токсины. Во многих молочных продуктах для оценки их качества определяют наличие золотистого стафилококка;

3) микроорганизмы — показатели санитарного состояния. В качестве санитарно-показательных микроорганизмов при оценке санитарного состояния молока и молочных продуктов являются бактерии группы кишечной палочки (БГКП). По содержанию БГКП судят о

степени бактериальной осемененности пищевых продуктов и, следовательно, о степени их эпидемиологической опасности для потребителя, поэтому наличие БГКП нормируется для всех без исключения молочных продуктах.

О санитарном состоянии молочных продуктов, не содержащих технически полезной микробиоты, можно также судить по количеству в них мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

7.7. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе

Микроорганизмы активно участвуют в круговороте веществ в природе. Значительную часть органического вещества составляют азот (16–18 %) и углерод (до 50 %). Разложение органических веществ, попадающих в почву после гибели растений и животных, происходит под влиянием ферментов, образуемых различными микроорганизмами (гнилостными, молочнокислыми, маслянокислыми, дрожжами, актиномицетами, плесневыми грибами). Органические вещества, входящие в состав животного и растительного организма, используются микробами в качестве источника питания и энергии.

Минеральные вещества усваиваются из почвы растениями, где из этих веществ вновь формируются органические соединения. Растения же являются источником питания для животных. Иными словами, органические вещества, находящиеся в организме погибших животных и растений, при участии микробов превращаются в минеральные, а последние усваиваются высокоорганизованными живыми существами и в результате вновь синтезируются органические соединения.

Распад органических веществ до минеральных — длительный процесс, совершающийся чаще всего в несколько этапов химических реакций, в которых участвуют микроорганизмы.

Исключительно важную роль играют микроорганизмам в круговороте азота и углерода. Столб воздуха над 1 га земной поверхности содержит до 80 тыс. т азота. Однако для растений и животных он недоступен. Фиксируют атмосферный азот *Azotobacter*, *Clostridium*, *Rhizobium*. Цикл превращения азота в природе состоит из следующих этапов: а) фиксация; б) аммонификация; в) нитрификация; г) денитрификация.

Атмосферный азот фиксируют бактерии. Фиксированный азот используют растения и превращают его в растительный белок. Растения поедаются животными, образуется животный белок. В основном фиксация азота осуществляется свободноживущими азотфиксаторами и клубеньковыми микроорганизмами. К свободноживущим относятся виды *Cl. pasteurianum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter chroococcum*, к симбиотическим азотфиксаторам — бактерии рода *Rhizobium* — клубеньковые бактерии, которые живут на корнях бобовых растений. Бактерии питаются органическими соединениями, синтезированными растениями, а растения получают из клубеньков связанные соединения азота. В течение 1 года клубеньковые бактерии могут зафиксировать до 200 кг атмосферного азота на площади 1 га. С целью повышения плодородия почвы используют азотобактерии и нитрагин.

Животные и растения гибнут, их тела подвергаются действию микроорганизмов, и азотистые соединения разрушаются с образованием аммиака. Такой процесс называется *аммонизацией* или *минерализацией люта*, может протекать в аэробных и анаэробных условиях при участии различных микробов: бацилл, клостридий, актиномицетов, плесневых грибов, т. е. происходит гниение. Аэробная гнилостная микробиота совершает глубокий распад белка, конечными продуктами которого являются аммиак, углекислый газ, сульфаты, вода. При распаде белка в анаэробных условиях образуется аммиак, углекислый газ, органические кислоты, индол, скатол, обладающие неприятным запахом. К аммонификаторам относят: *Cl. sporogenes*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, *B. megaterium*.

Нитрификация — химическое превращение аммиака, который окисляется сначала в азотистую, а затем в азотную кислоту. Образовавшаяся азотная кислота в почве вступает в соединение со щелочами, в результате образуется селитра. Селитра хорошо растворяется в воде и усваивается растениями, в результате чего повышается плодородие почвы.

Денитрификация — процесс, обратный нитрификации, т. е. нитриты восстанавливаются в газообразный азот бактериями, главным образом, рода *Pseudomonas*. Денитрификация может быть прямой и косвенной. Прямая — такая, когда денитрифицирующие бактерии непосредственно восстанавливают нитраты до молекулярного N. Косвенная денитрификация осуществляется химическим путем при взаимодействии азотистой кислоты с аминными соединениями.

Роль микроорганизмов в поддержании равновесия и *круговорота углерода* в природе неизмеримо велика. Углерод входит в состав орга-

нических соединений, которые являются продуктами фотосинтеза. В воздухе содержится до 0,03 % углекислого газа. В состав клетчатки (целлюлозы) входит более 50 % всего органического углерода биосферы. Клетчатка – наиболее распространенный полисахарид растительного мира – растения на 15–50 % состоят из целлюлозы. После их гибели целлюлоза подвергается разложению, в результате высвобождается углерод. Разложение клетчатки происходит в аэробных и анаэробных условиях в почве, водоемах, навозе, желудочно-кишечном тракте травоядных. В аэробных условиях клетчатку разлагают актиномицеты и грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium*, а также микроорганизмы родов *Cytophaga*, *Cefacicula*, *Cellvibrio*.

Анаэробное брожение клетчатки осуществляется в два этапа:

1) осахаривание клетчатки;

2) расположение сахара в зависимости от типа брожения на спирты, молочную и масляную кислоты, углекислоту, метан, водород. Анаэробное брожение осуществляется целлюлозоразрушителями – *Cl. cellobioparum* и др.

В рубце жвачных целлюлоза кормов разлагается до глюкозы, которая затем сбраживается с образованием органических кислот – уксусной, пропионовой, масляной, молочной, муравьиной, янтарной и др., спиртов и газов (углекислый газ и водород). Разложение целлюлозы в рубце осуществляют кокко- и палочковидные бактерии: *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* и др.

Углекислота высвобождается в результате разрушения пектиновых веществ при брожении.

При *спиртовом брожении* микроорганизмы превращают углеводы (сахара) в этиловый спирт как основной продукт и углекислый газ. К возбудителям спиртового брожения относятся дрожжи, главным образом из рода *Saccharomyces* (*S. globosus*, *S. cerevisiae*, *S. vini*).

Молочнокислое брожение основано на антагонизме молочнокислых бактерий по отношению к патогенным микробам, который обусловлен действием молочной кислоты и образованием ими антибиотических веществ. При молочнокислом брожении образуются молочная кислота и углекислый газ. Молочнокислые бактерии делят на гомоферментативные и гетероферментативные. При гомоферментативном молочнокислом брожении образуется только молочная кислота, при гетероферментативном – молочная кислота, другие продукты и углекислый газ.

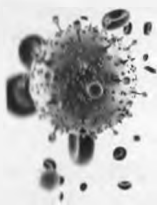
Пропионово-кислое брожение осуществляется бактериями рода *Propionibacterium*. Встречаются на растениях и в желудочно-кишечном

гракте жвачных. Способны сбраживать молочную кислоту, конечные продукты пропионово-кислого брожения: пропионовую и уксусную кислоты, углекислый газ, воду.

Маслянокислое брожение начинается с разложения сахаров в пировиноградную кислоту. В результате последовательности реакций образуются масляная кислота, углекислый газ и водород. Маслянокислое брожение является причиной прогоркания растительных масел, жиров животного происхождения, семян сои и подсолнечника, заквашивания кормов для животных. Маслянокислое брожение обуславливают бактерии из рода *Clostridium* – *Cl. butyricum*.

Уксуснокислое окисление – процесс, при котором этиловый спирт окисляется до уксусной кислоты. Природа этого процесса установлена в 1868 г. Л. Пастером. Вызывают уксуснокислое окисление бактерии из рода *Acetobacter*. Их используют для производства пищевого уксуса из вина и спирта. Уксуснокислое брожение имеет значение при силосовании кормов.

Глава 8 ОСНОВЫ УЧЕНИЯ ОБ ИНФЕКЦИИ



8.1. Общие представления об инфекции, инфекционном процессе, инфекционной болезни

Инфекция (от лат. *infectio* – заражение) – это совокупность явлений, возникающих в организме при внедрении и размножении или активации в нем патогенных микробов.

В общебиологическом аспекте инфекция представляет собой проявление борьбы за существование микро- и макроорганизмов. Инфекция – эволюционно сложившееся взаимодействие паразита и хозяина, проявляющееся в форме болезни или бактерионосительства в конкретных условиях окружающей среды.

Основной закон инфекции – без микроба нет инфекции, микроб – специфическая причина инфекции.

Необходимо подчеркнуть, что инфекция – сложный биологический процесс, обусловленный тремя взаимодействующими факторами: микроб, макроорганизм, внешняя среда.

Для микроба внешней средой является организм животного, сопротивляемость которого зависит от условий его обитания.

Состояние инфекции как любого биологического процесса динамично. Динамику реакций взаимодействия между микроорганизмами и макроорганизмом называют *инфекционным процессом*, который включает внедрение, размножение и распространение микробов в организме, а также реакцию организма на микроорганизмы. Инфекционному процессу свойственна цикличность и специфичность, т. е. каждому виду микроба характерен присущий только ему инфекционный процесс.

Понятие «инфекция» нельзя отождествлять с понятием «заражение», так как инфекция не факт проникновения патогенных микробов в организм, а совокупность сложных биологических явлений, которые происходят при размножении в организме патогенных микробов. Не следует отождествлять понятия «инфекция» и «инфекционная болезнь». Инфекционная болезнь – наиболее яркое клиническое проявление инфекционного процесса. Нельзя путать понятия «болезнь» и «заболевание».

Болезнь – нарушение нормальной жизнедеятельности организма, развивающаяся в ответ на действие чрезвычайных раздражителей внешней и внутренней среды и проявляющаяся в функциональных и органических нарушениях физиологических систем с одновременной мобилизацией защитно-адаптивных механизмов.

Заболевание – начало болезни, появление ее первых признаков.

Инфекционные болезни характеризуются и отличаются от других болезней неинфекционного характера следующими признаками:

- специфической причиной (живой возбудитель);
- заразностью и склонностью к распространению;
- наличием инкубационного периода;
- специфическими реакциями организма (образование антител, аллергия и др.);
- приобретением переболевшим организмом иммунитета;
- не передаются по наследству;
- циклическостью (стадийностью) инфекционного процесса.

Динамика инфекционного процесса. В течении инфекционного процесса различают следующие периоды: инкубационный, продромальный, развития и исхода (угасания) болезни.

Инкубационный период — время от момента внедрения микроба в организм до появления первых признаков болезни. Данный период составляет от нескольких часов (ботулизм, сибирская язва) до нескольких дней (эшерихиоз, листериоз), месяцев и даже лет (бруцеллез, туберкулез). В это время происходит размножение и накопление микробов в организме животного. Они начинают выделяться во внешнюю среду, что приводит к заражению других животных.

Продромальный период, или *период предвестников*, — характеризуется появлением общих, неспецифических (нехарактерных) признаков болезни: повышение температуры тела, снижение аппетита, угнетение и др. Длится период от нескольких часов до 4–5 сут, иногда нескольких недель. Например, при роже свиней он составляет несколько часов, при туберкулезе — несколько недель.

Период развития болезни — появляются характерные специфические для конкретной болезни клинические признаки. Например, при роже свиней наблюдают воспалительную эритему кожи, при столбняке — ригидность мышц, эмфизематозном карбункуле — шумящие карбункулы в мышцах и т. д. В этот период развитие инфекционного процесса достигает максимума. Макроорганизм наводнен микробами, которые в значительном количестве выделяются во внешнюю среду. Больные животные — основной источник патогенных микробов.

Период исхода болезни у животного характеризуется завершением инфекционного процесса либо его переходом в другую форму течения. Исходами инфекционной болезни могут быть выздоровление, переход в хроническую форму или гибель животного. Выздоровление представляет собой благоприятный исход инфекционной болезни, ему предшествует снижение интенсивности клинических признаков и постепенное восстановление функций организма. При этом некоторое время может продолжаться бактерионосительство и выделение микробов в окружающую среду. Вместе с тем болезнь может приобретать хроническое течение, т. е. возбудитель может длительное время пребывать в организме (например, при туберкулезе, бруцеллезе, сальмонеллезе). Наиболее неблагоприятным исходом болезни является гибель животного.

8.2. Пути проникновения микробов в организм и их распространение

Основным источником патогенных микробов являются больные животные, выделяющие их с мочой, калом, молоком, мокротой и т. д.

Существуют следующие пути проникновения микробов в организм:

контактный — проникновение возбудителей инфекционных болезней осуществляется при прямом и непрямом контакте больного животного со здоровым. Например, кампилобактерии попадают в организм здорового животного при половом акте (прямой контакт) или при искусственном осеменении спермой больных животных (непрямой контакт);

алиментарный — попадание микробов в организм животного при приеме контаминированных возбудителями болезни кормов и воды;

аэрогенный — проникновение патогенов в организм через дыхательные пути вместе с воздухом, содержащим капельки влаги (аэрозоль) и пылевые частицы;

трансмиссивный — внедрение микробов через укусы кровососущих насекомых (клещи, вши, блохи, пухоеды и др.) и некоторых грызунов;

трансовариальный — это передача возбудителя зародышу с лецитиновой фракцией желтка яйца;

внутриутробный — проникновение возбудителя болезни через плаценту в плод.

Место проникновения микробов в организм называют входными воротами. В организме животного микробы могут распространяться гематогенным путем — с током крови по кровеносным сосудам, лимфогенным — с током лимфы, нейрогенным — по нервной ткани, путем соприкосновения больной ткани или органа со здоровой тканью или органом.

Микробы могут распространяться по продолжению однородной ткани, например при инфицировании верхних дыхательных путей по слизистой оболочке гортани и бронхов они проникают в легкие.

Некоторые виды микробов способны относительно легко размножаться в определенной ткани организма, что называется тропизмом. Например, возбудитель туберкулеза обладает тропизмом к легочной ткани, листериоза — к нервной, эмкара — к мышечной.

Рассматривая вопросы, касающиеся распространения микробов в организме, необходимо остановиться на таких понятиях, как бактери-

смия, септицемия, токсинемия, септикопиемия, бактерионосительство, пиемия.

Бактериемия — состояние, при котором микробы находятся в крови непродолжительное время и переносятся ею в другие органы и ткани (например, при сепсе, туберкулезе, стрептококкозе).

Септицемия — состояние, когда микробы продолжительное время находятся в крови и размножаются в ней, вызывая тяжелое течение болезни, которое часто заканчивается гибелью животного. При септицемии микробы быстро размножаются во всех органах и тканях, вызывая воспалительные процессы в них, что нарушает жизнедеятельность организма в целом. Принципиально при всех инфекционных болезнях может наступить сепсис.

Токсинемия — характеризуется тем, что микробы, проникнув в организм, размножаются в поврежденной ткани, оставаясь в ней, выделяя токсины, которые всасываются в кровь и вызывают отравление организма (например, при столбняке, ботулизме).

Септикопиемия — сочетание явлений сепсиса и пиемии.

Бактерионосительство — скрытое состояние инфекции, т. е. наличие возбудителя болезни в организме клинически здорового животного. Бактерионосители могут быть скрытыми источниками выделения патогенных микробов во внешнюю среду.

Пиемия (от гр. *piou* — гной) — явление, характеризующееся распространением микробов по кровяному руслу с образованием множественных абсцессов в различных органах и тканях (например, при мыте, сине лошадей).

8.3. Классификация инфекций

Инфекции классифицируют по:

происхождению — различают эндогенные и экзогенные инфекции. Причиной эндогенных (аутоинфекций) являются условно-патогенные микроорганизмы (кишечная палочка, сальмонеллы, пастереллы и др.), а экзогенных — патогенные микробы, проникающие в организм из внешней среды;

количеству возбудителей — инфекции могут быть простыми (моноконфиссии) — один возбудитель и смешанными — два-три возбудителя. Такие инфекции называют еще ассоциированными или полиинфекциями (например, сальмонеллез + пастереллез, сальмонеллез + колибактериоз и др.);

локализации возбудителя — различают местные (очаговые), генерализованные (септические) и токсикоинфекции. Местные инфекции характеризуются развитием воспалительного процесса в месте проникновения возбудителя (абсцесс, флегмона и др.). Воспаление носит строго ограниченный характер.

Генерализованная инфекция представляет собой процесс распространения и размножения возбудителя болезни во всех органах и тканях.

Токсикоинфекция характеризуется размножением возбудителя на месте внедрения и интоксикацией организма в результате проникновения токсинов микробов в кровеносную систему;

выраженности клинических признаков — инфекции могут быть типичными, атипичными, бессимптомными. Типичными являются инфекции, проявляющиеся характерными для определенной болезни клиническими признаками. Атипичные инфекции протекают в abortивной и стертой формах. При abortивной форме наблюдают легкое течение болезни животного в короткий срок. При стертой форме инфекции болезнь проявляется при отсутствии типичных клинических признаков.

Бессимптомная (латентная, скрытая, инаппарантная) инфекция не проявляется клиническими симптомами несмотря на присутствие микробов в организме, где они размножаются и выделяются во внешнюю среду;

характеру и продолжительности течения — различают сверхострые инфекции — от нескольких часов до суток, острые протекают быстро в течение 1–7 сут, подострые длятся от 2 до 7 нед., хронические — от 3–4 мес. до нескольких лет;

причинам и условиям проявления — различают реинфекцию, рецидив, суперинфекцию и секундарную инфекцию.

Реинфекция — инфекция, которая развивается в результате повторного проникновения в организм животного патогенных микробов — возбудителей недавно завершившейся болезни (дизентерия, туберкулез).

Рецидив — инфекция, возникающая вследствие активизации сохранившихся в организме возбудителей недавно перенесенной болезни (туберкулез, бруцеллез). Периоды времени между рецидивами принято называть ремиссиями.

Суперинфекция (сверхинфекция) развивается в случае проникновения в организм дополнительных порций микробов-возбудителей в условиях активного развития инфекционного процесса.

Секундарная (вторичная) инфекция возникает на фоне развивающейся моноинфекции в результате проникновения в организм патогенных микробов другого вида. Чаще всего возбудителями вторичных инфекций являются условно-патогенные микробы. Например, при чуме свиней может возникнуть пастереллез;

механизму передачи – инфекции делят на кишечные (колибактериоз, сальмонеллез), респираторные (туберкулез, пастереллез), кровяные (Ку-лихорадка, туляремия), инфекции кожных покровов и слизистых оболочек (трихофития, сибирская язва);

количеству пораженных животных и территориальному распространению – инфекции подразделяют на спорадии, энзоотии, эпизоотии, панзоотии.

Спорадия (от гр. *spradikas* – единичный, случайный) – это заболевание единичных животных, немногие случаи болезни, обычно не связанные между собой единым источником возбудителя инфекции.

Энзоотия (от гр. *en* – в, внутри, *zoon* – животное) – инфекция, протекающая одновременно у группы животных, в пределах фермы, хозяйства. Инфекционная болезнь не имеет тенденции к широкому распространению и возникает, как правило, без заноса возбудителя извне.

Эпизоотия (от гр. *epi* – на, *zoon* – животное) – инфекция, охватывающая большое количество животных, имеющая распространение в пределах района, области, республики и даже страны.

Панзоотия (от гр. *pan* – все, *zoon* – животное) – инфекция, охватывающая очень большое количество животных в пределах республик, стран.

Остановимся на значении употребляемых в учебной и научной литературе таких терминов, как зоонозы, антропонозы, сапронозы.

Термин «зоонозы» произошел от гр. слов *zoon* – животное, *nosos* – болезнь. Изначально зоонозы подразделяли на четыре группы:

антропозоонозы – передача возбудителей от человека к животным;

зооантропонозы – передача от животных к человеку;

амфиксенозы – передача возбудителей в обоих направлениях от человека животным и от животных человеку;

антропонозы – возбудители циркулируют только среди людей.

Тем не менее термин «зоонозы» неоднократно обсуждался на заседаниях Объединенного экспертного комитета по зоонозам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Продовольственной и сельскохозяйственной организации (ФАО) и в окончательной редак-

ции обозначен как болезни, которые естественно циркулируют между позвоночными животными и человеком. Согласно этому определению в понятие «зоонозы» ВОЗ были включены только болезни, общие для животных и человека. Во избежание путаницы понятий другие термины (антропонозы, зооантропонозы) были исключены из научного лексикона. По этой причине инфекционные болезни, специфичные только для животных (например, гемофилезный полисерозит свиней и др.), лишились специального научного термина и обозначаются просто как «болезни животных». В этой связи в ветеринарной медицине термин «зооноз» имеет более широкое трактование, включая также инфекции, специфичные только для животных.

Группа инфекционных болезней, для возбудителей которых главным естественным местом обитания являются абиотические (неживые) объекты окружающей среды, получила название сапронозы. Их изучением занимается сапронозология. К числу сапронозов относят такие инфекционные болезни, как ботулизм, сибирская язва и некоторые другие.

Группа инфекционных болезней, возбудители которых способны паразитировать в естественных условиях только в организме человека, называются антропонозами. К их числу относят специфичные исключительно для человека инфекции – проказа, чума человека и др.

8.4. Факторы, влияющие на возникновение инфекций

Возникновение инфекций зависит от трех взаимодействующих факторов:

- степень патогенности возбудителя инфекции;
- иммунобиологическое состояние организма;
- условия внешней среды, определяющие взаимоотношения микро- и макроорганизма.

Все микроорганизмы различны по своей способности вызывать инфекционный процесс у животных и человека, т. е. по патогенности.

Патогенность (от гр. *patos* – страдание, болезнь, *genos* – рождение), или болезнетворность, – потенциальная способность данного вида микроорганизмов вызывать инфекционный процесс в чувствительном к ним макроорганизме. Это видовой генетический признак. По данному признаку микроорганизмы подразделяют на патогенные, условно-патогенные, сапрофиты.

Степень или меру патогенности данного штамма микроорганизмов называют *вирулентностью* (от лат. *virulentus* — ядовитый). Это индивидуальный признак. Вирулентность можно определять. За единицы измерения вирулентности приняты: минимальная смертельная доза (ДЛМ), безусловно смертельная доза (ДСЛ), 50%-я летальная доза (ЛД₅₀) и 50%-я инфицирующая доза (ИД₅₀).

Минимальная смертельная доза (*dosis letalis minima*) — наименьшее количество микробов или их токсинов, вызывающих гибель большинства животных (95 %), взятых в опыт. Поскольку чувствительность различных животных к патогенному микробу различна, была введена как единица измерения вирулентности безусловно смертельная доза (*dosis certa letalis*), вызывающая гибель 100 % зараженных животных.

Наиболее точной является средняя летальная доза (ЛД₅₀) — это наименьшая доза микробов, губящая половину опытных животных.

Существует еще понятие инфицирующей дозы (ИД₅₀) — минимальное количество живых микробов или их токсинов, которое вызывает соответствующую инфекционную болезнь у 50 % зараженных животных, взятых в опыт.

Штаммы любого вида микробов могут быть подразделены на высоко-, слабо- и авирулентные. Авирулентные не способны вызывать болезнь. Слабовирулентные в основном условно-патогенные могут вызывать болезнь при снижении резистентности организма, при иммунодефицитах и большой дозе инфекционного агента. Высоковирулентные микроорганизмы даже в малых дозах могут индуцировать болезнь со смертельным исходом у иммунологически здоровых животных и людей.

Вирулентность у разных видов микробов в отношении различных видов животных различна. Например, 2–3 микобактерии туберкулеза при введении их в трахею морской свинки приводят к развитию инфекционного процесса и ее гибели. Внутривентральное введение 1–2 микробных клеток *S. cholerae suis* белым мышам вызывает их падеж в течение 3–5 сут.

Вирулентность микроорганизмов связана с их токсигенностью и инвазивностью.

Токсигенность (от гр. *toxicum* — яд, от лат. *genus* — происхождение) — способность микробов образовывать токсины, которые изменяют метаболизм и таким образом вредно действуют на организм.

Инвазивность (от лат. *invasion* — нашествие, нападение) — способность микробов преодолевать естественные барьеры организма, проникать в органы, ткани и полости, размножаться в них, подавляя защитные силы макроорганизма.

Патогенность микроорганизмов обуславливается определенными факторами, к которым относят: а) микробные ферменты, обеспечивающие проникновение и распространение микробов в организме; б) поверхностные структуры бактерий, обладающие антифагоцитарным действием; в) факторы патогенности с токсической функцией.

К *микробным ферментам* относят гиалуронидазу, фибринолизин, нейраминидазу, коллагеназу, коагулазу, лецитиназу, дезоксирибонуклеазу.

Для того чтобы проникнуть в макроорганизм, патогенный микроб должен преодолеть его слизистые оболочки, кожные покровы и другие тканевые барьеры. В основе прохождения через ткани лежит молекулярное взаимодействие ферментных систем возбудителя с веществами, из которых построены тканевые структуры макроорганизма. Микробы продуцируют ферменты, способные деполимеризовать основные вещества тканей, увеличивая их проницаемость, что способствует проникновению и распространению бактерий в организме.

Фермент гиалуронидаза вызывает гидролиз гиалуроновой кислоты — основного компонента соединительной ткани. Гиалуронидазная активность обнаружена у патогенных микробов, например у стафило-, стрепто- и пневмококков и др.

Фибринолизин — фермент, растворяющий сгусток фибрина, который образуется в процессе воспаления и препятствует проникновению микробов в глубь тканей (например, гемолитические стрептококки, иерсинии).

Нейраминидаза — фермент, расщепляющий нейраминную (сиаловую) кислоту, которая входит в состав поверхностных рецепторов клеток слизистых оболочек, что делает их уязвимыми для взаимодействия с микробами и токсинами. Этот фермент продуцируют, например, иерсинии, пастереллы, вибрионы.

Коллагеназа — разрушает коллаген мышечных волокон, что ведет к интенсивному расплавлению мышечной ткани, например при злокачественном отеке, эмкаре.

Коагулаза — фермент, свертывающий плазму крови. Например, этот фермент, вырабатываемый патогенными стафилококками, способствует образованию фибриновых барьеров вокруг стафилококковых поражений, что обеспечивает длительное сохранение бактерий в тканях. Под влиянием коагулазы на поверхности клеток стафилококка откладывается фибрин, что затрудняет их фагоцитоз и лизис.

Фермент лецитиназа действует на лецитин мембран мышечных волокон, эритроцитов и других клеток.

Дезоксирибонуклеаза (ДНКаза) – фермент, деполимеризующий ДНК.

Пусковым моментом инфекционного процесса являются адгезия и колонизация. Этот процесс высокоспецифичен, поскольку происходит в результате комплементарного взаимодействия макромолекул на поверхности микроба с рецепторами эукариотической клетки-хозяина. Адгезия обуславливает чувствительность хозяина к микробу и органотропность микробов. Структуры микроба, ответственные за прилипание (прикрепление), т. е. связывание с клетками хозяина, называют адгезинами. Адгезинами у патогенных микробов являются фимбрии, риботейховые кислоты, липопротеиды, липополисахариды, например штаммы К-88, К-99 эшерихий имеют пили общего типа, с помощью которых они прикрепляются к эпителиальным клеткам слизистой оболочки кишечника. Благодаря этому они могут быстро размножаться на поверхности слизистой, т. е. колонизировать ее. Адгезия микробов – сложный процесс, в котором участвуют электростатические и гидрофобные связи: чем выше гидрофобность поверхности бактерии, тем прочнее ее адгезия с клеткой хозяином.

К *поверхностным структурам*, обладающим антифагоцитарным действием, относят капсульные полисахариды и полипептиды микробов, К- и Vi-антигены, входящие в состав микрокапсул энтеробактерий, корд-фактор возбудителей туберкулеза, слизистое вещество *Pseudomonas aeruginosa*, М-протеин β -гемолитических стрептококков группы А, А-протеин стафилококков и другие структуры микробных клеток. Все эти структуры создают механический барьер, экранирующий области связывания микробов с рецепторами фагоцитирующих клеток, т. е. препятствующий фагоцитозу. Антифагоцитарные свойства микробов обусловлены также образованием ими веществ, подавляющих хемотаксис фагоцитов.

К *факторам патогенности* относят бактериальные токсины. По физико-химической структуре и биологическим свойствам их делят на экзотоксины и эндотоксины. Экзотоксины являются высокоактивными ядами, выделяемыми микроорганизмами в окружающую среду. К экзотоксинам относят гемолизин, лейкоцидин, нейротоксин, цитротоксин, гистотоксин. Описано около 100 бактериальных токсинов различающихся по молекулярной массе, химической структуре, рецепторам к различным клеткам макроорганизма, биологической активности и другим свойствам. По химической природе экзотоксины

являются термолабильными белковыми веществами. Механизм действия белковых токсинов сводится к повышению проницаемости мембраны эритроцитов, лейкоцитов и других клеток или к блокаде синтеза белка и других биохимических процессов в клетках либо к нарушению взаимосвязи и взаимодействия между клетками.

Эндотоксины тесно связаны с микробной клеткой и высвобождаются только при ее гибели или раздражении. Они содержатся преимущественно в грамотрицательных микробах. По химической природе относятся к липополисахаридам (ЛПС), обладают выраженными антигенными свойствами (О-антиген). В отличие от экзотоксинов более устойчивы к повышенной температуре. Между экзо- и эндотоксинами существуют различия (таблица).

Таблица. Различия между экзо- и эндотоксинами

Экзотоксины	Эндотоксины
Легко выделяются во внешнюю среду, являются ядами высокой активности, избирательно поражают отдельные органы и ткани, обладают выраженными антигенными свойствами, вызывают образование в организме антитоксинов	Прочно связаны с микробной клеткой, менее ядовиты, избирательное воздействие на органы и ткани не наблюдается или же оно выражено слабо. Обладают слабо выраженными антигенными свойствами. Атисыворотки к ним характеризуются невысокой активностью
Представляют собой протеины, обладают свойствами ферментов, отдельные получены в кристаллическом виде, термолабильны, при 38–40 °С быстро разрушаются протеолитическими ферментами, под воздействием формалина переходят в анатоксины	Представляют собой различные химические комплексы (глицидолипоиды, полисахаридолипоиды-протеины), термостабильны, сравнительно устойчивы к действию протеолитических ферментов, при действии формалина токсичность снижается незначительно

Вирулентность микроорганизмов можно изменять физическими, химическими и биологическими факторами.

Ослабить вирулентность можно выращиванием бактерий на искусственных питательных средах, культивированием при высокой температуре, воздействием ультрафиолетового и рентгеновского облучения, действием различных химических веществ, антибиотиков, бактериофагов, путем многократного пассажа через организм животных и т. д.

Усилить вирулентность бактерий можно пассажем через животных, созданием ассоциации с другими микробами, выращиванием в коллоидных мешочках в брюшной полости лабораторных животных.

Возникновение инфекции зависит также от иммунобиологического состояния организма животного и условий его обитания. Иммунобиологическое состояние организма определяют неспецифические анатомо-физиологические структуры организма и высокоспециализированная иммунная система.

Устойчивость организма к инфекционному агенту зависит от состояния нервной системы, породы, возраста, пола животных, индивидуальных особенностей иммунологической толерантности.

Вызванное любой причиной ослабление организма (голодание, температурный фактор, неудовлетворительное водопоеание, утомление, нарушение условий содержания и т. д.) способствует возникновению инфекции и развитию инфекционного процесса.

Раздел 2 ИММУНОЛОГИЯ

Глава 9 ВВЕДЕНИЕ В ИММУНОЛОГИЮ



9.1. Предмет и история развития иммунологии

Иммунология – наука об иммунитете – изучает генетические, молекулярные и клеточные механизмы реагирования организма на чужеродные субстанции, именуемые антигенами.

Антигены (от гр. *anti* – против, *genos* – происхождение) – это вещества, которые несут признаки генетически чужеродной информации и при попадании в организм вызывают развитие специфических иммунологических реакций (образование плазматических клеток, антител, гиперчувствительность немедленного типа и др.). Кроме того, они стимулируют какой-либо тип иммунного ответа с образованием продуктов, специфически взаимодействующих с антигеном и обеспечивающих защиту организма.

Иммунологические реакции способствуют проявлению основной функции иммунитета – сохранению постоянства внутренней среды организма (гомеостаза).

Количественное и качественное постоянство внутренней среды, называемое *гомеостазом*, обеспечивается процессами саморегулирования во всех живых системах. Иммунитет – одно из проявлений гомеостаза.

Вместе с тем иммунология изучает не только иммунитет, но и иммунную систему, т. е. систему органов и клеток, осуществляющую реагирование против чужеродных субстанций. Эта система обеспечивает иммунитет — защиту от бактерий, вирусов, паразитов, элиминацию отмирающих мутационно изменившихся клеток тела, противораковую защиту.

Иммунология выросла из микробиологии. Именно благодаря изучению микробов и болезней, ими вызываемых, была основана наука иммунология. Принято считать, что начало иммунологии положил английский врач Э. Дженнер (1749–1823), который впервые предложил прививки против оспы человека. Он заметил, что во время эпидемий человеческой оспы чаще всего не заболевают доярки, переболевшие коровьей оспой. В подтверждение своих наблюдений в 1796 г. он привил 8-летнему мальчику сначала коровью оспу, а спустя 1,5 мес. — оспу человека, и мальчик не заболел. Однако ни Э. Дженнер, ни медицина того времени не увидели в этом способе всеобщего принципа предохранения от других инфекционных болезней. В 1978 г. ВОЗ официально объявила о ликвидации оспы благодаря всеобщему оспопрививанию на земном шаре, которое прекращено во многих странах, в том числе и в Республике Беларусь.

Датой рождения иммунологии считают 1881 г. Отцом этой науки явился французский ученый Л. Пастер. В 1880 г. он разработал вакцину против холеры кур, затем против сибирской язвы, рожи свиней, бешенства. Ослабленные культуры микроорганизмов, но способные при их введении в организм вызывать формирование иммунитета Пастер назвал *вакцинами* (от лат. *vacca* — корова), а метод профилактики — *вакцинацией*.

К концу XIX в. и в начале XX в. были сделаны многие важные открытия, которые заложили фундамент иммунологии, в частности обнаружены антитела: антитоксины, бактериолизины, агглютинины, преципитины. На основе этих достижений П. Эрлих (1854–1915) создал теорию *гуморального иммунитета*.

Необходимо отметить, что первыми, кто пролил свет на один из механизмов невосприимчивости к инфекции, были Э. фон Беринг и К. Шибасабуро. Они установили, что сыворотка от мышей, предварительно иммунизированных столбнячным токсином, введенная интактным животным, защищает последних от смертельной дозы токсина. Образовавшийся в результате иммунизации сывороточный фактор — антитоксин — представлял собой первое обнаруженное специфическое антитело. Работа этих ученых положила начало изучению механизмов гуморального иммунитета.

В 1883 г. И. И. Мечников сделал первое сообщение по фагоцитарной теории иммунитета на съезде врачей и естествоиспытателей в Одессе. Он

утверждал, что у животных и человека есть клетки, способные поглощать все «чужое», не свойственное организму: инертные и отмирающие частицы тела, различные микроорганизмы, т. е. И. И. Мечников открыл явление фагоцитоза, обосновал клеточную теорию иммунитета.

В 1908 г. П. Эрлиху и И. И. Мечникову была присуждена Нобелевская премия за выдающиеся открытия по иммунитету.

Ж. Борде и Н. Я. Чистович в 1899 г. выявили, что не только микробы, но и чужеродные ткани, например эритроциты барана, при парентеральном введении их другим животным вызывают образование антител. Эти ученые стали основоположниками неинфекционной иммунологии. В дальнейшем Ж. Борде совместно с О. Жангу описал реакцию связывания комплемента и выяснил роль последнего в реакции иммунитета.

В 1901 г. К. Ландштейнер открыл группы крови у человека, этим открытием он положил начало учению о тканевых антигенах.

В 1902 г. Ш. Рише установил феномен анафилаксии, а в 1905 г. К. Пирке ввел в иммунологию понятие «аллергия». В 1953 г. П. Медовар и М. Гашек независимо друг от друга открыли феномен иммунологической толерантности. Иммунологическая толерантность – это распознавание чужого и специфическая терпимость к нему, тогда как иммунитет – распознавание чужого и нетерпимость к нему.

В 1958 г. Ф. Бернет разработал клонально-селекционную теорию иммунитета. Сущность этой теории – один клон лимфоцитов способен реагировать только на одну антигенную, специфическую детерминанту.

В 1959 г. Ж. Доссе с соавторами открыли систему антигенов гистосовместимости человека, а в 1962 г. Ж. Миллер установил роль тимуса как первичного лимфоидного органа. В 1963 г. Б. Венащераф открыл гены гистосовместимости – *Ir*-гены. Тогда же, в 60-е гг. XX в., в основном благодаря работам Р. Портера и Дж. Эдельмана удалось расшифровать молекулярную структуру антител и их антигенсвязывающих центров.

Обладателями Нобелевской премии 1984 г. стали Н. Эрне, Г. Келлер и С. Мильштейн, которыми была предложена методика получения моноклональных антител. В это же время прогресс молекулярной биологии позволил С. Тонегаву показать, как генетические перестройки в хромосомах лейкоцитов обеспечивают фантастически богатое многообразие антител и антигенраспознающих рецепторов, что стало значимым открытием в области иммунологии.

П. Дохерти и Р. Цинкернагель стали обладателями Нобелевской премии 1996 г. за исследования, доказавшие участие белков главного комплекса гистосовместимости в представлении чужеродных антигенов иммунокомпетентным клеткам. Они показали, что распознавание чужеродного антигена в инфицированных клетках («измененного своего») происходит лишь после включения его фрагмента в состав молекул главного комплекса гистосовместимости, ответственных за презентацию антигена Т-лимфоцитам.

Большим достижением в области иммунологии XX в. явилось определение в иммунной системе двух совместно функционирующих клеточных популяций: тимусзависимой (Т-лимфоциты) и независимой в своем развитии от тимуса (В-лимфоциты). Взаимодействие Т- и В лимфоцитов и совместная их работа с макрофагами обеспечивают всю «гамму иммунологических реакций, развивающихся в ответ на генетически чужеродные субстанции».

Иммунология как наука изучает иммунную систему и ее органы, конститутивные (врожденные) и индуцибельные факторы защиты организма, антигены, антитела, антителогенез, взаимодействие клеток в иммунном ответе и многие другие вопросы.

Иммунология самостоятельная наука с самостоятельными институтами, журналами, национальными и международными обществами иммунологов. Международный союз иммунологических обществ объединяет более 14 000 иммунологов 30 стран.

Главной задачей современной иммунологии является выявление биологических механизмов иммуногенеза на клеточном и молекулярном уровнях, исследование структур и функций лимфоидных клеток, свойств и характера физико-химических процессов, протекающих на их мембранах, в цитоплазме и органоидах. Подобного рода задачи стоят перед так называемой теоретической иммунологией, в то время как прикладная иммунология, опираясь на результаты исследований теоретического плана, имеет в качестве главных задач разработку новых и улучшение уже имеющихся вакцинных препаратов, поиск подходов к применению регуляторных молекул (прежде всего интерлейкинов и других цитокинов) в качестве лекарственных средств при инфекционных болезнях и при иммунопатологических состояниях, разработку новых и усовершенствование уже существующих иммунологических методов исследования, применяемых не только в медицинской практике, но и во всех областях современной биологии.

9.2. Задачи иммунологии. Иммунитет и его виды

Задачи иммунологии. Основными задачами иммунологии являются

предупреждение еще не ликвидированных болезней человека и животных (грипп, туберкулез, сальмонеллез и др.);

поиски путей стимуляции иммунитета против искусственных и природных токсинов и антигенов;

изыскание средств борьбы с иммунодефицитами, обуславливающими тяжелое течение инфекций и различные осложнения (пневмонии, маститы, эндокардиты и др.);

предупреждение и лечение аллергий;

иммунопрофилактика, иммунодиагностика, иммунотерапия опухолей;

изучение закономерностей формирования иммунитета;

разработка и совершенствование методов иммунологической и аллергической диагностики инфекционных болезней;

разработка и совершенствование биопрепаратов (вакцин, гипериммунных сывороток и антигенов) для профилактики, диагностики инфекционных болезней, лечения животных.

Иммунитет и его виды. Под термином *иммунитет* (от лат. *immunitas* — освобождение, избавление от чего-либо) понимают способ защиты организма от генетически чужеродных веществ экзо- и эндогенного происхождения с целью сохранения и поддержания гомеостаза, структурной и функциональной целостности организма, а также биологической индивидуальности и видовых различий.

Существуют различные формулировки главной задачи, миссии, назначения иммунитета. Наиболее четкая и краткая формулировка принадлежит Нобелевскому лауреату Ф. Бернету. По Бернету, главная задача иммунитета — распознавание своего и чужого.

Иммунитет по происхождению подразделяют на врожденный (наследственный) и адаптивный (приобретенный).

Врожденный иммунитет предопределен, детерминирован генетически и передается из поколения в поколение. Например, лошади не болеют ящуром, крупный рогатый скот — сапом, человек — инфекционной анемией лошадей, а лошади не чувствительны к брюшному тифу людей. В основе механизмов врожденного иммунитета к определенным возбудителям лежит отсутствие в клетках организма рецепторов и субстратов, необходимых для адгезии и размножения возбудителя, наличие веществ, блокирующих размножение патогенных микробов.

Врожденный иммунитет может быть:

видовой, присущий определенному виду животных;

породный, присущий определенной породе животных в пределах вида;

индивидуальный, характерный для отдельных особей.

Иммунитет называют относительным, если возможно его нарушение при определенных условиях, например при переохлаждении

куры заболевают сибирской язвой, при перегревании лягушки становятся восприимчивыми к столбняку. Напротив, иммунитет считают абсолютным, если заболевание не удается вызвать любыми неблагоприятными условиями или введением больших количеств культуры патогенного микроба.

Адаптивный иммунитет возникает в течение жизни. Он бывает естественным и искусственным, каждый из них может быть активным и пассивным.

Приобретенный естественный иммунитет возникает в процессе жизни животного в результате контакта с патогенными микробами. Естественно приобретенный активный иммунитет формируется после выздоровления. Пассивный (колостральный, молозивный) — при поступлении антител в организм новорожденного с молозивом матери или же при их проникновении в плод через плаценту (трансплацентарный иммунитет). У птиц материнские антитела плоду могут передаваться трансовариально, т. е. с лецитиновой фракцией желтка. Такой вид иммунитета называют трансовариальным. Естественно приобретенный иммунитет может сохраняться 1–2 года, а при некоторых болезнях пожизненно (например, у собак, переболевших чумой, у овец — оспой). Естественно приобретенный пассивный иммунитет может быть напряженным в течение нескольких недель и даже месяцев.

Искусственно приобретенный активный иммунитет индуцируется введением в организм вакцин (живых, инактивированных, химических). Его продолжительность от нескольких месяцев до нескольких лет, что зависит от качества вакцины, ее антигенного состава, индивидуальных особенностей организма.

Пассивный искусственно приобретенный иммунитет возникает в организме в результате введения гипериммунных сывороток или же сывороток реконвалесцентов, иммуноглобулинов через несколько часов и продолжается 2–3 недели.

Различают и другие виды иммунитета, в частности противоинфекционный и неинфекционный.

Противоинфекционный иммунитет — совокупность реакций системы иммунитета, направленных на удаление инфекционного агента — возбудителя болезни. В зависимости от вида инфекционного агента различают иммунитет:

антибактериальный, который может быть стерильным и нестерильным. При стерильном — микроорганизмы из организма удаляются, а иммунитет сохраняется, при нестерильном — для поддержания

иммунитета необходимо присутствие в организме небольшого количества микроорганизмов (туберкулез, бруцеллез, сифилис);

антитоксический — против продуктов жизнедеятельности микробов — токсинов;

противовирусный — против вирусов или их антигенов;

противогрибковый — против патогенных грибов;

противопаразитарный — против патогенных простейших и гельминтов.

Иммунитет всегда конкретен, направлен против определенного возбудителя болезни. Эта конкретность и специфичность определяются антителами и рецепторами иммунных Т-клеток против соответствующих антигенов.

Неинфекционный иммунитет — совокупность реакций систем иммунитета, направленных на неинфекционные биологически активные агенты — антигены. В зависимости от природы этих антигенов различают:

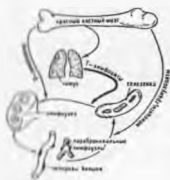
аутоиммунитет — на собственные антигены (белки, липопротеиды, гликопротеиды). Он обусловлен нарушением распознавания «своих» молекул, когда они воспринимаются системой иммунитета как «чужие» и разрушаются;

трансплантационный — возникает при пересадке органов и тканей от донора к реципиенту в случаях переливания крови;

противоопухолевый — это реакции системы иммунитета на антигены опухолевых клеток.

По реагирующим системам различают местный и общий иммунитет. В местном иммунитете участвуют неспецифические факторы защиты, а также секреторные иммуноглобулины, которые находятся на слизистых оболочках кишечника, бронхов, носовой полости и т. д.

В зависимости от механизмов защиты организма различают также гуморальный и клеточный иммунитет. Гуморальный иммунитет обусловлен выработкой в зараженном организме специфических антител, клеточный иммунитет — образованием специфических реагирующих с возбудителем (антигеном) Т- лимфоцитов.



10.1. Иммунная система и ее органы

Защиту от всего чужеродного выполняет *иммунная система*, представляющая собой совокупность органов, тканей и клеток, деятельность которых обеспечивает сохранение генетического постоянства внутренней среды организма — иммунного гомеостаза.

Характерными признаками иммунной системы, отличающими ее от других систем организма, являются:

способность дифференцировать генетически «свое» от генетически «чужого»;

сохранение памяти о первичном контакте с чужеродным антигеном;

клональная организация иммунокомпетентных клеток, проявляющаяся в способности отдельного клеточного клона реагировать только на одну из множества антигенных детерминант.

Иммунная система состоит из центрального и периферического отделов. *Центральный отдел* у млекопитающих содержит органы (первичные, или центральные, лимфоидные органы), в которых происходят дифференцировка и созревание лимфоцитов: костный мозг и тимус (вилочковая железа).

Периферический отдел иммунной системы образован вторичными (периферическими) лимфоидными органами: неинкапсулированными лимфоидными структурами, связанными со слизистыми оболочками, диффузно распределенными лимфоидными и миелоидными клетками и инкапсулированными (т. е. истинными, морфологически изолированными) лимфоидными органами. Лимфоидные органы взаимосвязаны путями рециркуляции лимфоцитов (лимфатическая и кровеносная системы). Выделяют три разновидности инкапсулированных лимфоидных органов — лимфати-

ческие узлы, селезенка и пейеровы бляшки. Все лимфоидные органы организованы сходным образом.

Установлено, что иммунные функции выполняет нейроглия центральной нервной системы и кожа.

Центральными органами иммунной системы у птиц являются костный мозг, тимус, бурса Фабрициуса, а периферическими — селезенка, железа Гардера, слезная железа, лимфоидные скопления в пищеварительном тракте и органах дыхания (рис. 10.1).



Рис. 10.1. Иммунная система птиц (по П. А. Красочко и др.)

Отсутствие четкой лимфатической системы с лимфатическими узлами у птиц компенсируется рассеянными по всему организму скоплениями лимфоидной ткани, способной активно реагировать на любой антигенный стимул.

Костный мозг расположен в губчатом веществе костей. В нем находится самоподдерживающаяся популяция стволовых клеток — родоначальниц всех клеток крови. Они выходят из костного мозга в кровотоки, поступают в тимус и другие лимфоидные органы, в которых осуществляется их дифференцировка, сопровождающаяся размножением Т- и В-лимфоцитов. Стволовые клетки служат своего рода «семенным материалом» для всех лимфоидных тканей. Костный мозг продуцирует миелопептиды, действие которых заключается в пролиферации и активации антителообразующих клеток. В последние годы считается,

что В-система лимфоидных клеток у млекопитающих возникает из кроветворных стволовых клеток непосредственно в костном мозге.

Тимус возникает у млекопитающих на 6-й неделе внутриутробного развития. Он состоит из двух долей, которые делятся на более мелкие дольки. Каждая долька состоит из коркового и мозгового слоев. Корковый слой заполнен лимфоцитами (тимоцитами), в мозговом — эпителиальные клетки (тельца Гассала), играющие важную роль в Т-клеточной дифференцировке.

Тимус играет роль эндокринного органа: продуцирует гуморальные факторы, регулирующие иммунные процессы, в первую очередь влияет на предшественников иммунокомпетентных клеток и этапы антигензависимой дифференцировки Т-лимфоцитов. В тимусе происходит «обучение» и дифференцировка Т-лимфоцитов. «Обучение» обеспечивает лимфоцитам способность отличать клетки своего организма от чужеродных или от видоизмененных своих клеток.

Тимус производит также растворимые тимические (или тимусные) гормоны: тимозин, тимулин, тимопоэтин, инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1), тимусный гуморальный фактор, — являющиеся белками (полипептидами) и регулирующие процессы роста, созревания и дифференцировки Т-клеток и функциональную активность зрелых клеток иммунной системы. Секретция тимических гормонов и функция тимуса регулируется глюкокортикоидами — гормонами коры надпочечников, а также растворимыми иммунными факторами — интерферонами, лимфокинами, интерлейкинами, вырабатываемыми другими клетками иммунной системы.

Бурса Фабрициуса — центральный орган иммунной системы у птиц. Представляет собой эктодермальный вырост на дорсальной поверхности клоаки. Сумка, как и тимус, состоит из долек с корковым и мозговым слоями. Среди эпителиальных клеток и ретикулоцитов бурсы расположены большие и малые лимфоциты в виде тяжей, из которых формируются плазматические клетки. Лимфоциты бурсы — предшественники плазмочитов, получили название В-клеток.

Лимфоузлы служат своеобразными фильтрами, улавливающими антигены. Каждый лимфоузел покрыт соединительнотканной капсулой. В лимфоузлах различают кортикальную зону, прилегающую к капсуле, и паракортикальную, отделяющую корковое вещество от мозгового. Кортикальная зона не тимусзависима. Кортикальная зона увеличивается при развитии иммунного ответа по гуморальному типу, паракортикальная — при развитии иммунного ответа по клеточному

типу. В лимфатических узлах после стимуляции АГ происходит пролиферация и дифференцировка Т- и В-лимфоцитов в эффекторные клетки, Т- и В-клетки памяти.

Селезенка — самый крупный орган, выполняющий разнообразные функции. В селезенке различают красную и белую пульпу. В красной находятся эритроциты, белая является типичной лимфоидной тканью. В селезенке, как и в лимфоузлах, имеются Т-клеточная и В-клеточная зоны. Периартериолярные лимфоидные скопления представляют собой Т-зависимые области, в которых 75 % составляют $CD4^+$ -клетки, а 25 % — $CD8^+$ -клетки. В-зависимыми являются фолликулы с зародышевыми центрами. Весь этот слой, насыщенный лимфоцитами, получил название белой пульпы селезенки. Артериолы заканчиваются сосудистыми синусами, вокруг которых сосредоточены макрофаги, дендритные клетки, отдельные лимфоциты и плазматические клетки, что соответствует понятию «белая пульпа селезенки». Селезенка является местом распознавания антигена, антигензависимой пролиферации и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, их активации, а также продукции и секреции специфических антител иммуноглобулинов. Селезенка удаляет из крови утратившие активность эритроциты и лейкоциты.

Важные иммунные функции выполняет *печень*, что вытекает из следующих фактов:

печень — мощный орган лимфопоэза в эмбриональном периоде;

печень синтезирует белки острой фазы (С-реактивный белок и связывающий маннозу лектин), а также белки системы комплемента. В печени содержатся разные субпопуляции лимфоцитов, в том числе уникальные лимфоциты, сочетающие признаки Т- и НК-клеток (НКТ-клетки).

10.2. Лимфоидная ткань слизистых оболочек.

Лимфа и кровь

Лимфоидная ткань слизистых оболочек представляет собой скопления бескапсульной лимфоидной ткани в собственной пластинке слизистых оболочек и в подслизистой ткани пищеварительного тракта, дыхательных и мочеполовых путей. Лимфоидные клетки образуют в них одиночные или агрегированные скопления с центрами размножения. Сами слизистые оболочки пищеварительной, дыхательной и мочеполовой систем содержат дендритные клетки (ДК), необходимые

для поглощения, процессинга и транспорта антигенов в регионарные лимфатические узлы. Скопления лимфоидной ткани, расположенные на собственной пластинке слизистой оболочки пищеварительного тракта, часто распространяются в подслизистый слой. Они имеют форму одиночных фолликулов или сгруппированных узелков. Пейеровы бляшки обычно встречаются в нижней части подвздошной кишки. Покрывающий их эпителий кишечника (эпителий, ассоциированный с фолликулами) способен транспортировать антигены и микроорганизмы в лимфоидную ткань. Эту специализированную функцию выполняют особые эпителиальные клетки, рассеянные среди энтероцитов. Они названы М-клетками, поскольку их поверхность, обращенная в просвет кишечника, образует многочисленные микроскладки.

В глубине слизистой оболочки расположено скопление вторичных лимфоидных фолликулов с крупными центрами размножения. Окружающие тимусзависимые межфолликулярные зоны содержат индигитатные клетки и венулы с высоким эндотелием. Область купола между эпителием, ассоциированным с фолликулами, и самими фолликулами заполнена преимущественно В-клетками, большинство которых относится к клеткам иммунной памяти.

В базолатеральной области М-клеток находятся глубокие инвагинации плазматической мембраны — карманы, в которых располагаются В- и Т-лимфоциты, ДК и макрофаги. Антигены и микроорганизмы подвергаются трансцитозу в эти карманы и далее — в организованную субэпителиальную лимфоидную ткань слизистой оболочки. М-клетки встречаются не только в участках пейеровых бляшек, но и в других лимфоидных образованиях слизистых оболочек.

При местном гуморальном иммунном ответе на уровне слизистой оболочки происходит образование в основном IgA-антител. Секреторные IgA-антитела способны проникать через мембраны эпителиальных клеток для обеспечения защиты от патогенных микроорганизмов.

Лимфа (от лат. *lympha* — чистая вода, влага) — разновидность соединительной ткани. Представляет собой прозрачную бесцветную жидкость, в которой нет эритроцитов и тромбоцитов и много лимфоцитов. (Выделяющаяся из мелких ран лимфа называется в народе *сукровицей*.) Из лимфатических капилляров лимфа поступает в лимфатические сосуды, а затем в протоки и стволы. На пути лимфатических сосудов расположены лимфатические узлы, выполняющие барьерную и иммунную роль. Функции лимфы — возвращение белков, воды, солей, токсинов и метаболитов из тканей в кровь. Лимфатическая систе-

ма участвует в формировании иммунитета, в защите от болезнетворных микроорганизмов. По лимфатическим сосудам при общем снижении активности защитных факторов организма возможно распространение патогенов: простейших, бактерий, вирусов, грибов и др.

Кровь – транспортно-коммуникационный компонент иммунной системы. Она представлена отдельными лимфоидными клетками различного назначения и разной степени зрелости, а также грануло- и моноцитами. Через кровь осуществляется постоянный обмен клеток между различными лимфоидными органами, что обеспечивает функционирование иммунной системы и обуславливает ее высокие адаптивные возможности.

10.3. Клетки иммунной системы

Эффекторными клетками иммунной системы являются лимфоциты, макро- и микрофаги. Все клетки крови, в том числе лимфоциты, возникают из единой гемопоэтической стволовой клетки (ГСК), которая находится у эмбрионов в костном мозге и печени, а у взрослых – только в костном мозге.

Т-клетки. Т-лимфоциты обуславливают клеточный иммунный ответ, а также помогают отвечать на антиген В-лимфоцитам при гуморальном иммунном ответе. Каждый Т-лимфоцит несет на своей поверхности рецептор Т-лимфоцитов (*TCR – T-Cell Receptor*) строго одной специфичности, т. е. взаимодействующий с одним антигеном.

Образующиеся из кроветворной стволовой клетки предшественники Т-лимфоцитов мигрируют в тимус, где происходит антигеннезависимая дифференцировка Т-клеток. Здесь Т-лимфоциты дифференцируются в иммунокомпетентные клетки и приобретают способность к распознаванию антигена. Из тимуса Т-клетки мигрируют по тимусзависимым зонам периферических лимфоидных органов, в первую очередь в лимфоузлы, где заселяют преимущественно Т-зависимую паракортикальную зону.

Тимоциты дифференцируются, как уже отмечалось, из общей клетки-предшественника, которая еще вне тимуса экспрессирует такие мембранные маркеры, как CD7, CD2, CD34 и цитоплазматическую форму CD3.

В процессе дифференцировки Т-лимфоцитов выделяют две основные стадии – антигеннезависимую и антигензависимую.

Коммитированные к дифференцировке в Т-лимфоциты клетки предшественники вначале мигрируют из костного мозга в субкапсулярную зону коры тимуса, где примерно в течение одной недели медленно пролиферируют. На тимоцитах появляются новые мембранные молекулы CD44 и CD25. Затем клетки перемещаются в глубь коры тимуса, молекулы CD44 и CD25 исчезают с их мембраны. На этой стадии начинается перестройка генов β -, γ - и δ -цепей TCR. Если гены γ - и δ -цепей успевают продуктивно, т. е. без сдвига рамки считывания, перестроиться раньше, чем гены β -цепи, то лимфоцит дифференцируется далее как $\gamma\delta$ T. В противном случае происходит экспрессия β -цепи на мембране в комплексе с ρ T α (инвариантной суррогатной цепью, заменяющей на этом этапе настоящую α -цепь) и CD3. Это служит сигналом к прекращению перестройки генов γ - и δ -цепей. Клетки начинают пролиферировать и экспрессировать одновременно CD4 и CD8 — дважды позитивные тимоциты. При этом накапливается масса клеток с уже готовой β -цепью, но с еще не перестроенными генами α -цепи, что вносит свой вклад в разнообразие $\alpha\beta$ -гетеродимеров.

На следующем этапе клетки перестают делиться и начинают перестраивать V α -гены, причем несколько раз в течение 3—4 сут. Перестройка генов α -цепи приводит к необратимой делеции δ -локуса, расположенного между сегментами генов α -цепи. Происходят экспрессия TCR с каждым новым вариантом α -цепи и отбор (селекция) тимоцитов по силе связывания с комплексом МНС-пептид на мембранах эпителиальных клеток тимуса.

При позитивной селекции погибают тимоциты, не связавшие ни одного из доступных комплексов МНС-пептид. В результате позитивной селекции в тимусе погибает около 90 % тимоцитов.

Негативная селекция уничтожает клоны тимоцитов, связывающих комплексы МНС-пептид со слишком высокой аффинностью. Негативная селекция элиминирует от 10 до 70 % клеток, прошедших позитивную селекцию.

Тимоциты, связавшие какой-либо из комплексов МНС-пептид с правильной, т. е. средней по силе, аффинностью, получают сигнал к выживанию и продолжают дифференцировку.

На короткое время с мембраны тимоцитов исчезают обе корецепторные молекулы, а затем одна из них экспрессируется: тимоциты, распознавшие пептид в комплексе с МНС-I, экспрессируют корецептор CD8, а с МНС-II — корецептор CD4. Соответственно на периферию

выходят (в соотношении около 2:1) Т-лимфоциты двух типов: CD8⁺ и CD4⁺. Их функции в предстоящих иммунных ответах различны.

Мигрирующие из тимуса неиммунные Т-лимфоциты (*наивные Т-лимфоциты*) являются короткоживущими.

Антигензависимая дифференцировка происходит в периферических органах иммунной системы только при контакте Т-лимфоцита с АГ (антигеном).

Иммунологические функции CD4⁺-лимфоцитов начинаются с представления им антигена антигенпредставляющими клетками (АПК). Представление состоит в том, что АПК, распознавшая антиген как чужеродный субстрат, входит в контакт с лимфоцитом. Рецепторы последнего воспринимают антиген только в том случае, если одновременно на поверхности АПК находится и собственный антиген этой клетки. Таким антигеном для стимуляции CD4⁺-лимфоцита должен быть антиген главного комплекса тканевой совместимости (МНС) класса II. Такое «двойное распознавание» служит дополнительной гарантией, что лимфоцит не будет активирован одним из собственных антигенов организма, что может привести к развитию аутоиммунной реакции.

Лимфоциты-хелперы (Th, CD4⁺) после воздействия антигена пролиферируют и разделяются на две субпопуляции: Th1 и Th2. Образование Th1 стимулируют преимущественно антигены внутриклеточных паразитов (микобактерии, листерии). Дифференцировке Т-хелперов в Th2 способствуют аллергены, антигены гельминтов. Большинство белковых антигенов стимулирует образование клеток обеих субпопуляций – Th1 и Th2. Формированию Th1 способствуют также интерлейкин ИЛ-12 и гликопротеин CD80, образуемый активированными макрофагами, а Th2 – ИЛ-1 и гликопротеин CD86, образуемый антигенпредставляющими В-лимфоцитами.

Основные отличия субпопуляций состоят в спектре продуцируемых ими интерлейкинов. Интерлейкины, продуцируемые Th1, обуславливают формирование преимущественно клеточных иммунных реакций и воспаления. Интерлейкины – продукты Th2-лимфоцитов – способствуют формированию гуморальных форм иммунного ответа. Поскольку интерлейкины могут обладать антагонистическим действием, Th1-лимфоциты и их продукты оказывают супрессорное действие на реакции, связанные с активностью Th2, и, наоборот, Th2-лимфоциты подавляют реакции, связанные с Th1-клетками. Этим объясняется давно известный антагонизм клеточных и гуморальных иммунологи-

ческих реакций, причем стимуляция и подавление разных форм иммунного ответа могут быть связаны с балансом активности двух групп Т-лимфоцитов. В крови и лимфоидных органах содержатся лимфоциты-хелперы, обозначаемые Th0. Они формируются на первых этапах воздействия антигена на CD4⁺-лимфоциты. Th0 продуцируют лимфокины, присущие как Th1, так и Th2-клеткам, а далее дифференцируются в Th1 либо в Th2-лимфоциты.

В ходе пролиферации Th1 и Th2-лимфоцитов часть из них формирует клетки иммунологической памяти, которые длительно сохраняются в организме и обеспечивают быстрый и сильный ответ на повторное действие антигена. Th1-лимфоциты могут дифференцироваться в эффекторные цитотоксические клетки, реализующие реакции клеточного иммунитета.

CD8⁺-лимфоциты – основные клетки, оказывающие цитотоксическое действие. Они составляют 22–24 % всех лимфоцитов крови и их соотношение с CD4⁺-лимфоцитами равно 1:1,9–1:2,4. Обе эти разновидности Т-лимфоцитов дифференцируются из общих предшественников в мозговом слое тимуса и обладают одинаковыми рецепторами для антигенов, с той лишь разницей, что рецептор CD4⁺-лимфоцита воспринимает антиген от представляющей клетки в комплексе с антигеном главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II, а рецептор CD8⁺-лимфоцита – в комплексе с антигеном МНС класса I. Поскольку антигены МНС (главного комплекса тканевой совместимости) класса II имеются лишь на АПК, а антигены класса I – практически на всех клетках, CD8⁺-лимфоциты вступают во взаимодействие с любыми клетками организма. Основной функцией CD8⁺-лимфоцитов является цитотоксичность, вследствие чего они играют ведущую роль в противовирусном, противоопухолевом и трансплантационном иммунитете. Вместе с тем CD8⁺-лимфоциты могут играть роль супрессорных клеток, подавляющих активность других клеток иммунной системы. Однако в последнее время установлено, что супрессорный эффект свойствен многим видам клеток, поэтому CD8⁺-клетки перестали называть супрессорными клетками и получили название цитотоксических несмотря на то, что цитотоксическими свойствами могут обладать и CD4⁺-лимфоциты. Цитотоксические свойства CD8⁺-лимфоциты приобретают в ходе дифференцировки после контакта с антигеном. Этому способствует интерлейкин ИЛ-2, секретируемый Th1-лимфоцитами. В результате активации синтеза ДНК и митозов формируются два вида CD8⁺-лимфоцитов – клетки памяти и цитоток-

сические лимфоциты (ЦТЛ). Цитотоксическое действие начинается с контакта ЦТЛ с клеткой-«мишенью» и последующего поступления в мембрану клетки белков – перфоринов или цитолизин. Перфорины полимеризуются и создают в наружной мембране клетки-«мишени» отверстия диаметром 5–16 нм, через которые проникают ферменты группы сериновых эстераз, называемые гранзимами. Гранзимы и другие ферменты лимфоцита наносят клетке-«мишени» «летальный удар», вызывая гибель путем апоптоза. Апоптоз возникает вследствие того, что гранзимы вызывают резкий подъем внутриклеточного уровня Ca^{2+} , активацию внутриклеточных эндонуклеаз и разрушение ДНК клетки. Лимфоцит после этого сохраняет способность индуцировать гибель других клеток.

Существует и другой механизм деструкции клеток, обусловленный возможностью контакта гликопротеина CD95 (APO-1), находящегося на поверхности многих клеток организма, с трансмембранным белком, CD95L, экспрессированным на активированных CD8⁺-лимфоцитах. Этот белок, близкий по структуре и действию к лимфотоксину, вызывает апоптоз клеток-«мишеней». Механизм апоптоза через контакт лимфоцита с белком CD95 на поверхности клеток-«мишеней» характерен для нормального функционирования иммунной системы и негативной селекции потенциально-аутореактивных клеток.

В-клетки. Предшественник В-клетки (пре-В-клетка) в ходе антигензависимой дифференцировки стволовых клеток в фабрициевой бурсе у птиц и эквиваленте (костном мозге) у млекопитающих превращается в В-лимфоцит. Последние затем мигрируют в периферические лимфоидные органы: селезенку, лимфатические узлы, лимфоидные пакеты кишечника, где и выполняют свои специфические функции. Зрелые В-лимфоциты имеют на поверхности связанные с мембраной иммуноглобулиновые рецепторы, которые распознают конкретные антигены и взаимодействуют с другими иммунокомпетентными клетками, а также рецепторы к различным медиаторам и гормонам. В-лимфоциты под действием антигенов способны трансформироваться в антителообразующие клетки, которые продуцируют иммуноглобулины всех классов.

Как и все клетки крови, В-лимфоциты берут свое начало от стволовых кроветворных клеток (СКК) красного костного мозга. Их непосредственным предшественником является возникающая при делении СКК стволовая лимфоцитарная клетка (СЛК), которая потенциально способна развиться либо в Т-, либо в В-клетку. Часть образующихся

в красном костном мозге СЛК через короткое время переходит в кровоток и далее перемещается в другие органы, например в тимус, где из них будут развиваться Т-лимфоциты. Остающиеся же в красном костном мозге СЛК проходят несколько этапов развития, превращающих их в зрелые В-лимфоциты субпопуляции В2. Следует отметить, что у птиц, в отличие от млекопитающих генезис, В-лимфоцитов осуществляется в особом выросте кишечника, известном как сумка Фабрициуса или в латинском написании *bursa Fabricia*, что и послужило основанием для наименования этой группы клеток. Несмотря на то что у млекопитающих такого органа нет, принятое наименование антигенопродуцирующих клеток как В-лимфоцитов сохранилось, поскольку этим подчеркивается их отличие от Т-лимфоцитов, развивающихся с обязательным участием тимуса.

Дифференцировка В-лимфоцитов включает, как уже отмечалось, несколько этапов и процессов: перестройку генов иммуноглобулинов и интеграцию их продуктов в клеточный метаболизм; экспрессию генов молекул, обеспечивающих проведение сигнала с BCR внутрь клетки; экспрессию генов мембранных молекул, необходимых для взаимодействия с другими клетками (в первую очередь с Т-лимфоцитами и ФДК); экспрессию на мембране корецепторных комплексов.

Главным отличием В-лимфоцитов от других клеток является присутствие на их поверхности специфических рецепторов, представляющих собой молекулы иммуноглобулина. Именно в формировании этих поверхностных структур заключается главная суть созревания. Вступившая на путь превращения в В-лимфоцит стволовая лимфоцитарная клетка считается про-В-клеткой (или μ -преВ-клеткой). Установлено, что на этом этапе в клетке активируются гены *Rag-1* и *Rag-2*. Продукты этих генов осуществляют перестройку тех участков хромосомы 14 у *Homo sapiens* (или 12-й хромосомы у мышей), в которых находится комплекс генов, обеспечивающих формирование тяжелых цепей иммуноглобулинов. Результатом действия рекомбиназ является формирование активного в транскрипционном плане участка. Это приводит к появлению в зреющих клетках, а затем и на их поверхности тяжелых цепей μ , соответствующих иммуноглобулину М, т. е. клетка становится μ^+ -преВ-клеткой.

Предполагается, что именно вынос тяжелых цепей μ на поверхность клетки запускает повторную активацию генов *Rag-1* и *Rag-2* и вновь появившиеся в клетке рекомбиназы осуществляют генетические перестройки в хромосомах 2 или 22 человека, где находятся ком-

плексы генов, обеспечивающих формирование легких цепей κ или λ соответственно.

Результатом этого является синтез легких цепей иммуноглобулина, которые выносятся на поверхность клетки и объединяются с уже находящимися там тяжелыми цепями. Одновременно в клетке осуществляется синтез и выведение на поверхность клетки других белковых молекул, часть из которых (CD79a, CD79b и CD19) располагается в непосредственной близости от формирующегося мономерного поверхностного (или мембранного) IgM (для его обозначения приняты аббревиатуры sIgM или mIgM). Таким образом клетка получает рецепторный комплекс для распознавания антигена (сокращенно BCR, от англ. *B cell receptor*) и становится mIgM⁺-клеткой.

На этой стадии развития клетки покидают красный костный мозг и по кровеносной системе перемещаются во вторичные лимфоидные органы, где окончательно созревают. Этот последний этап созревания заключается в формировании всех характерных для данной группы клеток поверхностных структур. На наружной поверхности мембраны зрелых В-лимфоцитов идентифицировано более трех десятков белковых молекул, причем для части из них экспериментально доказана их роль в осуществлении эффективного контакта с другими клетками иммунной системы, в частности Т-хелперами, в ходе развития иммунных ответов. К таковым прежде всего относятся CD40, CD54, CD58 и белки главного комплекса гистосовместимости класса II (сокращенно ГКГ II или МНС II). Помимо обеспечиваемых этими молекулами прямых когнатных (мембрана к мембране) взаимодействий существенным для активации В-клеток при иммунном ответе является действие выделяемых Т-клетками интерлейкинов. Благодаря этому рецепторы для интерлейкина 4 (CD124/132), интерлейкина 5 (CD125), интерлейкина 6 (CD126/130) обязательно должны присутствовать хотя бы в небольших количествах на окончательно созревшей В-клетке.

Считается, что только прошедшие через лимфоузлы или селезенку В-лимфоциты могут максимально эффективно активироваться Т-хелперами и давать начало клонам антителопродуцирующих клеток. Установлено также, что во время окончательного созревания во вторичных лимфоидных органах происходит частичная замена входящих в BCR мембранных иммуноглобулинов М на мембранные иммуноглобулины D, причем специфичность этих иммуноглобулинов по отношению к антигенам сохраняется без изменений.

Описанный путь развития проходят около 80 % всех имеющихся в организме В-клеток. Они составляют субпопуляцию В2 или так называемую мажорную (главную) фракцию В-лимфоцитов. Остальные же 20 % (субпопуляция В1 или минорная фракция) возникают и созревают в так называемых серозных полостях (например, сальнике брюшины), куда их предшественники перемещаются из красного костного мозга на ранних стадиях онтогенеза организма. Эти предшественники фактически являются особым вариантом стволовых лимфоцитарных клеток, которые, оказавшись в серозных полостях, сохраняют способность к постоянному делению по следующей схеме: в результате деления возникает одна такая же стволовая лимфоцитарная клетка и одна, способная к дальнейшему развитию и созреванию в В1-лимфоцит. Именно поэтому такую субпопуляцию называют самоподдерживающейся, т. е. не связанной в дальнейшем онтогенезе организма с красным костным мозгом.

Проведенный в конце XX в. анализ представителей минорной фракции В-лимфоцитов показал, что они имеют ряд особенностей:

1) на поверхности В1-клеток присутствует только для них характерная молекула CD5;

2) разнообразие этих клеток по специфичности их антигенраспознающих рецепторов (BCR) значительно меньше, чем у представителей субпопуляции В2, причем большинство из образуемых после активации этих клеток антител относятся к так называемым естественным аутоантителам, связывающимся с собственными молекулами организма. Исходя из этого многие исследователи считают, что дальнейшее изучение данной группы клеток может пролить свет на причины возникновения и развития аутоиммунных патологических состояний;

3) образуемые В1-клетками антитела всегда относятся к классам IgM и IgA;

4) после выхода из серозных полостей в кровотоки В1-клетки оседают во время миграции по организму преимущественно в миндалинах, в лимфоузлах их количество от числа всех задерживающихся там В-клеток не превышает 35 %.

Еще одна разновидность В-лимфоцитов – В-клетки маргинальной зоны (МЗВ). Они локализуются почти исключительно в маргинальной зоне селезенки, отделяющей белую пульпу от красной. Фенотипически эти клетки более сходны с В2-, чем с В1-клетками. Они происходят от тех же костномозговых клеток-предшественников. Основной мембранный иммуноглобулин МЗВ-клеток – IgM, экспрес-

сируемый сильнее, чем на В2-клетках. В то же время IgD присутствует на мембране в очень малом количестве. Эти клетки сходны по своему фенотипу с активированными В-лимфоцитами. На них присутствуют молекулы CD69, CD25, CD38, в малом количестве – CD23. Обращает на себя внимание наличие молекулы CD11d, участвующей в презентации липидных антигенов.

Отделение линии МЗВ-клеток от общей линии В2-клеток происходит на переходной стадии транзиторных клеток (Т3), когда будущие МЗВ-клетки ослабляют экспрессию не IgM (как В2-клетки), а IgD и утрачивают молекулу CD23. На МЗВ-лимфоцитах не экспрессируется хемокиновый рецептор CXCR5, позволяющий клеткам мигрировать в фолликулы. Ключевой фактор дифференцировки МЗВ-клеток – Notch-2. Под влиянием сфингозин-1-фосфата и при участии молекул адгезии LFA-1 и VLA-4 они мигрируют в маргинальные зоны селезенки. МЗВ-клетки не участвуют в рециркуляции, но осуществляют «челночные» миграции до лимфоидных фолликулов и обратно, получая информацию об антигенах, поступающих в селезенку с кровью. Срок жизни МЗВ-лимфоцитов сопоставим со сроком жизни организма. Снижение численности МЗВ-клеток, вызываемое повреждающими факторами, достаточно быстро устраняется.

МЗВ-клетки участвуют в гуморальном иммунном ответе на возбудители, поступающие в кровоток. Они осуществляют тимуснезависимый иммунный ответ на инкапсулированные патогены. Благодаря сильной экспрессии молекул МНС-II и костимулирующих молекул, МЗВ-клетки обладают выраженной способностью к взаимодействию с Т-хелперами, однако их участие в тимусзависимом иммунном ответе изучено плохо. При ответе на антигены МЗВ-клетки дифференцируются в короткоживущие антителообразующие клетки. V-гены МЗВ-клеток редко затрагиваются мутациями, что характерно для развития плазматических клеток вне зародышевых центров. В этих клетках не происходит переключения классов иммуноглобулинов и даже МЗВ-клетки памяти несут на своей поверхности IgM, а не IgG. IgM⁺-клетки памяти преобладают в маргинальной зоне селезенки человека.

Среди популяций В-клеток, как и Т-клеток, есть клетки иммунной памяти, обеспечивающие более быстрый и сильный иммунный ответ организма на повторный стимул гомологичным антигеном.

Особая субпопуляция лимфоцитов – *естественные киллеры* (NK-клетки, натуральные киллеры, от англ. *Natural Killer* – естественный киллер). Они дифференцируются из общей лимфоидной клетки-пред-

шественника и *in vitro* способны спонтанно, т. е. без предварительной иммунизации, убивать некоторые опухолевые, а также инфицированные вирусами клетки. Это лимфоциты, лишенные характерных для Т- и В-клеток поверхностных CD-маркеров, а также антигенраспознающих рецепторов – TCR (*T Cell Receptor*) или BCR (*B Cell Receptor*).

В циркулирующей крови нормальные киллеры составляют около 15 % всех мононуклеарных клеток, а в тканях локализованы в печени (большинство), красной пульпе селезенки, слизистых оболочках (особенно репродуктивных органов). Большинство НК-клеток содержит в цитоплазме азурофильные гранулы, где депонированы цитотоксические белки перфорин, гранзимы и гранулизин.

Главными функциями НК-клеток являются распознавание и элиминация клеток, инфицированных микроорганизмами, измененных в результате злокачественного роста либо опсонизированных IgG-антителами, а также синтез цитокинов ИФН γ , ФНО α GM-CSF, ИЛ-8, ИЛ-5.

Маркерами НК-клеток человека служат поверхностные антигены CD56, CD16. Кроме того, НК обладают антигеном CD2, свойственным большинству клеток лимфоидного ряда и определяющим адгезионные свойства клеток.

НК обладают рецепторами ко многим цитокинам, которые могут стимулировать их активность (ИЛ-12) либо подавлять ее (ИЛ-10). Многие микроорганизмы индуцируют продукцию ИЛ-12 мононуклеарными клетками крови и тем самым активируют защитные функции НК. Сами НК, продуцируя цитокины, активируют другие клетки иммунной системы, повышая общий уровень защитных реакций.

Мембранный белок CD16, обладающий свойствами рецептора для иммуноглобулина G, определяет участие НК-клеток в реакциях антигензависимой клеточной цитотоксичности. Антитела к возбудителям инфекции, антигенам трансплантатов и антигенам собственных клеток обеспечивают контакт НК, сорбировавших эти антитела с клетками, обладающими соответствующими антигенами. В этих случаях НК участвуют в осуществлении специфических иммунных реакций.

К *микрофагам* у млекопитающих относят нейтрофилы и эозинофилы, у птиц – псевдоэозинофилы и эозинофилы. Клеточная оболочка микрофагов имеет глубокие складки и микроворсинки, с помощью которых осуществляется захватывание антигена.

Нейтрофильные сегментоядерные лейкоциты (нейтрофильные гранулоциты, или нейтрофилы) – преобладающая популяция белых кле-

ток крови. На поверхности нейтрофилов присутствуют рецепторы для бактериальных липополисахаридов (CD14), Fcγ-рецепторы (CD32 и CD16), рецепторы для хемокинов и интерлейкинов.

Основная функция нейтрофильных гранулоцитов — фагоцитоз и участие в воспалительных реакциях. Нейтрофильные гранулоциты первыми приходят в очаг воспаления и обнаруживаются там уже через 30–60 мин. Главным хемоаттрактантом для нейтрофилов является хемокин IL-8, под влиянием которого они мигрируют в очаг воспаления. Под воздействием цитокинов TNFα и IFNγ, синтезируемых моноцитами и макрофагами в очаге воспаления, нейтрофилы сами начинают секретировать IL-8, привлекающий в очаг воспаления новые нейтрофилы, и ряд хемокинов для NK-клеток, моноцитов и Th1-клеток. Кроме IL-8 хемотаксис нейтрофилов к месту инфицирования обеспечивает f-Met-Leu-Phe-рецептор, связывающий N-формилированные пептиды, присутствующие на многих бактериях.

Развитие нейтрофилов контролируется цитокинами, из которых главную роль играет G-CSF, а вспомогательную — GM-CSF, IL-3 и IL-6. Повышение содержания нейтрофилов в условиях воспаления регулируется цитокинами IL-17 и IL-23. IL-23 индуцирует образование IL-17, который стимулирует выработку G-CSF.

Нейтрофилы обладают хемотаксисом, высокой подвижностью и фагоцитарной активностью. В их цитоплазме содержатся нейтральные гранулы (по данным окрашивания), представляющие собой разновидность лизосом, которые включают различные ферменты и бактерицидные вещества, с помощью которых разрушается антиген. Различают четыре разновидности гранул этих клеток: азурофильные (первичные), специфические (вторичные), желатиназные (третичные) и секреторные везикулы.

Азурофильные гранулы — видоизмененные первичные лизосомы, содержащие набор гидролитических ферментов (кислых протеаз и гидролаз) с оптимумом pH 4,0. В составе азурофильных гранул нейтрофилов также содержится большое количество микробицидных веществ (рис. 10.2). Азурофильные гранулы всегда первыми сливаются с фагосомой. Маркерами азурофильных гранул являются фермент миелопероксидаза и мембранная молекула CD63.

Специфические гранулы по химическому составу отличаются от азурофильных гранул и сливаются с фагосомой уже после азурофильных гранул. Маркерами специфических гранул являются белок лактоферрин и мембранная молекула CD66.



Рис. 10.2. Химический состав гранул нейтрофилов
(по В. И. Павленко и др.)

Специфические гранулы содержат ферменты, проявляющие свою активность при нейтральных и слабощелочных значениях рН: лактоферрин, фосфолипаза А₂, лизоцим, ВР₁, липокортин и др.

Миелопероксидаза – фермент, катализирующий образование хлорноватистой кислоты (НСЮ) и других активных форм кислорода (АФК), обладает прямым бактерицидным действием.

Азуроцидин – катионный белок, проявляющий избирательную активность в отношении Gr (–) бактерий.

Дефензины – катионные полифункциональные белки. Нейтрофильные лейкоциты секретируют α-дефензины. Дефензины играют важную роль в фагоцитозе и воспалении: а) способны убивать бактерии, грибы, оболочечные вирусы (имеющие липидную мембрану, например вирус гриппа, ВИЧ, гепатита В и С); б) являются хемоаттрактантами, одновременно индуцируют синтез хемокина IL-8; в) стимулируют дифференцировку дендритных клеток и выработку ими

цитокинов; г) на заключительных этапах воспаления стимулируют ангиогенез, заживление ран, индуцируют апоптоз нейтрофилов.

BPI (белок, повышающий проницаемость бактерий) – разрушает клеточную стенку грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, однако более эффективен в отношении грамотрицательных бактерий за счет высокой аффинности к липополисахаридам наружной оболочки бактерий.

Лизоцим (мурамидаза) – фермент, разрушающий пептидогликан клеточной стенки бактерий. Более чувствительны к лизоциму грамположительных бактерии, для разрушения грамотрицательных бактерий необходимо совместное действие лизоцима и комплемента. 1/3 лизоцима содержится в азурофильных гранулах, а 2/3 лизоцима – в специфических гранулах нейтрофилов.

Сериновые нейтральные протеазы (эластаза, катепсин G, протеаза 3) – обеспечивают внутриклеточную гибель и переваривание бактерий. Эластаза способна расщеплять компоненты экстрацеллюлярного матрикса – эластин, протеогликаны, коллаген, фибронектин.

Лактоферрин – белок, связывающий ионы Fe^{3+} , используемые многими микроорганизмами в метаболических целях. Дефицит Fe^{3+} ограничивает рост бактерий и патогенных грибов.

Кателицидин – катионный белок, обладающий широким спектром бактерицидного действия. Проявляет активность как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий, грибов, некоторых вирусов и простейших. Проявляет синергические эффекты с дефензинами, является хемоаттракта.

Фосфолипаза A2 – способна разрушать клеточную стенку как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий.

Белок NGAL (липокалин 2) – обладает бактериостатическим действием. Связывание белком бактериальных сидерофоров угнетает рост бактерий.

Липокортин-1 (аннексин-1) – белок, один из представителей семейства липокортинов (аннексинов), синтезируемый в различных клетках под воздействием глюкокортикоидов. Он медирует различные иммуносупрессивные, противовоспалительные, противоаллергические эффекты глюкокортикоидов. В частности, липокортин-1 угнетает активность фосфолипазы A2, благодаря чему снижается синтез различных эйкозаноидов, в частности простагландинов и лейкотриенов. Кроме того, липокортин-1 угнетает активность циклооксигеназы типов 1 и 2, что потенцирует угнетающий эффект на биосинтез

простагландинов. Связываясь со специфическими липокортиновыми рецепторами мембран лейкоцитов, липокортин-1 угнетает различные стороны активности лейкоцитов: эпителиальную адгезию, эмиграцию лейкоцитов из сосудистого русла, хемотаксис, фагоцитоз, окислительный метаболизм. Липокортин-1 также угнетает высвобождение различных медиаторов аллергии и воспаления (в частности, лизосомальных ферментов, цитокинов, тканевого активатора плазминогена) и нейтрофилов, макрофагов и мастоцитов (тучных клеток).

Разновидностью специфических гранул нейтрофилов являются *желатинозные* гранулы, содержащие вместо лактоферрина фермент желатиназу.

Секреторные везикулы необходимы нейтрофилам для восстановления цитоплазматической мембраны, утраченной в процессе фагоцитоза. В связи с этим мембраны секреторных везикул в большом количестве содержат Fc-рецепторы, рецепторы комплемента, молекулы C D14 и интегрины.

Эозинофилы по сравнению с нейтрофилами менее подвижны, обладают меньшей фагоцитарной активностью, в их цитоплазме содержатся различные типы гранул: специфические (крупные, вторичные), мелкие, первичные и липидные тельца; содержащие соответственно главный основной белок, катионный белок, пероксидазу, нейротоксин, коллагеназу, миелопероксидазу, цитокины (GM-CSF, TNF α , IL-2, IL-4, IL-6); арилсульфатазу B, кислую фосфатазу, пероксидазу; кристаллы Шарко–Лейдена, основу которых составляет липофосфолипаза; арахидоновую кислоту, липоксигеназу, циклоксигеназу.

На поверхности зрелых эозинофилов находятся Fc γ -рецептор C D32 и Fc ϵ -рецептор CD23. Это низкоаффинный рецептор для IgE, который нужен для привлечения эозинофилов в очаг поражения, т. е. работающий фактически как хемотаксический рецептор, рецептор для компонентов комплемента (CD35) и специфический маркер CD9, по наличию которого эти клетки при необходимости можно отличать от нейтрофилов.

Эозинофилам свойственна слабая фагоцитарная активность. При активации в них образуются и затем секретируются разнообразные бактерицидные вещества – производные «кислородного взрыва»: активные формы кислорода, пероксиды, производные оксида азота, цианидов и галогенов.

Эозинофилы секретируют широкий спектр цитокинов: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, TNF α ,

IFN γ , TGF β , GM-CSF, а также ряд хемокинов (эотаксин – CCL11, RANTES – CCL5, MIP-1 α – CCL3), эйкозаноиды (лейкотриены, фактор агрегации тромбоцитов – PAF), нейропептиды. Хемотаксическими факторами для эозинофилов служат эотаксины (CCL11, CCL24, CCL26), RANTES, а также IL-5.

Функция эозинофилов в норме заключается в регуляции развития тучных клеток и морфогенетических процессов, связанных с беременностью и половым циклом у самок. Малоизученным остается участие эозинофилов в положительной селекции Т-клеток в тимусе. Благодаря механизму внеклеточного цитолиза, основными факторами которого служат белки гранул эозинофилов, при биологической агрессии эти клетки играют ключевую роль в защите от некоторых гельминтов и других патогенов. Являясь источником ряда цитокинов, эозинофилы участвуют в запуске Th2- зависимых иммунных процессов, в частности аллергических.

Велика роль эозинофилов в осуществлении внеклеточного цитолиза, предназначенного для защиты от многоклеточных паразитов. Большинство белков эозинофилов повреждают клетки макропаразитов. Основные белки эозинофилов способствуют развитию аллергических реакций (через активацию тучных клеток и базофилов с участием MBP), оказывают регулирующее действие на иммунные процессы, в частности на Т-клетки.

Базофилы представляют собой самую малочисленную группу гранулоцитов – их количество у млекопитающих оценивают как 0,2–0,5 % от общего числа лейкоцитов. Это сильно гранулированные клетки, имеющие окрашивающиеся основными красителями гранулы с различным содержанием. В основном в гранулах базофилов выявляются хондроитинсульфаты А и С, гепарин и кислые глюкозаминогликаны, а также серотонин (у грызунов) или гистамин, совместное действие которых на стенки кровеносных сосудов наиболее ярко проявляется при повышении их концентрации в ходе развития воспалительной реакции. Кроме того, в гранулах базофилов присутствуют пероксидаза, рибонуклеаза, гистидинкарбоксилаза, различные дегидрогеназы и протеиназы, близкие по действию к пищеварительным ферментам.

Развитие базофилов происходит по общей для всех гранулоцитов схеме, но в период окончательного созревания они обязательно приобретают специфические поверхностные молекулы, позволяющие им в отличие от других клеток связывать иммуноглобулины Е. Fc ϵ -рецепторы базофилов принято делить на две группы – Fc ϵ RI и Fc ϵ RII,

причем первые обладают значительно более высокой, чем вторые, способностью присоединять и удерживать иммуноглобулин. Именно с их наличием связывают уникальную способность базофилов и тучных клеток, происходящих от них, выбрасывать содержимое своих гранул при воздействии на эти клетки антигенов, комплементарно закрепленных на их поверхности, иммуноглобулинам, и тем самым выступать в качестве основных эффекторов гиперчувствительности немедленного типа. В случаях же первичного проникновения чужеродных агентов во внутреннюю среду организма именно базофилы и тучные клетки определяют развитие воспаления как защитной реакции.

Преобразование базофилов в тучные клетки происходит вследствие проникновения первых через стенки капилляров как во вторичных лимфоидных органах (например, в селезенке), так и в контактирующем с окружающей средой эпителии и подстилающих его слоях (слизистые оболочки пищеварительного, дыхательного и урогенитального трактов) или же в собственно коже. Значительное количество (10^4 – 10^6 на 1 г ткани) тучных клеток постоянно находится в серозных оболочках внутренних органов и в окружающей капилляры соединительной ткани. Переход из кровотока в тканевую жидкость сказывается как на морфологических, так и на физиологических свойствах клеток.

Тучные клетки (мастоциты) по сравнению с базофилами имеют большие размеры, в них увеличивается количество гранул, а их поверхность приобретает ворсинчатое строение. Кроме того, тучные клетки приобретают способность восстанавливать гранулы после дегрануляции и в отличие от базофилов способны к делению. Их пролиферативная способность различается в зависимости от локализации — находящиеся в серозных оболочках тучные клетки нуждаются для стимуляции деления в интерлейкине-3 (ИЛ-3), а локализованные в слизистых — одновременно в ИЛ-3 и ИЛ-4. Этот факт, а также еще не полностью выясненная зависимость тучных клеток слизистых оболочек от тимуса (у тимэктомированных или изначально бестимусных животных эти клетки отсутствуют) позволяет некоторым авторам рассматривать тучные клетки слизистых и серозных оболочек как две функционально и морфологически различающиеся субпопуляции. Продолжительность жизни тучных клеток обеих субпопуляций оказывается значительно большей, чем у других гранулоцитов, и исчисляется месяцами, а иногда и годами.

Главной чертой тучных клеток, наряду с базофилами и эозинофилами, является наличие на плазмолемме высокоафинного Fcε-рецеп-

тора к Fc-фрагменту IgE. На поверхности тучных клеток имеются TLR2, TLR3, TLR4/CD14, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9 для распознавания пептидогликана клеточной стенки бактерий, липополисахаридов, вирусных РНК и бактериальных ДНК. На поверхности тучных клеток присутствуют молекулы МНС обоих классов; наличие молекул МНС класса II и костимулирующих молекул CD86 придает мастоцитам способность выполнять функции АПК, особенно при индукции Th2- клеток.

Цитокины и хемокины, выделяемые тучными клетками, участвуют в воспалении и аллергических реакциях, вызывают повреждение тканей и влияют на их восстановление в завершающую фазу воспаления, участвуют в регуляции гемо- и лимфопоэза, реакциях врожденного и адаптивного иммунитета.

Несмотря на то что базофилы и их производные обладают фагоцитарной активностью, их роль как фагоцитирующих клеток считается незначительной.

Макрофаги. К ним относят подвижные (циркулирующие) клетки – моноциты периферической крови, а также неподвижные (оседлые) – купферовские клетки печени, альвеолярные макрофаги легких, остеокласты костной ткани, эпидермоциты кожи (клетки Лангерганса) и др. (рис. 10.3).

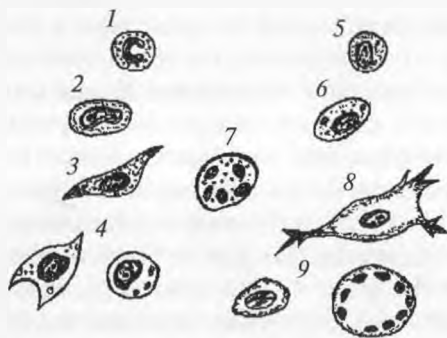


Рис. 10.3. Основные разновидности макрофагов:

1 – моноциты костного мозга и крови; 2 – гистиоциты соединительной ткани; 3 – купферовские клетки печени; 4 – свободные и фиксированные макрофаги селезенки, костного мозга, лимфоузлов; 5 – альвеолярные макрофаги легких; 6 – перитонеальные и плевральные макрофаги; 7 – остеокласты; 8 – микроглия головного мозга; 9 – эпителиоидные и гигантские клетки

Макрофаги – это гетерогенная клеточная популяция. Макрофаг имеет неправильную, звездчатую, многоотростчатую форму, складки

и микроворсинки на поверхности клеток, обилие эндоцитозных микровезикул, первичных и вторичных лизосом. Округлое или эллипсоидное ядро расположено центрально, гетерохроматин локализован под ядерной оболочкой. Структурные особенности клетки во многом зависят от ее органной и тканевой принадлежности, а также от функционального статуса. Так, для клеток Купфера характерен гликолиз, альвеолярные макрофаги содержат ламеллярные (сурфактинные) тельца, хорошо развитый комплекс Гольджи, шероховатый эндоплазматический ретикулум и множество митохондрий, в то время как в клетках микроглии митохондрии немногочисленны. В цитоплазме перитонеальных и альвеолярных макрофагов присутствует большое количество липидных телец, содержащих субстраты и ферменты генерации простагландинов. Адгезирующие и движущиеся макрофаги формируют короткоживущие, содержащие актин структуры — подосомы — в виде плотной центральной части с радиально отходящими от них микрофиламентами. Подосомы могут сливаться, формируя структуры более высокого порядка — розетки, которые эффективно разрушают белки подлежащего внеклеточного матрикса.

Макрофаги выполняют следующие функции:

1) фагоцитируют чужеродный материал и клеточно-тканевый дебрис. Благодаря фагоцитозу они участвуют в удалении из организма иммунных комплексов и клеток, подвергшихся апоптозу;

2) процессируют антиген, а затем рекомендуют (презентируют) его антигенами Т-хелперам, поддерживая осуществление иммунного ответа;

3) выполняют секреторную функцию, состоящую в синтезе и выделении ферментов (кислые гидролазы и нейтральные протеиназы), компонентов комплемента, ингибиторов ферментов, компонентов межклеточного матрикса, биологически активных липидов (простагландинов и лейкотриенов), эндогенных пирогенов, цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α и пр.);

4) принимают участие в регуляции иммунного ответа — моноциты крови и тканевые макрофаги синтезируют ряд факторов, влияющих на дифференцировку, пролиферацию и функциональную активность других участников иммунного ответа — определенных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов;

5) оказывают цитотоксическое влияние на клетки-мишени при фиксации на них антител и соответствующей стимуляции со стороны Т-лимфоцитов (так называемые реакции антителозависимой опосредованной цитотоксичности);

- 6) изменяют метаболизм при воспалении;
- 7) принимают участие в асептическом воспалении и разрушении инородных частиц;
- 8) участвуют в процессах репарации и заживления ран — макрофаги секретируют несколько ростовых факторов, стимулирующих ангиогенез и индуцируют формирование грануляционной ткани и реэпитализацию: базисный фактор роста фибробластов (bFGF), ростовые трансформирующие факторы GTF-a, GTF-b, инсулиноподобный ростовой фактор (IGF).

Антигенпредставляющие клетки (АПК). Начальным этапом Т-клеточного иммунного ответа является представление антигена Т-лимфоцитам. Антигенный рецептор CD4⁺ Т-хелпера воспринимает антиген в комплексе с продуктом гена МНС класса II, который должен находиться на поверхности АПК. Следовательно, роль АПК может играть любая клетка организма, обладающая антигеном МНС класса II и способностью сорбировать на своей поверхности чужеродный антиген. В организме человека антигенами МНС класса II обладают немногие клетки: макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты, а также клетки Лангерганса и кератиноциты кожи, эндотелиальные клетки сосудов и гломерул почек. Макрофаги, дендритные клетки и В-лимфоциты называют профессиональными АПК, так как они более мобильны, активны и выполняют основной объем функций представления антигенов.

АПК имеет на наружной мембране до $2-10^5$ молекул МНС класса II. Для активации одного Т-лимфоцита достаточно 200–300 таких молекул, находящихся в комплексе с антигеном.

Макрофаги как антигенпредставляющие клетки (АПК) — клетки системы мононуклеарных фагоцитов происходят от монобластов костного мозга, которые дифференцируются в моноциты крови. Моноциты, составляющие около 5 % лейкоцитов крови, находятся в циркуляции около 1 сут, а затем поступают в ткани, формируя популяцию тканевых макрофагов, количество которых в 25 больше, чем моноцитов. К ним относятся купферовские клетки печени, микроглия центральной нервной системы, остеокласты костной ткани, макрофаги легочных альвеол, кожи и других тканей. Макрофагов много во всех органах иммунной системы. Тканевые макрофаги — клетки с округлым или почковидным ядром имеют диаметр 40–50 мкм. Цитоплазма содержит лизосомы с набором гидролитических ферментов, обеспечивающих переваривание любых органических веществ

и выделение бактерицидного аниона кислорода. Макрофаги функционируют как фагоциты. Они продуцируют растворимые вещества, регулирующие другие клетки иммунной системы, из которых наиболее изучен ИЛ-1, который активирует лимфоциты. На мембране макрофага экспрессированы структуры, обеспечивающие способность отличать чужеродные субстраты от собственных. Маркер макрофага – белок CD14 служит рецептором липополисахаридов бактерий. Макрофаг обладает пектиноподобными молекулами, соединяющимися с маннозными и фруктозными компонентами поверхности большинства микроорганизмов, что обеспечивает их контакты, лежащие в основе фагоцитоза.

Участие макрофага в иммунном ответе состоит в том, что эта клетка фагоцитирует антигенсодержащие частицы, дезинтегрирует их, превращая белки в антигенные пептидные фрагменты. Последние в комплексе с собственными антигенами МНС II класса макрофаг передает Т-лимфоциту при прямом контакте с ним. При этом макрофаг продуцирует лимфокин ИЛ-1, который вызывает пролиферацию лимфоцитов, вступивших в контакт с антигеном, что обеспечивает формирование клона этих клеток, осуществляющих развитие иммунологической реакции на антиген.

Дендритные клетки составляют вторую группу АПК. Они близки к макрофагам, но не обладают фагоцитирующими свойствами. Это способствует сохранности поглощенных антигенов, которые могут быть полностью разрушены в ходе фагоцитоза. Дендритные клетки содержатся в крови, лимфе и во всех других тканях. Дендритные клетки эпителиальных тканей называют клетками Лангерганса, в лимфатических узлах и селезенке они составляют около 1 % от всех клеток. Эти отростчатые мононуклеарные клетки в разных тканях имеют неодинаковую форму и даже названия, однако все они обладают молекулами МНС класса II и способностью фиксировать антигены с формированием комплекса антиген-продукт МНС, представляемого Т-лимфоцитам. Дендритные клетки значительно более активны, чем макрофаги и И-клетки в индукции первичного иммунного ответа: в отличие от других АПК дендритные клетки могут представлять антиген покоящимся Т-лимфоцитам. Захват антигена дендритными клетками чаще всего происходит вне лимфоидных органов. После этого они мигрируют в лимфоидные образования, где происходит их контакт с Т-лимфоцитом и развитие дальнейших событий иммунного ответа. Этому способствуют воздействия стимулирующих факторов на лимфоцит через

контакт молекул В7-1 и ИЛ-2, экспрессированных на поверхности дендритных клеток, с молекулами CD40, находящимися на поверхности Т-лимфоцита. Дендритные клетки, как и большинство других клеток человека, обладают антигеном МНС класса I, необходимого для презентации антигена CD8⁺ цитотоксическому Т-лимфоциту, поэтому они являются также инициаторами цитотоксических реакций.

В-лимфоциты являются антигенпредставляющими клетками (АПК). Как уже указывалось, В-лимфоциты обуславливают формирование иммуноглобулинов и действуют как АПК. Особенности В-лимфоцитов как АПК состоят в том, что эти клетки вступают в контакт с антигеном через свои специфические рецепторы. Следовательно, в представлении антигена участвуют не все В-лимфоциты, а только те, которые обладают рецепторами к данному антигену. Поступивший в организм антиген распределяется среди относительно небольшого числа высокочувствительных к нему АПК. Вследствие этого для индукции иммунного ответа требуется в 10 тыс. раз меньше антигена, чем при его презентации другими видами АПК, поэтому при небольших количествах антигена В-лимфоциты являются монополярными АПК. Присоединение антигена к В-лимфоциту длится несколько минут, после чего антиген подвергается эндоцитозу, а через несколько часов вновь экспрессируется на мембране клетки в комплексе с молекулами МНС класса II. Далее В-лимфоцит вступает в прямой контакт с Т-клеткой и служит сигналом ее активации. Контакт и активации клеток способствуют дополнительные молекулы на их поверхности, а также продуцируемые ими цитокины.

Помимо макрофагов, дендритных и В-клеток, для которых представление антигенов входит в число основных функций (профессиональные АПК), в представлении антигенов Т-хелперным лимфоцитам могут принимать участие эндотелиальные и другие клетки: фибробласты, астроциты, клетки микроглии, кератиноциты и некоторые другие, способные при активации экспрессировать молекулы МНС класса II и цитокины, активирующие Т-лимфоциты. Так, например, кератиноциты кожи способны воспринять антиген, продуцировать ИЛ-1 и после стимуляции интерфероном экспрессировать молекулы МНС класса II. Контакт этих клеток с Т-лимфоцитами и их стимуляция — элементы патогенеза контактного дерматита, псориаза.

Представление антигена CD8⁺ (цитотоксическим) лимфоцитам осуществляется через формирование антигенпредставляющей клеткой комплекса антигена с белком МНС класса I. Таким белком об-

...практически все ядерные клетки организма, что значительно расширяет возможности активации цитотоксических реакций, играющих основную роль в противовирусном, противоопухолевом и трансплантационном иммунитете.

В функциональном отношении клетки иммунной системы разделены на две категории: регуляторные и их предшественники и эффекторные и их предшественники. Функции регуляторных клеток осуществляют в основном Т-лимфоциты и макрофаги. Эффекторными могут служить многие типы клеток: цитотоксические Т-лимфоциты, Н-лимфоциты, макрофаги, естественные киллерные клетки и др.

10.4. Механизмы взаимодействия клеток в ходе иммунного ответа

При развитии иммунного ответа разные клетки взаимодействуют друг с другом. Известны, как минимум, два механизма такого взаимодействия:

межклеточная адгезия (контактное взаимодействие): мембранные молекулы одной клетки комплементарно связываются с мембранными молекулами другой клетки, что приводит к образованию межклеточного контакта;

взаимодействие при помощи медиаторов: клетка секретирует особые растворимые молекулы (медиаторы), рецепторы к которым присутствуют на мембранах других клеток. При связывании рецептора с лигандом реализуется тот или иной биологический эффект. Медиаторы, участвующие в развитии иммунного ответа, называют цитокинами или цитокинами.

К молекулам межклеточной адгезии относят селектины, адрессины, интегрины, молекулы суперсемейства иммуноглобулинов и ряд других.

Селектины — трансмембранные белки на поверхности лимфоцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и эндотелиоцитов. Общим для них является наличие во внеклеточной части лектиноподобного домена, способного комплементарно связывать сахара.

Адрессины — муциноподобные молекулы на мембране эндотелиоцитов — лиганды для селектинов. Селектины и адрессины обеспечивают селективную адгезию клеток к стенке сосуда, необходимую для его оплывания и дальнейшего проникновения в очаг поражения.

Интегрины — гетеродимерные белки, состоящие из крупной α -цепи и меньшей по размеру β -цепи. LFA-1 (*Lymphocyte Function-Associated antigen* — антиген, ассоциированный с функцией лимфоцита) — наиболее важный интегрин для активации любого Т-лимфоцита. Антитела к LFA-1 способны блокировать активацию как наивных, так и покоящихся Т-клеток. Однако анализ врожденных генетических дефектов молекул адгезии показывает, что другие интегрины (например, CD2) способны компенсировать отсутствие LFA-1. VLA (*Very Late Activation antigens* — очень поздние антигены активации) — интегрины, которые экспрессируются Т-лимфоцитами на 2–4-е сут после активации и имеют наибольшее функциональное значение для проникновения уже стимулированной Т-клетки в очаг воспаления, где ей надлежит организовать элиминацию антигена.

ICAM (*InterCellular Adhesion Molecules* — молекулы межклеточной адгезии) относят к суперсемейству иммуноглобулинов.

Взаимодействие молекул адгезии LFA-3 и ICAM-1 на клетках эпителия тимуса с комплементарными им молекулами CD2 и LFA-1 на тимоцитах необходимо для удержания последних в тимусе в процессе их дифференцировки.

Наивные Т-лимфоциты в Т-зависимых зонах периферических лимфоидных органов взаимодействуют с АПК при помощи LFA-1, CD2 и ICAM-3 на Т-клетках и ICAM-1, ICAM-2, LFA-1 и LFA-3 на АПК. Этого взаимодействия достаточно для запуска пролиферации распознавших антиген Т-лимфоцитов и дифференцировки их в лимфоциты-эффекторы.

Цитокины и их клеточные рецепторы. Дифференцировка и взаимодействие клеток системы иммунитета между собой, а также с клетками других систем организма осуществляется с помощью регуляторных молекул — *цитокинов*. Известно больше 100 разнообразных цитокинов.

Существует несколько классификаций цитокинов, основанных на разных принципах. Традиционная классификация отражает историю изучения цитокинов. Вначале их называли лимфокинами и монокинами в зависимости от того, какие клетки их продуцировали — Т-лимфоциты или моноциты. Вскоре выяснилось, что четко разграничить лимфокины и монокины нельзя, и был введен общий термин «цитокины». В 1979 г. были установлены правила идентификации факторов этой группы — «интерлейкины» (IL). Тогда же свои названия получили два первых члена этой группы молекул — IL-1 и IL-2. С тех пор все новые цитокины (кроме хемокинов) получали обозначение IL.

и порядковый номер. Известно более 60 интерлейкинов. Большинство из них являются гликопротеинами с молекулярной массой от 15 до 60 кДа. Выделяются макрофагами, Т- и В-лимфоцитами, базофилами и другими клетками (эндотелием, стромальными клетками костного мозга). Например, ИЛ-2 выделяется Th1-клетками, цитотоксическими Т-лимфоцитами, НК-клетками и стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток.

Изучение биологической роли цитокинов показало, что некоторые цитокины и даже целые их группы уже давно открыты и получили другие названия, которые за ними были сохранены. Это касается цитокинов с противовирусной активностью — интерферонов (IFN), коиниестимулирующих факторов — CSF (цитокины с гемопоэтической активностью, поддерживающие рост кроветворных клеток) и факторов некроза опухолей, или TNF (от англ. — *tumor necrosis factor*). Наконец, после введения термина «интерлейкин» была описана еще одна группа цитокинов — хемокины (хемотаксические цитокины). Первоначально к цитокинам относили только растворимые факторы. Однако со временем выяснилось, что некоторые из них (например ИЛ-1 α у человека) существуют в основном в связанной с мембранами форме. Затем оказалось, что целым семействам цитокинов (например, семейству TNF) больше свойственна мембранная, чем секретируемая форма.

Четкая структурная классификация цитокинов до сих пор отсутствует. Действие цитокинов осуществляется через рецепторы клетки. В процессе дифференцировки на мембранах клеток системы иммунитета появляются макромолекулы — маркеры — поверхностные молекулы, главным образом белковой природы, характеризующие стадию дифференцировки клетки и ее принадлежность к определенной популяции или субпопуляции. Они получили название CD-антигенов (от англ. *Clusters of Differentiation* — кластер дифференцировки). Известно более 300 CD-антигенов, и их количество увеличивается. Например, CD1 — имеют кортикальные тимоциты, CD4 — маркер Т-хелперов, CD14 — маркер макрофагов. Под фенотипом клетки понимают совокупность всех поверхностных маркеров и рецепторов.

При взаимодействии цитокина с рецептором происходит генерация сигнала, приводящего к формированию транскрипционных факторов и активации генов, определяющих реакцию клетки на действие цитокина. Одновременно происходит поглощение клеткой комплекса цитокина с рецептором и расщепление его в эндосомах. Сама по себе интернализация этого комплекса к передаче сигнала отношения не имеет. Она необ-

ходима для утилизации цитокина, предотвращающей его накопление в месте активации клеток-продуцентов. Большую роль в регуляции этих процессов играет сродство рецептора к цитокину. Только при достаточно высокой степени сродства (порядка 10^{-10} М) генерируется сигнал и происходит поглощение комплекса цитокина с рецептором.

Распознавание генетически чужеродных агентов в системе врожденного иммунитета. До конца 80-х гг. XX в. предполагали, что узнавание генетически чужеродных веществ состоит в распознавании индивидуальных молекул (антигенов) рецепторами лимфоцитов. Считалось, что миелоидные клетки не различают «свое» и «чужое» и уничтожают любые клетки, не обладающие механизмами защиты от фагоцитоза. Новые представления о распознавании в системе врожденного иммунитета были сформированы в рамках концепции Ч. Джейнуэя (*Ch. Janeway*) о взаимодействии врожденного и адаптивного иммунитета. Основой этих представлений, разработанных Ч. Джейнуэем совместно с Р. Меджитовым, стало понятие «распознавание паттернов». Оно означает распознавание не индивидуальных молекул или химических групп, а общих структурных особенностей, свойственных группам молекул. Эти особенности обозначают практически непереводаемым английским словом *pattern* (паттерн), в качестве эквивалента которого Р. Меджитов предлагает русское слово «образ». При этом имеется в виду, что многоклеточные организмы распознают «образы», во-первых, чужеродных, во-вторых, опасных микроорганизмов-патогенов. Такие структуры можно назвать образами патогенности, или патогенассоциированными молекулярными паттернами (буквальный перевод оригинального словосочетания – *Pathogen-associated molecular pattern* – *PAMP*).

Особые рецепторы, распознающие шаблон на поверхности патогена, – PRR (*Pattern Recognition Receptors* – паттернраспознающие рецепторы) позволяют клеткам врожденного иммунитета обнаруживать микробные клетки. В зависимости от локализации выделяют растворимые и мембранные формы PRR.

Циркулирующие (растворимые) рецепторы для патогенов – белки сыворотки крови, синтезируемые печенью: липополисахаридсвязывающий белок (*LBP* – *Lipopolysaccharide Binding Protein*), компонент системы комплемента C1q, белки острой фазы MBL и С-реактивный белок (СРВ). Они непосредственно связывают микробные продукты в жидких средах организма и обеспечивают возможность их поглощения фагоцитами, т. е. являются опсонинами (от гр. *opsonein* – делающий вкусным). Кроме того, некоторые из них активируют систему

комплемента. Так, например, СРВ, связывая фосфорилхолин клеточных стенок ряда бактерий и одноклеточных грибов, опсонизирует их и активирует систему комплемента по классическому пути. MBL принадлежит к семейству коллектинов. Имея родство к остаткам маннозы, экспонированным на поверхности многих микробных клеток, MBL инициирует лектиновый путь активации комплемента.

Мембранные рецепторы расположены как на наружных, так и на внутренних мембранных структурах клеток. TLR (*Toll-Like Receptor* – Toll-подобный рецептор; т. е. сходный с Toll-рецептором дрозодилы). Одни из них непосредственно связывают продукты патогенов (рецепторы для маннозы макрофагов, TLR дендритных и иных клеток), другие работают совместно с иными рецепторами, например CD14-молекула на макрофагах связывает комплексы бактериального липополисахарида (ЛПС) с LBP, а TLR-4 вступает во взаимодействие с CD14 и передает соответствующий сигнал внутрь клетки. Всего у млекопитающих описано 13 различных вариантов TLR (у человека – 10).

Цитоплазматические рецепторы – паттернраспознающие рецепторы присутствуют не только на мембранах клетки и внутриклеточных гранул, но и в цитозоле. Такая локализация характерна для рецепторов группы NLR (*NOD-like receptor*; *NOD* – *Nucleotide-oligomerizing domain* – домен олигомеризации нуклеотидов), в которую входят белки NOD1, NOD2, NALP1, NALP3, IPAF и др. Известно по крайней мере 13 NOD-подобных рецепторов. Они встречаются в лимфоцитах, макрофагах, дендритных и эпителиальных клетках и др.

Рецепторы NOD1 и NOD2 распознают мурамилпептиды – вещества, образующиеся после ферментативного гидролиза пептидогликана, входящего в состав клеточной стенки всех бактерий. NOD1 распознает мурамилпептиды с концевой мезодиаминопимелиновой кислотой (*meso*-DAP), которые образуются только из пептидогликана грамотрицательных бактерий; NOD2 – мурамилдипептиды (мурамилдипептид и гликозилированный мурамилдипептид) с концевым D-пироглутамином или D-глутаминовой кислотой, являющиеся результатом гидролиза пептидогликана как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Кроме того, NOD2 имеет родство к мурамилпептидам с концевым L-лизином, которые есть только у грамположительных бактерий.

В цитозоле присутствуют также рецепторы, распознающие чувствительную РНК, а именно: RLR (*RIG-like receptors*). К RIG-подобным рецепторам относят RIG-1 (*Retinoic acid-Inducible Gene 1*), MDA5 (*Mel-*

anoma Differentiation-associated Antigen 5) и LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology 2*).

Все три рецептора, кодируемые этими генами, имеют сходную химическую структуру. Рецепторы RIG-I и MDA5 распознают вирусную РНК. Роль белка LGP2 пока неясна; возможно, он исполняет роль хеликазы, связываясь с двуцепочечной вирусной РНК, модифицирует ее, что облегчает последующее распознавание с помощью RIG-I. RIG-I распознает односпиральную РНК с 5-трифосфатом, а также относительно короткие (<2000 пар оснований) двуспиральные РНК. MDA5 различает длинные (>2000 пар оснований) двуспиральные РНК. Таких структур в цитоплазме эукариотической клетки нет. Вклад RIG-I и MDA5 в распознавание конкретных вирусов зависит от того, образуют ли данные микроорганизмы соответствующие формы РНК.

Описан также цитозольный рецептор, распознающий чужеродную ДНК – DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* – ДНК-зависимый активатор регуляторных факторов интерферона).

Главный комплекс гистосовместимости. Система генов, контролирующая синтез антигенов, определяющих несовместимость тканей при пересадках, индуцирует реакции, вызывающие отторжение трансплантатов, представляет собой главный комплекс гистосовместимости МНС (англ. *major histocompatibility complex*).

Поверхностные структуры цитомембран клеток, индуцирующие реакции отторжения, получили название антигенов гистосовместимости, а кодирующие их гены – генов гистосовместимости – H-генов.

Понятие о главном комплексе гистосовместимости возникло после установления генетических законов совместимости тканей и обоснования наличия группы тесно сцепленных генов, различия по которым обуславливают наиболее резкую несовместимость тканей при пересадках и наиболее выраженные реакции отторжения. Впоследствии было выяснено, что в пределах МНС локализованы не только гены, контролирующие главные трансплатационные антигены, но и гены, регулирующие способность давать иммунный ответ против различных чужеродных антигенов, названных Ig (*Immune response*), а также гены, кодирующие полиморфные антигены (Ia-антигены), антигены, выраженные на поверхности иммунокомпетентных и некоторых других клеток. У человека набор антигенов обозначается HLA (от *Human leukocyte antigens*), у мыши – H2, у свиньи – SLA, у кролика – RLA, у курицы – B, у собаки – DLA.

Различают три класса генов МНС. Молекулы антигенов класса I представляют собой мембранные гликопротеиды, обнаруживаемые на поверхности практически всех клеток организма. Молекулы класса I образуют комплекс с антигеном на поверхности инфицированных вирусом клеток и служат сигналом для цитотоксических Т-лимфоцитов. Молекулы антигенов класса II находятся на поверхности мембран клеток иммунной системы, главным образом на В-клетках и макрофагах. Это неоднородная группа гликопротеидов. Они аналогичным образом служат сигналом для Т-хелперов. Класс III генов кодирует синтез некоторых компонентов комплемента. Иными словами, комплекс МНС является центральным генетическим аппаратом для функционирования иммунной системы.

Глава II КОНСТИТУТИВНЫЕ (ВРОЖДЕННЫЕ) И ИНДУЦИБЕЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА

II.1. Антигены

Антигены (лат. *anti* — против и *genus* — происхождение, род, племя) — генетически чужеродные вещества, способные вызвать в организме специфические иммунные реакции и взаимодействовать с продуктами этих реакций.

Антигенами (АГ) для организма могут быть собственные клетки с измененным геномом и образуемые ими молекулы; клетки другого животного, растительного организма и синтезируемые ими вещества; микроорганизмов, продукты их метаболизма или распада, а также синтетические органические молекулы.

Основными свойствами антигенов являются чужеродность, антигенность, иммуногенность и специфичность.

Чужеродность — неотделимое от антигена понятие. Без чужеродности нет антигена применительно к дан-

ному организму. Чем больше выражено генетическое родство между животными, тем хуже проявляются антигенные свойства их веществ. Например, белки бычьей сыворотки крови не антигенны для крупного рогатого скота, но будут слабо антигенны для мелкого рогатого скота и обладать выраженными антигенными свойствами для лошадей, кроликов, птиц и других животных.

Под *антигенностью* понимают потенциальную способность молекулы антигена активировать компоненты иммунной системы и специфически взаимодействовать с факторами иммунитета (антитела, клон эффекторных лимфоцитов).

Иммуногенность определяет способность антигена вызывать иммунный ответ независимо от его специфичности. Способность чужеродных веществ запускать весь необходимый клеточный ансамбль и составляет основу их иммуногенности. Иммуногенность антигенов зависит не только от свойств молекул, но и от пути и режима их введения в организм, а также дополнительных воздействий (например, использования адъювантов).

Специфичность — особенность строения веществ, по которой антигены отличаются друг от друга. Она определяется антигенной детерминантой или *эпитопом*, т. е. небольшим участком молекулы антигена, который и соединяется только с комплементарными ему антителами или рецепторами Т-лимфоцитов. Количество таких участков (группировок) у каждого антигена различно и определяет количество молекул антител, с которыми может соединяться АГ (валентность). От числа детерминант зависит валентность антигена. Оказалось, что оно увеличивается пропорционально возрастанию молекулярной массы белковых молекул антигена.

Вещества, которые вызывают иммунные реакции и взаимодействуют с их продуктами, называются *полноценными антигенами*. Ими являются природные или синтетические биополимеры, чаще всего белки и их комплексные соединения (гликопротеиды, липопротеиды, нуклеопротеиды), а также полисахариды. Они имеют молекулярную массу более 10 000 Да. Полноценные антигены обычно поливалентны — на 1 молекуле высокомолекулярного антигена может быть 10–20 и более эпитопов.

Неполноценные антигены, или гаптены, в обычных условиях не вызывают иммунную реакцию. К ним относятся углеводы, липиды, стероиды, лекарственные препараты, большинство химических веществ и нуклеиновые кислоты. Они способны запускать иммунный

ответ после связывания с белками организма, например с альбумином, а также с белками на поверхности клеток (эритроцитов, лейкоцитов). В результате образуются антитела, способные взаимодействовать с гаптеном. При повторном попадании в организм гаптена возникает вторичный иммунный ответ, нередко в виде повышенной аллергической реакции. Гаптены являются моновалентными антигенами.

Антигены, полученные путем присоединения к молекуле белка группы, обеспечивающей новую иммунологическую специфичность, называются *конъюгированными антигенами*.

Независимо от природы по физическому состоянию антигены подразделяются на корпускулярные (бактерии, эритроциты) и молекулярно-дисперсные (растворимые).

Существуют два основных вида антигенов: экзогенные и эндогенные (возникшие внутри организма). Экзогенные антигены попадают в организм из внешней среды. Среди них различают инфекционные и неинфекционные антигены.

Инфекционные антигены – это антигены бактерий, вирусов, грибов, простейших. Известны следующие разновидности бактериальных антигенов:

группоспецифические (встречаются у разных видов одного рода или семейства);

видоспецифические (у различных представителей одного вида);

типоспецифические (определяют серологические варианты – серовары, антигеновары внутри одного вида).

В зависимости от локализации в бактериальной клетке различают О-, Н- и К-антигены (обозначают буквами латинского алфавита). О-антигены, или соматические, связаны с клеточной стенкой бактерии. Имеют липополисахаридную природу, термостабильны (выдерживают кипячение в течение 1–2 ч), химически устойчивы (выдерживают обработку формалином и этанолом); являются эндотоксином (оказывают токсическое действие на клетки организма) и пирогеном (индуцируют лихорадку). Пирогенность зависит от активации этим липополисахаридом макрофагов, которые выделяют ИЛ-1 и другие цитокины. О-антиген варьирует по строению у представителей одного вида бактерий, поэтому внутри вида различают антигеновары. Н-антиген, или жгутиковый, входит в состав бактериальных жгутиков, основа его – белок флаггелин, термолабилен, есть у всех подвижных бактерий (например, у энтеробактерий). К-антиген, или капсульный, – это гетерогенная группа поверхностных капсульных антигенов бак-

терий. Они находятся в капсуле и связаны с поверхностным слоем липополисахарида клеточной стенки. Содержат главным образом кислые полисахариды, в состав которых входят галактуроновая, глюкуроновая и идурононовая кислоты. Встречаются вариации в строении этих антигенов. У кишечной палочки К-антигены подразделяются на фракции А, В и L. Наиболее термостабильна А-фракция, выдерживающая кипячение более 2 ч. В и L являются термолабильными и разрушаются при кипячении. Разновидностью К-антигена является поверхностный Vi-антиген. Он встречается у живых сальмонелл возбудителей брюшного тифа и некоторых других энтеробактерий. Ранее его считали фактором, обуславливающим вирулентность микроба. Однако в большей мере Vi-антиген ответствен за персистенцию возбудителя у бактерионосителей.

Антигенами бактерий являются также их токсины и ферменты.

У бактерий различают также протективные антигены. В сущности, это совокупность антигенных детерминант (эпитопов), которые вызывают наиболее сильный иммунный ответ, что предохраняет организм от повторной инфекции данным возбудителем.

Среди эндогенных антигенов особого внимания заслуживают ауто- и неоантигены. Аутогенные антигены (аутоантигены) – это структурно неизменные антигены собственного организма, синтезируемые в организме в физиологических условиях. В норме аутоантигены неиммуногенны вследствие сформировавшейся иммунологической толерантности (невосприимчивости) либо их недоступности для контакта с факторами иммунитета – это так называемые забарьерные антигены. При срыве толерантности или нарушении целостности биологических барьеров (воспаление, травма) компоненты иммунной системы начинают специфически реагировать на аутоантигены выработкой специфических факторов иммунитета (аутоантитела, клон аутореактивных лимфоцитов). Неоантигены, в отличие от аутоантигенов, возникают в организме в результате генетических мутаций или модификаций и всегда чужеродны.

По степени чужеродности различают ксено-, алло- и изоантигены. Ксеногенные антигены (или гетерологичные) – общие для организмов, стоящих на разных ступенях эволюционного развития, например относящиеся к разным родам и видам. Впервые феномен общности ряда антигенов у животных разных видов был отмечен Д. Форсманом (1911 г.). При иммунизации кролика суспензией, полученной путем гомогенизации органов морской свинки, ученый получил иммунную сыворотку, способную взаимодействовать с эритро-

цитами барана. Позже было установлено, что морская свинка и баран имеют ряд структурно сходных антигенных детерминант, дающих перекрестное реагирование. В дальнейшем перечень подобных ксеногенных антигенов был значительно расширен, и они получили обобщенное название «антигены Форсмана».

Аллогенные антигены (или групповые) – общие для генетически неродственных организмов, но относящихся к одному виду. На основании аллоантигенов общую популяцию организмов можно подразделить на отдельные группы. Примером таких антигенов у людей являются антигены групп крови (системы АВО и др.). Аллогенные ткани при трансплантации иммунологически несовместимы – они отторгаются или лизируются реципиентом. Микробы на основании групповых антигенов могут подразделяться на серогруппы, что используется в микробиологической диагностике.

Изогенные антигены (или индивидуальные) – общие только для генетически идентичных организмов, например для однойцовых близнецов, инбредных линий животных. Изотрансплантаты обладают практически полной иммунной совместимостью и не отторгаются. К и юантигенам у людей относятся антигены гистосовместимости, а у бактерий – типовые антигены, не дающие дальнейшего расщепления.

В пределах отдельного организма в определенных органах или тканях обнаруживаются специфичные для них антигены, которые нигде больше не встречаются. Такие антигены получили название органо- и тканеспецифических.

В зависимости от физико-химических свойств антигена, условий его внедрения, характера реакции и реактивности макроорганизма различают иммуногены, толерогены и аллергены. Иммуногены способны индуцировать нормальную продуктивную реакцию иммунной системы – выработку факторов иммунитета (антитела, антигенорезистивные клоны лимфоцитов). В клинической практике иммуногены используют для иммунодиагностики, иммунотерапии и иммунопрофилактики многих патологических состояний.

Толероген является полной противоположностью иммуногену. Он формирует иммунологическую толерантность или неотвечаемость на антигены данного вещества. Толероген, как правило, – мономер с низкой молекулярной массой, высокой эпитопной плотностью и высокой дисперсностью. Толерогены используют для профилактики и лечения иммунологических конфликтов и аллергии путем наведения искусственной неотвечаемости на отдельные антигены.

Аллерген, в отличие от иммуногена, формирует патологическую реакцию организма в виде гиперчувствительности немедленного или замедленного типа. По своим свойствам аллерген не отличается от иммуногена. В клинической практике аллергены применяют для диагностики инфекционных и аллергических болезней.

К неинфекционным антигенам относятся антигены растений, лекарственные препараты, химические, природные и синтетические вещества, антигены клеток животных и человека.

11.2. Конститутивные (врожденные) факторы защиты организма

Защита организма от антигенов осуществляется конститутивными (неспецифическими) и индуцибельными (специфическими) факторами.

Отличительные черты *конститутивных* (врожденных) защитных механизмов — их постоянное присутствие в организме независимо от действия дестабилизирующих факторов и отсутствие выраженной специфичности, т. е. сходность проявления при действии различных факторов. Такого рода защитные механизмы способны одновременно защищать организм от целого ряда факторов практически сразу после рождения.

К конститутивным защитным барьерам традиционно относят непроницаемость покровов, лизоцим, гидролитические ферменты и соляную кислоту желудочно-кишечного тракта, интерферон, воспаление, фагоцитоз, систему комплемента и другие присутствующие в крови гуморальные факторы конститутивной защиты.

Условно факторы неспецифической защиты подразделяют на четыре типа: физические (анатомические), физиологические, клеточные (фагоцитоз), факторы воспаления.

К физическим факторам относят кожу и слизистые оболочки, которые механически защищают организм от проникновения в него антигенов (бактерий, вирусов, макромолекул и др.).

Кожа, с одной стороны, является механическим барьером для различных антигенов, а с другой — выделения ее потовых и сальных желез содержат уксусную, муравьиную, молочную и жирные кислоты, которые обладают бактерицидными свойствами.

Механическую роль выполняют слизь и реснитчатый эпителий верхних дыхательных путей, освобождающие слизистые оболочки от

попавших на них частичек. Отторжение эпителия, кашель, чихание способствуют удалению пылевидных частиц различной природы, в том числе и микроорганизмов.

В верхнем отделе пищеварительного тракта роль защитного секрета играет выделяемая слизистой оболочкой и специализированными железами слюна, которая, помимо пищеварительных ферментов, содержит лизоцим. Выделяемые клетками слизистой оболочки желудка пищеварительные ферменты и соляная кислота также обладают выраженным микробоцидным действием, а в просвете тонкого кишечника к защитному эффекту выделяемых здесь ферментов присоединяется бактерицидный эффект компонентов желчи.

Нормальная микробиота кишечника является антагонистом по отношению ко многим патогенным и гнилостным микробам.

В случае проникновения микробов через кожу, слизистые оболочки в подлежащие ткани развивается воспаление. В местной воспалительной реакции выделяют следующие стадии:

расширение кровеносных сосудов и выход через их стенки зернистых — нейтрофилов (микрофаги) и незернистых — моноцитов лейкоцитов и др. (макрофаги);

образование лейкоцитарного вала вокруг патогена;

активное развитие микро- и макрофагальной реакции.

Кроме воспалительной реакции происходит образование отека, т. е. выпот плазмы из кровеносных сосудов. В отечной жидкости находятся гуморальные факторы неспецифической защиты: нормальные антитела, лизоцим, комплемент, пропердин, лизины, лактоферрин, интерферон, ингибиторы сыворотки крови.

В крови здоровых людей и животных обнаруживают нормальные (естественные) антитела, которые вступают в реакцию со многими антигенами в низких титрах 1:10—1:40. Эти антитела возникают в результате естественной иммунизации организма многими антигенами.

Особую и немаловажную роль в естественной резистентности играет лизоцим, открытый в 1909 г. П. Л. Лашенко и выделенный и изученный в 1922 г. А. Флемингом.

Лизоцим — это гидролитический фермент мурамидаза (от лат. *muris* — стенка) с молекулярной массой 14—16 кДа, синтезируемый макрофагами, нейтрофилами и другими фагоцитирующими клетками и постоянно поступающий в жидкости и ткани организма. Фермент содержится в крови, лимфе, слезах, молоке, сперме, уrogenитальном тракте, на слизистых оболочках дыхательных путей, ЖКТ, в мозге.

Отсутствует лизоцим лишь только в спинномозговой жидкости и передней камере глаза. В сутки синтезируется несколько десятков граммов фермента. Механизм действия лизоцима сводится к разрушению гликопротеидов (мурамилдипептида) клеточной стенки бактерий, что ведет к их лизису и способствует фагоцитозу поврежденных клеток. Следовательно, лизоцим обладает бактерицидным и бактериостатическим действием. Кроме того, он активизирует фагоцитоз и образование антител.

Нарушение синтеза лизоцима ведет к снижению резистентности организма, возникновению воспалительных и инфекционных болезней; в таких случаях для лечения используют препарат лизоцима, получаемый из яичного белка или путем биосинтеза, так как он продуцируется некоторыми бактериями (например, *B. subtilis*), растениями семейства крестоцветных (редис, репа, хрен, капуста и т. д.). Химическая структура лизоцима известна, и он синтезирован химическим способом.

Комплемент — многокомпонентная система белков сыворотки крови и других жидкостей организма, играющих важную роль в поддержании гомеостаза. Собственно белками системы комплемента являются 19. По мере первоначального открытия они получили обозначения С1, С2 и т. д. Среди них много предшественников ферментов — проферментов, приобретающих активность только после расщепления. Продукты расщепления обозначаются так же, как и исходные компоненты комплемента, но с добавлением строчных букв: как правило, для меньшего фрагмента — а, для большего — b (например, С3а и С3b).

Белки альтернативного пути активации системы комплемента не имеют в обозначении буквы С и обычно именуется факторами — факторами В, D и Р. В тексте слово «фактор» обычно сокращается до первой буквы (F) или вовсе опускается, и в результате фактор В может быть обозначен аббревиатурой FВ или просто В.

Регуляторные белки, входящие в систему комплемента, чаще всего обозначают аббревиатурами из начальных букв слов названий их функциональной активности; например, белок, ускоряющий диссоциацию С3-конвертазы классического пути, обозначается символом DAF (*decay-accelerating factor*) называется фактором ускорения диссоциации.

Все эти белки продуцируются и секретируются в плазму крови моно- и гепатоцитами (клетками печени), и их количества в норме

постоянны для млекопитающих конкретных видов. В крови система комплемента циркулирует в виде инертных предшественников, требующих активации.

Белки системы комплемента в норме содержатся в сыворотке крови, главным образом во фракции β -глобулинов. Только некоторые регулирующие белки представлены исключительно на мембранах клеток. Факторы комплемента вырабатываются клетками печени – гепатоцитами (до 90 %), а также моноцитами/макрофагами, клетками почечного эпителия, эндотелиальными клетками. Только C7 и фактор D вырабатываются преимущественно вне печени – соответственно в нейтрофилах и жировой ткани.

Существуют *три пути активации комплемента* – классический, альтернативный и лектиновый, различающиеся пусковыми механизмами. При *классическом пути* происходит связывание первого компонента комплемента C1 с иммунными комплексами (антиген + антитело), затем последовательно включаются остальные фракции комплемента, приводящие к формированию атакующего мембрану комплекса чужеродной клетки.

Альтернативный путь активации комплемента проходит без участия антител. Этот путь характерен для защиты от грамотрицательных микробов. Каскадная цепная реакция при альтернативном пути начинается со взаимодействия антигена (например, полисахарида) с протеинами B, D и пропердином (фактор P – сывороточный белок, входящий в состав C5-конвертазы альтернативного пути активации комплемента как стабилизирующий ее агент). Сформировавшийся комплекс (C3b)2BbP далее воздействует на белок C5 и все дальнейшие события, т. е. образование атакующего мембрану комплекса и лизис чужеродной клетки происходят в той же последовательности, что и после активации по классическому пути.

Сравнение двух основных путей активации системы комплемента показывает, что общая схема не имеет существенных различий, а участвующие в активации на сходных этапах белки близки по аминокислотному составу. Из наиболее выраженных отличий можно подчеркнуть зависимость первых этапов классического пути от присутствия ионов Ca^{2+} , тогда как для реализации начальных этапов альтернативного пути более существенными оказываются ионы магния.

Запускать *лектиновый путь комплемента* способны фиколины, сходные по структуре с коллектинами. В состав фиколинов входят две группы двух типов – N-концевые коллагеновые и C-концевые фибри-

ногеноподобные. Последние способны в присутствии Ca^{2+} связывать углеводы, прежде всего N-ацетилглюкозамин и маннозу.

Коллектины и фиколины относят к растворимым патогенраспознающим рецепторам в связи с их способностью распознавать углеводные «образы патогенности» и запускать механизмы иммунной защиты (в рамках врожденного иммунитета).

Интерферон – группа белковых веществ, принимающих участие в регуляции различных механизмов иммунного ответа. Индукторами образования интерферона являются вирусы, бактерии, токсины, митогены и др.

Интерфероны образуют автономную группу цитокинов. Общее свойство интерферонов – наличие у них противовирусной активности. В то же время, подобно другим цитокинам, они участвуют в регуляции иммунных процессов. Сочетание этих свойств делает интерфероны важными факторами врожденного (а в случае $\text{IFN}\gamma$ еще и адаптивного) иммунитета и служит основанием для широкого применения интерферонов в качестве лечебных препаратов.

Интерфероны были открыты в 1957 г. А. Исааксом (*A. Isaacs*) и Дж. Линдеманом (*J. Lindemann*) как гуморальные факторы, опосредующие интерференцию вирусов – индуцируемую вирусами неспецифическую резистентность, распространяющуюся не только на вирус-индуктор, но и на другие вирусы. В 70-е гг. были описаны варианты интерферонов – типы I и II, продуцируемые разными клетками под влиянием различных стимулов. Тогда же были обнаружены регуляторные функции интерферонов, что послужило основанием для причисления этой группы факторов к цитокинам. Клонирование генов интерферонов и получение рекомбинантных продуктов дало начало биотехнологическому производству этих молекул и значительно расширило возможности их использования в клинической практике.

Выделяют 12 (у человека – 9) видов интерферонов, обозначаемых греческими буквами. По способности взаимодействовать с тремя типами рецепторов их объединяют в три семейства. Больше всего видов принадлежит к интерферонам типа I: $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\delta$, $\text{IFN}\epsilon$, $\text{IFN}\kappa$, $\text{IFN}\tau$, $\text{IFN}\omega$, а также лимитин (у человека $\text{IFN}\delta$, $\text{IFN}\tau$ и лимитин не обнаружены). Тип II, ранее обозначавшийся как иммунный интерферон, включает единственный член – $\text{IFN}\gamma$. Описанный недавно тип III содержит три представителя – $\lambda 1$, $\lambda 2$ и $\lambda 3$, называемые также IL-29, IL-28A и IL-28B соответственно.

Ранее считалось, что $IFN\alpha$ — продукт моноцитов/макрофагов, $IFN\beta$ — фибробластов, а $IFN\gamma$ — Т-клеток, тем не менее установлено, что спектры клеток, продуцирующих интерфероны, значительно шире и для разных интерферонов они сильно перекрываются.

Клетками, продуцирующими интерфероны типа I, являются плазмочитоидные дендритные клетки, макрофаги, стромальные клетки, фибробласты, эпителиальные клетки, клетки плаценты, кератиноциты; типа II — T_H1 -клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, $\gamma\delta$ Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки; типа III — плазмочитоидные дендритные клетки, макрофаги.

Наиболее важное свойство интерферонов — их способность оказывать прямое противовирусное действие. Противовирусная активность наиболее высока у интерферонов типа I (α , ω , β); она сильно выражена, хотя и развивается несколько медленнее у интерферонов типа III. Интерфероны типов I и III способны усиливать защиту от внутриклеточных патогенов (не только вирусов, но и микобактерий, грибов, одноклеточных паразитов). К числу патогенов, в защите от которых играют роль интерфероны типа I, относят микобактерии, хламидии, токсоплазмы, лейшмании, кандиды, листерии, трипаносомы. В основе защитных свойств интерферонов, а также их противоопухолевой активности лежит способность интерферонов типа I (особенно $IFN\alpha$) усиливать активность клеток врожденного иммунитета. Не являясь классическими провоспалительными цитокинами, интерфероны типа I способствуют развитию воспаления, усиливая экспрессию молекул адгезии, фагоцитарную и бактерицидную активность макрофагов. Они стимулируют активность дендритных клеток, естественных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов. Важную роль играет также иммунорегуляторная активность интерферонов, проявляющаяся преимущественно в усилении $Th1$ -зависимого клеточного иммунитета и др.

$IFN\gamma$ занимает в семействе интерферонов особое место. Его противовирусная активность выражена слабо, однако он обладает сильным иммунорегуляторным действием и занимает одно из центральных мест в регуляции адаптивного иммунного ответа. $IFN\gamma$ образуют преимущественно лимфоидные клетки. В отсутствие иммунного ответа основными его продуцентами — NK- и NKT-клетками при иммунном ответе главным источником $IFN\gamma$ становятся Т-лимфоциты — цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки и особенно $Th1$ -клетки. $IFN\gamma$ могут синтезировать и миелоидные клетки, в том числе макрофаги и дендритные клетки.

Лизины – белки сыворотки крови, обладающие способностью лизировать некоторые бактерии, эритроциты.

Белок лактоферрин входит в состав секрета желез – слюнных, слезных, молочных; дыхательного, пищеварительного, мочеполового трактов. Защищает от микробов эпителиальные покровы. Лактоферрин считают фактором местного иммунитета.

Ингибиторы сыворотки крови – противовирусные вещества белковой природы, находятся в сыворотке крови, секретах дыхательного и пищеварительного трактов, в экстрактах органов и тканей, подавляют активность вирусов вне клетки.

При преодолении антигенами кожного и слизистого барьеров защитную функцию начинают выполнять лимфоузлы. В них происходят механическая задержка микробов и фагоцитоз макрофагами.

11.3. Фагоцитоз

Фагоцитоз (от гр. *phagos* – пожираю, *cytos* – клетка) – это процесс переваривания, инактивации инородных для организма веществ специализированными клетками – фагоцитами. К фагоцитам, как уже упоминалось, относят макрофаги и микрофаги. Функциональными элементами этих клеток являются лизосомы – гранулы величиной 0,25–0,5 мкм, содержащие различные ферменты и вещества, обеспечивающие разрушение антигенов.

Для осуществления своих функций фагоциты имеют рецепторный аппарат и набор литических ферментов.

К рецепторам мембраны макрофагов относят:

1) CD115 (CSF-1R) – рецептор для моноцитарного колониестимулирующего фактора (M-CSF);

2) рецепторы клеточной мембраны макрофагов, участвующие в процессе фагоцитоза:

CD14 – для комплексов бактериальных ЛПС с белками сыворотки крови, связывающими ЛПС (LBP), а также липоарабиноманнана клеточной стенки микобактерий и липотейхоевой кислоты грамположительных бактерий;

для фрагментов фосфолипидных мембран и других компонентов собственных поврежденных и умирающих клеток (рецепторы-«мусорщики», *scavenger receptors*). Таков, например, CD163 – рецептор для «старых» эритроцитов;

связывающий маннозу (*Macrophage Mannose Receptor*). Присутствует на мембране тканевых макрофагов и через маннозосодержащие поверхностные структуры связывает бактерии, вирусы и клетки патогенных грибов;

для комплемента – CR3 (интегрин CD11b/CD18) и CR4 (интегрин CD11c/CD18). Помимо комплемента они связывают и ряд бактериальных продуктов: ЛПС, липофосфогликан *Leishmania*, гемагглюнин из филаментов *Bordetella*, поверхностные структуры дрожжевых клеток *Candida* и гриба *Histoplasma*;

CD64 – для Fc-фрагментов IgG – FcγRI (Fcγ-рецептор первого типа), обеспечивающий фагоцитоз макрофагами иммунных комплексов. Сила связывания FcγRI с иммуноглобулинами различных изотипов убывает в ряду: IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2;

3) осуществляющие взаимодействие с лимфоцитами. Наряду с уже упомянутым CD64 к ним относят рецепторы:

для цитокинов, вырабатываемых активированными лимфоцитами. Связывание с ИФН-γ и фактором некроза опухоли α (ФНОα) активирует макрофаг. Через рецептор для ИЛ-10 макрофаг, напротив, инактивируется;

CD40, B7, МНС-II – мембранные молекулы для контактов с комплементарными мембранными молекулами лимфоцитов, т. е. для непосредственных межклеточных взаимодействий. У нейтрофилов такие рецепторы отсутствуют.

Схематическое отображение основных функциональных структур макрофага представлено на рис. 11.1.

Внутриклеточные лизосомы макрофагов содержат свыше 60 различных ферментов: рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза, фосфатаза, гликозидазы, арилсульфатазы (органические эфиры серной кислоты), коллагеназа, катепсины (например, катепсин В – цистеиновая протеаза, принимающая участие в апоптозе) и др.

Макрофаги и нейтрофилы, активированные продуктами микроорганизмов, начинают продуцировать цитокины и другие биологически активные медиаторы, инициирующие воспалительные реакции в очаге проникновения чужеродных агентов, подготавливая возможность развития адаптивного иммунного ответа.

Макрофаги продуцируют интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12); хемокин ИЛ-8; фактор некроза опухоли α (ФНОα); простагландины; икотриен В4 (LTB4); фактор, активирующий тромбоциты (ФАТ).

Нейтрофилы продуцируют ФНОα, ИЛ-12, хемокин ИЛ-8, LTB4 и ФАТ.

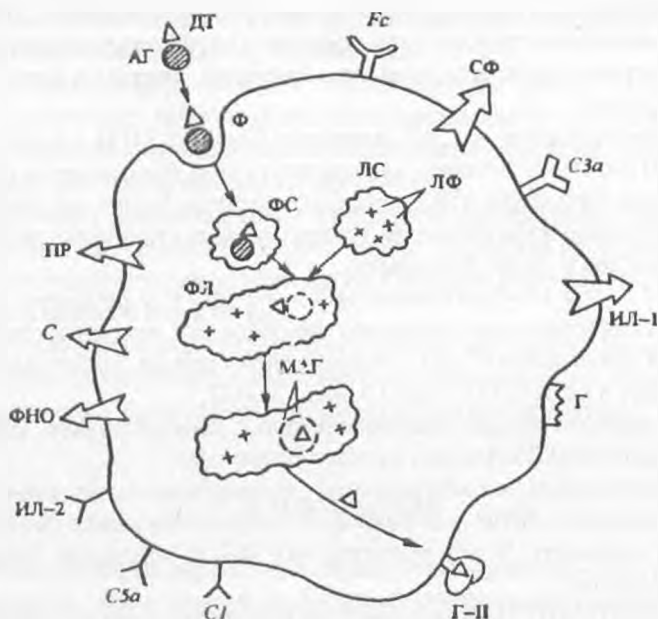


Рис. 11.1. Функциональные структуры фагоцита (по А. В. Воробьеву и др.): Г-II – антиген гистосовместимости II класса (HLA-DR, Ia); Fc-рецептор для Fc-фрагмента молекулы иммуноглобулина; C1, C3a, C5a – рецепторы для связывания соответствующих компонентов комплемента; ИЛ-2 – рецептор для ИЛ-2; Г – рецептор для гистамина; АГ – антиген; ДТ – антигенная детерминанта; Ф – фагоцитоз; ФС – фагосома; ЛС – лизосома; ЛФ – лизосомные ферменты; ФЛ – фаголизосома; МАГ – метаболизированный антиген; С – секрция компонентов комплемента; ПР – секрция перекисных радикалов; ИЛ-1 – секрция ИЛ-1; ФНО – секрция фактора некроза опухолей

Механизм и стадии фагоцитоза. Собственно процесс фагоцитоза может различаться в некоторых деталях у разных групп фагоцитов, но все-таки имеет общую схему его осуществления (рис. 11.2):

- активация и хемотаксис – целенаправленное движение клетки к объекту фагоцитоза в сторону повышающейся концентрации хемоаттрактантов, роль которых играют хемокины, компоненты комплемента и микробной клетки, продукты деградации тканей организма;
- адгезия (прикрепление) частиц к поверхности фагоцита. В адгезии важную роль играют Toll-подобные рецепторы, а также рецепторы к C3b-компоненту комплемента и Fc-фрагменту иммуноглобулина (такой фагоцитоз называется иммунным). Иммуноглобулины М, G,

C3b-, C4b-компоненты комплемента усиливают адгезию (являются опсонинами), служат мостиком между микробной клеткой и фагоцитом;

- поглощение частиц, их погружение в цитоплазму и образование вакуоли (фагосомы);

- внутриклеточный киллинг (убийство) и переваривание. После поглощения частицы фагосомы сливаются с лизосомами – образуется фаголизосома, в которой бактерии гибнут под действием бактерицидных продуктов гранул (кислороднезависимая система бактерицидности). Одновременно в клетке усиливается потребление кислорода и глюкозы – развивается так называемый респираторный (окислительный) взрыв, что приводит к образованию токсичных метаболитов кислорода и азота (H_2O_2 , супероксиданиона O_2^- , хлорноватистой кислоты, пироксинитрита), обладающих высокой бактерицидностью (кислородзависимая система бактерицидности).

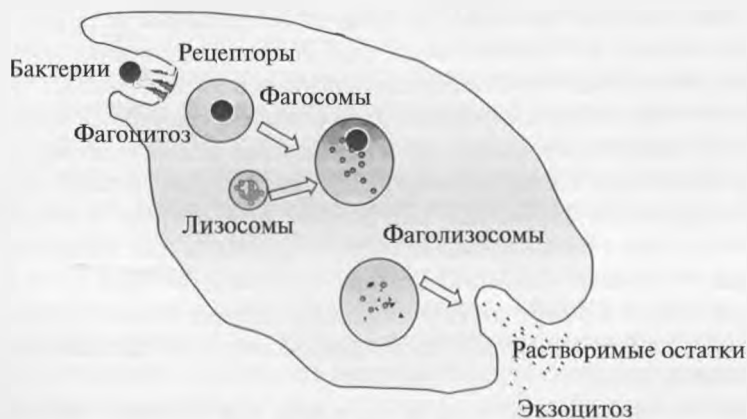


Рис. 11.2. Стадии фагоцитоза

Таким образом, первым этапом фагоцитоза считается хемотаксическое перемещение фагоцитирующей клетки к объекту фагоцитирования. Аттрактантами для фагоцитов могут быть как вещества, выделяемые проникшим во внутреннюю среду чужеродным агентом, так и вещества, появившиеся в тканевой жидкости в результате воздействия чужеродного агента на клетки организма. В частности, при разрушении клеток бактерий в тканевой жидкости появляется состоящий из формилметионина, лейцина и фенилаланина (сокращенно fMLP) ко-

роткий пептид, являющийся у прокариот инициатором синтеза белка и абсолютно несвойственный эукариотическим клеткам.

Среди наиболее типичных хемоаттрактантов собственного происхождения можно назвать медиаторы воспаления (лейкотриен В₄, гистамин и др.), продукты активации системы комплемента (С_{3а} и С_{5а}), образующиеся при запуске системы свертывания крови вещества (тромбин, фибрин), выделяемые различными клетками крови цитокины (ИЛ-1 β , ИЛ-2 и др.). Для этих веществ на поверхности фагоцитирующих клеток имеются специфические рецепторы, присоединение к которым действующего агента вызывает изменение связанного с рецепторами белка G, что и приводит к запуску целого ряда процессов. В частности, повышается восприимчивость клеток к различного рода активирующим факторам, повышается секреторная активность фагоцитов, но главным применительно к хемотаксису является перестройка цитоскелета и, как следствие, поляризация клетки. Клетка из округлой становится треугольной, в обращенной в сторону движения части цитоплазмы уменьшается количество органелл и появляется сеть состоящих из F-актина микрофиламентов, сокращение которых и определяет движение всей клетки в нужном направлении. На мембране в этой части клетки появляются в большом количестве интегринны — специфические молекулы для усиления адгезии движущейся клетки на стенках капилляров кровеносной системы, а также усиливается продукция фагоцитом катепсинов, коллагеназы и эластазы, способствующих проникновению через подстилающие эпителий базальные мембраны. Именно благодаря таким изменениям фагоцитирующие клетки и могут достаточно быстро перемещаться из крови к месту повреждения тканей, т. е. потенциального проникновения чужеродных агентов.

Сам же чужеродный агент в это время, как правило, опсонизируется, т. е. к его поверхности прикрепляются молекулы С_{3b} из системы комплемента и иммуноглобулины класса G, комплементарные антигенным детерминантам чужеродного агента. От того, насколько эффективно произойдет опсонизация, зависит следующий этап фагоцитоза — связывание фагоцита и чужеродного объекта.

Подобного рода связывание (часто называемое адсорбцией или адгезией) может происходить тремя способами. В том случае, когда чужеродный агент еще не успел опсонизироваться, его прикрепление к мембране фагоцита происходит в результате неспецифических взаимодействий. В частности, это может быть прилипание за счет

лектиноподобной активности поверхностных молекул наружной мембраны грамотрицательных бактерий либо имеющих на поверхности фагоцита интегринов. Интегрины способствуют взаимодействию клеток организма между собой, что обусловлено их сродством к определенным углеводным компонентам клеточных поверхностей. В ряде случаев имеет место частичное совпадение углеводных фрагментов у поверхностных молекул некоторых грамотрицательных бактерий и клеток млекопитающих, что и способствует адсорбции таких бактерий на поверхности фагоцита. Однако во всех этих случаях прикрепление оказывается непрочным, и последующее поглощение и уничтожение прикрепленной частицы оказывается наименее эффективным.

Два других способа связывания обеспечиваются специфическими взаимодействиями и реализуются в тех случаях, когда чужеродная частица опсонизирована. Связано это с наличием на поверхности фагоцитирующей клетки специализированных рецепторов для молекулы C3b (C1q35, CD21, CD11b/CD18 и CD11c/CD18), а также рецепторов Fc γ II и Fc γ III (CD32 и CD16 соответственно), обладающих высоким сродством к определенным участкам Fc-частей иммуноглобулинов класса G. Прикрепление за счет этих рецепторов, во-первых, оказывается в несколько раз прочнее описанного чуть ранее неспецифического взаимодействия, а во-вторых, любые частицы несмотря на различия в их поверхностях, могут одинаково эффективно прикрепляться и, следовательно, уничтожаться фагоцитирующими клетками.

Следующим этапом фагоцитоза является формирование фагосомы. Взаимодействие специфических поверхностных структур фагоцита со специфическим для них субстратом служит одним из сигналов для его активации. Активация начинается с диссоциации связанного рецепторами внутриклеточного белка G, который в диссоциированном состоянии активирует фосфолипазу C, катализирующую распад фосфоинозитидов до диацилглицерина и инозитол-3-фосфата. Под влиянием последнего начинается мобилизация из внутриклеточных депо ионов Ca²⁺, а диацилглицерин в присутствии ионов кальция активирует протеинкиназу C. Под воздействием данного фермента происходит перемещение белков цитоскелета к рецепторам, связанным с адгезированной частицей, и в данном месте клетки возникают псевдоподии, охватывающие частицу. Внутри псевдоподии низкомолекулярный G-актин полимеризуется в нитевидный F-актин, из которого формируются цитофилламенты псевдоподии. Вследствие

сокращения этих филаментов и изменения вязкости цитоплазмы за счет сшивания актиновых филаментов специальным белком актиногелином (этот белок перекрестно связывает нити F-актина и переводит тем самым цитоплазму в данном участке в состояние геля) возникает зона повышенной жесткости цитоплазмы, что обеспечивает ее локальное вдавливание в области контакта с фагоцитируемой частицей. При этом частица полностью охватывается мембраной фагоцита и происходит замыкание ее по принципу застежки «молния». Далее происходит превращение фагосомы в фаголизосому благодаря объединению с ней имеющихся в цитоплазме фагоцитирующей клетки лизосом.

Следует отметить, что начавшаяся при адгезивном контакте чужеродной частицы и фагоцита активация выражается не только в уже описанных процессах поглощения частицы, но и в подготовке к развитию так называемого кислородного (или дыхательного) взрыва. Под этим понимают происходящее с обязательным участием молекулярного кислорода и развивающееся в течение нескольких секунд после поглощения частицы образование химических продуктов, обладающих сильно выраженным окислительным действием. Высокая реакционная способность таких продуктов делает их сильнейшими бактерицидными веществами, и именно их действие определяет так называемую кислородзависимую инактивацию фагоцитированных микроорганизмов.

В основе кислородного взрыва лежит ряд последовательно происходящих реакций, начинающийся с накопления значительных количеств восстановленного НАДФ в процессах превращения глюкозы, описанных как гексозомонофосфатный шунт. Присутствующий в мембране образовавшейся фагосомы фермент НАДФН-оксидаза активируется уже упоминавшейся протеинкиназой С и катализирует превращение молекулярного кислорода в супероксиданион, при участии которого образуются еще несколько обладающих бактерицидной активностью агентов: водорода пероксид, синглетный кислород и гидроксил-радикал. Считается, что после слияния фагосомы с лизосомами в сформировавшейся фаголизосоме появляются миелопероксидаза, супероксиддисмутаза и каталаза. Под влиянием первой образуются дополнительные бактерицидные радикалы гипохлорит-анион и гипоиодит-анион, а каталаза и супероксиддисмутаза обеспечивают удаление избыточных количеств пероксида и супероксиданиона, поскольку они опасны и для самой фагоцитирующей клетки.

Подобного рода кислородзависимый механизм инактивации характерен как для нейтрофилов, так и для макрофагов, однако при разницы и протекании последнего существуют еще не совсем идентифицированные различия, требующие дальнейшего изучения.

Кроме описанных механизмов инактивации в фагоцитирующих клетках реализуются и так называемые кислороднезависимые. Они начинают проявлять себя после образования фаголизосомы, поскольку осуществляющие бактерицидное или бактериостатическое действие молекулы первоначально накапливаются в лизосомах различного типа.

Одной из групп подобным образом действующих соединений является группа катионных белков, включающая низкомолекулярные пептиды дефензины и имеющие большую молекулярную массу кателипин G, азуроцидин, белки р25, р37, р57 и ВР1. Дефензины обнаружены в лизосомах макрофагов кроликов и нейтрофилов человека и представляют собой состоящие из 30–33 аминокислотных остатков молекулы, которые при контакте с мембранами микробных клеток образуют в них ионные каналы, приводя тем самым микроорганизм к гибели. Считается, что действие дефензинов проявляется сразу же после реализации кислородзависимых защитных механизмов, когда среда в фаголизосоме еще имеет щелочные значения рН. Установлено, что щелочная среда сохраняется в фаголизосоме около 15 мин, а затем из-за поглощения фаголизосомой ионов водорода рН сдвигается до значений 4,5. Это создает благоприятные условия для проявления активности гидролитических ферментов, попадающих в фаголизосому из слившихся с ней лизосом, и одновременно ограничивает поступление в микробную клетку питательных веществ. Присутствующий здесь же лактоферрин, способный связывать ионы железа таким образом, чтобы бактерии не могли его использовать, также считается бактерицидным фактором. Способствует снижению жизнеспособности фагоцитированных бактерий также прямое действие на их клеточную стенку лизоцима, имеющегося в специализированных лизосомах фагоцитов.

Как правило, сочетанное и последовательное действие описанных защитных механизмов приводит микроорганизм к гибели, а затем они неспособные защищаться и репарировать себя клетки полностью разрушаются до низкомолекулярных веществ под влиянием ферментов (протеаз, липаз, нуклеаз и углеводдеструктурирующих ферментов). В этом случае фагоцитоз считается *завершенным*, поскольку осуществлен последний этап — полная деструкция фагоцитированного объекта.

Некоторые бактерии, захваченные фагоцитами, часто не погибают и могут длительно персистировать внутри фагоцитов. Факультативно и облигатно внутриклеточные паразиты после эндоцитоза сохраняют жизнеспособность и размножаются внутри фагоцитов, вызывая их гибель и разрушение. Выживание фагоцитированных микроорганизмов могут обеспечивать различные механизмы. Одни патогенные агенты способны препятствовать слиянию лизосом с фагосомами (токсоплазмы, микобактерии туберкулеза). Другие обладают устойчивостью к действию лизосомных ферментов (гонококки, стафилококки, стрептококки группы А и др.). Третьи после эндоцитоза покидают фагосому, избегая действия микробицидных факторов, и могут длительно персистировать в цитоплазме фагоцитов (рикетсии и др.). В этих случаях фагоцитоз остается *незавершенным*.

Следует отметить, что сохранившие жизнеспособность внутри фагоцитирующих клеток патогены укрываются таким образом от действия других защитных реакций организма-хозяина: на них не могут подействовать белки системы комплемента, иммуноглобулины и другие гуморальные факторы. Они фактически не могут быть обнаружены другими фагоцитирующими клетками и для уничтожения такого патогена организму приходится убивать собственные фагоцитирующие клетки, используя цитотоксические Т-лимфоциты.

Активность фагоцитов характеризуется фагоцитарными показателями и опсонофагоцитарным индексом. Фагоцитарные показатели оцениваются количеством бактерий, поглощенных или «переваренных» одним фагоцитом в единицу времени, а опсонофагоцитарный индекс представляет собой отношение фагоцитарных показателей, полученных с иммунной, т. е. содержащей опсонины, и неиммунной сывороткой. Эти показатели используются в клинической практике для определения иммунного статуса индивида.

11.4. Апоптоз, его роль в развитии и функционировании клеток иммунной системы

Апоптоз – регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Понятие «апоптоз» ввели в 1972 г. английские ученые Дж. Керр, А. Уилли, А. Керри при описании формы гибели лимфоцитов при действии глюкокортикоидов.

Апоптоз играет важную роль в гомеостазе. Клетки умирают от апоптоза в развивающемся эмбрионе в ходе морфогенеза или синантогенеза, а у взрослых животных – в ходе обновления тканей. Формообразовательные процессы в онтогенезе, гиперчувствительный ответ растений на вторжение патогена, осенний листопад – лишь несколько примеров программируемой клеточной смерти (апоптоза).

Апоптоз оказывает значительное влияние на становление и функционирование иммунной системы у человека и животных. Эта форма гибели клеток сопровождает развитие клеток иммунной системы, особенно лимфоцитов, на этапе их селекции (позитивная и негативная селекция Т- и В-лимфоцитов). Апоптоз играет роль также в реализации эффекторной функции Т- и НК-киллеров. В основе вызываемой ими гибели клеток-мишеней лежит индукция апоптоза вследствие проникновения в клетку-мишень гранзимов через поры, формируемые в ее мембране в результате полимеризации перфорины.

Апоптоз современными исследователями рассматривается как результат действия внутриклеточной генетической программы независимо от причины – нормальной или патологической, вызвавшей ее запуск. При апоптозе ядро и цитоплазма конденсируются, а клеточная оболочка герметизируется с экспозицией на внешней поверхности липидного фактора, вызывающего быстрый фагоцитоз макрофагами без развития воспалительной реакции. Апоптоз принципиально отличается от некроза, при котором происходит набухание и разрыв клеток с выливанием их содержимого и неизбежным развитием воспаления. При фагоцитозе апоптотических клеток и телец макрофаги не вырабатывают провоспалительные цитокины, но увеличивают продукцию цитокинов противовоспалительных. Важнейшим признаком апоптоза является интернуклеосомальный распад ядерной ДНК, что дает возможность маркировать апоптотические клетки *in situ* с помощью реакции TUNEL.

В развитии апоптоза ключевое значение имеют каспазы, к субстратам которых относятся жизненно важные белки ядра. Важную роль в развитии апоптоза играет повреждение митохондрий с выходом из них в цитоплазму мощного активатора каспаз – цитохрома С. Это явление связано с изменением экспрессии генов семейства Bcl-2, находящихся под контролем гена p53, активность которого определяет вступление клетки на путь апоптоза. Завершение многих иммунологических процессов апоптозом обусловлено взаимодействием рецептора Fas (CD95/APO-1) и его лиганда FasL, широко распространенных в клетках иммунной системы. Этот механизм самостоятельно или вместе с пер-

форин-гранзимовым компонентом является главным путем цитотоксического киллинга, осуществляемого Т- и NK-клетками. Элиминация этих клеток, уже выполнивших свою функцию, также происходит посредством FAS-опосредованного апоптоза. В клональной делеции незрелых Т-клеток в тимусе Fas/FasL системы не участвуют. Апоптоз осуществляется в ходе таких иммунологических реакций, как делеция В-лимфоцитов в герминативных центрах при активации антигеном и защита иммуопривилегированных органов. При адекватной регуляции апоптоза он поддерживает клеточное равновесие в иммунной системе. Ослабление или усиление темпов апоптоза индуцирует патологию иммунной системы.

Выделяют три фазы развития апоптоза: включение пусковых механизмов, активацию каспаз и гибель клетки. Апоптоз может быть запущен по двум механизмам — рецепторному и митохондриальному.

Рецепторный механизм запуска апоптоза реализуется с участием мембранных рецепторных молекул, цитоплазматическая часть которых представлена доменом смерти (*death domain*), содержащим около 80 остатков. Эти молекулы относят к семейству рецепторов TNF α . Известно шесть таких рецепторов: Fas-рецептор (APO-1, CD95, DR2), TNF-R1 (p55, CD120a, DR1), DR3, DR4, DR5, DR6. Их лиганды — Fas-лиганд (FasL, CD178 — для Fas-рецептора), цитокин TNF α (для TNFR1), TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* — для DR4 и DR5), TL1A (для DR3 и DR6). Все лиганды организованы в виде тримеров. Их взаимодействие с рецепторами приводит к тримеризации последних, что запускает сигнальный каскад. При этом домены смерти приобретают способность взаимодействовать с аналогичными доменами адапторных белков FADD (*Fas-associated death domain*) и TRADD (*TNF-receptor death domain*). FADD распознает домены смерти в составе прокаспазы 8 и, взаимодействуя с ними, вызывает активацию каспазы 8. Результат действия TRADD аналогичен, но он реализуется посредством FADD. Формирующиеся в результате указанных взаимодействий молекулярные комплексы называют DISC (*Death-inducing signaling complex*).

Митохондриальный механизм запуска апоптоза реализуется при повреждении функций митохондрий, приводящий к нарушению проницаемости их мембраны. Решающую роль на этом пути запуска апоптоза играют белки семейства Bcl-2. Их разделяют на проапоптотические (Bid, Bax, Bak, Bcl-XS и др.) и антиапоптотические (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 и др.). Запуск сигналов к апоптозу связан с проапоптотически-

ми белками, содержащими 1 домен ВН (*Bcl-2 homology*) – ВН3. Белки данной группы блокируют антиапоптотические факторы типа Bcl-2, образуя с ними димеры. Кроме того, в результате олигомеризации Bax и Bak они формируют трансмембранные поры. В норме олигомеризация этих факторов подавляется антиапоптотическими факторами. Через поры в мембране митохондрий в цитозоль выходят цитохром С и фактор Araf-1 (*Apoptose protease activation factor 1*). Araf-1 и цитохром С в присутствии АТФ образуют комплекс с неактивной каспазой – про-каспазой 9. Этот комплекс называют апоптосомой. В ней происходит активация каспазы 9.

Рецепторный механизм апоптоза может быть прерван активацией ингибиторов каспазы 8. Митохондриальный механизм блокируется антиапоптотическими факторами Bcl-2 и Bcl-XL, связывающими проапоптотические факторы. Пути запуска апоптоза не являются изолированными. Так, рецепторный механизм приводит к активации митохондриального фактора Bid, что обуславливает подключение митохондриального механизма апоптоза.

Установлено, что механизм контроля за балансом пролиферации и апоптоза осуществляется метаболитами сфингомиелина. Из них роль проапоптотического фактора играет церамид, действующий через механизмы митохондриального (через фактор Bax) и рецепторного (через Fas-рецептор) путей.

Оба пути запуска апоптоза активизируют каспазы – группы цистеиновых протеаз, расщепляющих полипептидную связь после остатка аспарагиновой кислоты. Как уже отмечалось, рецепторный путь приводит к активации каспазы 8, митохондриальный – к активации каспазы 9. Эти ферменты относят к группе инициаторных каспаз. Их активация – результат агрегации вследствие взаимодействия с адаптерными белками (FADD, Araf-1). При агрегации происходит аутокаталитическое отщепление длинного N-концевого участка каспазы с последующим формированием активного гетеродимера. После активации инициаторных каспаз процесс апоптоза становится необратимым.

Инициаторные каспазы вызывают частичный протеолиз (отщепление короткого продомена) и вследствие этого активацию исполнительных каспаз – каспазы 3, реже – каспазы 6 и каспазы 7. Известно около 10 молекул-мишеней исполнительных каспаз, локализованных преимущественно в ядре. Расщепление молекул-мишеней определяет все события при апоптозе. Действие каспаз на фактор ретинобластомы (Rb)

и δ -изоформу протеинкиназы С обуславливает нарушение контроля клеточного цикла. Расщепление киназ MEKK-1 и FAK приводит к изменениям, вызывающим ослабление адгезионной способности клетки, а расщепление гельсолина и киназы PAK определяет характерные изменения клеточной морфологии. Расщепление той же каспазой ядерных ферментов PARP (*Poly-ADP-ribose polymerase* – поли-АДФ-рибоза полимеразы), а также ДНК-зависимой протеинкиназы нарушает репарацию ДНК. Одна из главных мишеней каспазы 3 – нейтральная эндонуклеаза CAD (*Caspase-activated DNase*), ответственная за межнуклеосомную фрагментацию ДНК в апоптотических клетках. Показана причинная связь гибели клетки с фрагментацией ДНК: введение в клетку гена, кодирующего активную форму CAD, вызывают ее гибель. Среди других причин апоптотической гибели клетки называют истощение ее энергетических ресурсов вследствие нарушения функций митохондрий и неконтролируемых расходов энергии на репарацию ДНК.

Фагоцитоз апоптотических клеток способствует экспрессии на их поверхности молекул, служащих для фагоцитов источником сигналов типа «съешь меня». Так, при апоптозе нарушается асимметрия мембраны. Фосфатидилсерин, в норме локализующийся на внутренней поверхности мембраны, оказывается экспонированным снаружи (выявление его экспрессии по связыванию с меченым аннексином V используют для идентификации апоптотических клеток). Появляющиеся на поверхности фосфатидилсерин, а также тромбоспондин и десИАлированные остатки мембранных гликоконъюгатов распознаются рецепторами фагоцитов (как профессиональных, так и факультативных), что обеспечивает быстрый фагоцитоз апоптотических клеток. Такое завершение апоптоза чрезвычайно важно для организма, поскольку предотвращает поступление внутриклеточных компонентов, включая ДНК, в межклеточное пространство и последующее развитие воспаления и аутоиммунных процессов. В то же время чрезмерно интенсивное поглощение фрагментов ДНК может активировать (через внутриклеточные TLR) патологические процессы, ведущие к развитию системной аутоиммунной патологии, например системной красной волчанки (СКВ).

11.5. Индуцибельные факторы защиты организма (факторы адаптивного иммунитета)

Индуцибельные защитные реакции отсутствуют в организме изначально, возникают в течение жизни в результате контакта с конкретным дестабилизирующим фактором и обладают ярко выраженной специфичностью, т. е. защищают только от того фактора, который и вызвал проявление этого механизма.

Основные особенности адаптивного иммунитета, отличающие его от врожденного иммунитета, следующие:

он узкоспецифичен, поскольку направлен против индивидуальных чужеродных молекул — антигенов;

эффекторные клетки формируются в процессе иммунного ответа на антиген вновь;

формируется иммунологическая память (память о встрече с антигеном), ускоряющая и усиливающая ответ на повторное поступление антигена.

Иммунная система осуществляет свою биологическую функцию с помощью сложного комплекса взаимосвязанных реакций. В них задействованы все ее структурные и функциональные элементы. Конкретные проявления иммунного реагирования можно подразделить на отдельные формы: антителообразование, клеточно-опосредованный киллинг, индукция фагоцитоза, реакции гиперчувствительности (немедленного и замедленного типа), формирование иммунологической памяти или толерантности, идиотип-антиидиотипическое взаимодействие.

Все элементы иммунной системы имеют единый принцип управления и активируются практически одновременно, однако в зависимости от характера антигенного воздействия одна или несколько форм доминируют. Например, при токсинемической инфекции преимущественно активируется продукция антител, способных нейтрализовать молекулы токсина, при туберкулезной инфекции основную функцию по защите от инфекции выполняют факторы клеточного иммунитета.

11.5.1. Механизм иммунного ответа.

Генетический контроль и регуляция

Регуляция функций и всех защитных реакций организма, в том числе и иммуногенеза, осуществляется под контролем центральной нервной и эндокринной систем. При воздействии микроба-стрессора

на периферические ткани и органы чувств сигналы об этом по нервным путям поступают в гипоталамус. Последний, получив информацию, начинает выделять гормоны, воздействующие на гипофиз — рабочую железу, являющуюся общим регулятором эндокринной системы. Гипофиз выделяет аденокортикотропный гормон (АКТГ). Он поступает в кровь и лимфу и действует на периферические эндокринные железы, в частности на кору надпочечника. Там он стимулирует образование противовоспалительного гормона — кортизона, являющегося иммунодепрессантом (угнетает деятельность системы мононуклеарных фагоцитов и иммунокомпетентных клеток, образующих антитела).

Помимо АКТГ гипофиз выделяет гормон роста (соматотрофный гормон), который, наоборот, повышает реактивность тканей, стимулирует воспалительную реакцию, деятельность макрофагов, иммуночитов, плазмоцитов, синтез антител.

Основная функция гипоталамуса — регуляция выделения кортизона и гормона роста для обеспечения нормального развития иммуногенеза и постоянства внутренней среды организма, нарушенного микробом-стрессором.

В основе управления деятельности ИС находится ауторегуляторный механизм. Имунитету, как и всякой саморегулирующейся системе, необходимо самоограничение или обратная отрицательная связь. Когда иммунный ответ достигнет пика, включаются тормозные механизмы, снижающие активность образования плазматических клеток, Т-киллеров, выработки определенных цитокинов. Это происходит за счет активизации деятельности T_{reg} -клеток; выделения супрессорных цитокинов IL-10, трансформирующий фактор роста β (TGF β); супрессорных рецепторов Т-клеток, например рецептор CTLA-4 (CD152), структурного аналога главной ко-стимулирующей молекулы Т-лимфоцитов CD28; Fc-рецепторов типа Fc γ RIIB, локализованных на В-лимфоцитах и содержащих в своей цитоплазматической части последовательность ITIM; индукции синтеза антиидиотипических антител и др. Вопросы регуляции иммунного ответа на стадии его торможения еще далеко не решены.

Генетический контроль иммунного ответа осуществляется МНС. I α -гены контролируют высоту иммунного ответа, I α -гены играют роль в кооперативном взаимодействии В- и Т-лимфоцитов и макрофагов при иммунном ответе.

Гормоны, вырабатываемые в центральных органах СИ (тимозин и др. в тимусе, САП в костном мозге), также влияют на состояние Т- и

В-системы иммунитета, обеспечивают нормальное созревание и функционирование.

Пусковая роль в иммунном ответе принадлежит антигенному воздействию на иммунокомпетентные клетки. Иммунный ответ происходит в результате взаимодействия АПК (дендритных клеток, макрофагов), Т- и В-лимфоцитов, цитокинов. Он включает: 1) распознавание антигена; 2) активацию клеток; 3) их дифференцировку и пролиферацию.

Клетки взаимодействуют при контакте через специальные рецепторы на мембране клеток и при помощи цитокинов.

В иммунном ответе выделяют индуктивную и эффекторную (продуктивную) фазы. В индуктивную фазу происходит презентация антигена, т. е. передача информации об антигене от клеток врожденного иммунитета (АПК) инициаторам адаптивного иммунитета – Т-хелперам. Затем выбирается путь дальнейшего развития иммунного ответа по клеточному или гуморальному пути: через индукцию дифференцировки разновидностей Т-хелперов (Th1, Th2, Th17 и других). Наконец, при участии этих Т-хелперов происходит параллельная дифференцировка эффекторных клеток и клеток памяти. Эффекторная фаза иммунного ответа состоит в выполнении своих функций образовавшимися эффекторными клетками. Эта активность реализуется в форме клеточной или гуморальной иммунной защиты. В конце иммунного ответа благодаря включению регуляторных механизмов прогрессирование иммунных реакций замедляется и в результате приводит к их прекращению. Дифференцированные в процессе иммунного ответа клетки памяти активируются только при повторной встрече с антигеном, т. е. при вторичном иммунном ответе. Он протекает в принципе так же, как и первичный, но развивается быстрее и реализуется значительно эффективнее первичного.

Лимфоциты – единственный тип клеток в организме, при дифференцировке которых происходит обязательная рекомбинация ДНК в генах, кодирующих антигенраспознающие рецепторы. Таким образом, в организме непрерывно генерируется беспрецедентное разнообразие клонов лимфоцитов, несущих антигенраспознающие рецепторы различной специфичности. У Т-лимфоцитов возможно 10^{18} вариантов специфичностей и 10^{16} вариантов у В-лимфоцитов.

Связывание антигенраспознающего рецептора лимфоцита со специфичным лигандом необходимо, но еще недостаточно для инициации иммунного ответа. Помимо антигенраспознающего рецептора на

циркуляторного русла, повышенный выпот из сосудов в ткани плазмы или сыворотки (соответственно и всех сывороточных неспецифических противоифекционных факторов) и экстравазация лейкоцитов (в первую очередь фагоцитов-нейтрофилов). Локальный отек препятствует проникновению антигенов в системную циркуляцию.

Проникший в покровы патоген поглощается дендритной клеткой (ДК) и/или макрофагом при помощи эндоцитоза (чаще всего – фагоцитоза). И те и другие – профессиональные АПК, однако ДК обладают особыми свойствами и мигрируют из покровов (вместе с антигенами) в региональные лимфоидные органы. ДК процессируют антигены, проходят этапы созревания, экспрессируют на мембране комплексы пептидов с молекулами МНС класса II и необходимые корецепторные молекулы, с помощью которых они могут эффективно взаимодействовать с Т-лимфоцитами в Т-зависимых зонах периферических лимфоидных органов.

Кроме АПК в покровных тканях с антигенами контактируют внутриэпителиальные лимфоциты, среди которых много $\gamma\delta$ Т-клеток, распознающих непептидные антигены без предварительной презентации АПК. Под покровными тканями в плевральной и брюшной полостях присутствуют В1-лимфоциты, продуцирующие антитела с широкой перекрестной реактивностью, специфические в основном к распространенным бактериальным антигенам и аутоантигенам.

Не задержанный в барьерных тканях антиген может поступить непосредственно в системную циркуляцию. Тем не менее иммунный ответ на него еще может развиваться, поскольку АПК (ДК и макрофаги) присутствуют также в синусоидах селезенки, через которую проходит весь объем крови.

В Т-зависимых зонах лимфатических узлов ДК презентуют антигены (в комплексе с МНС класса II) интенсивно рециркулирующим Т-лимфоцитам, как бы проверяя их специфичность. Среди Т-клеток рано или поздно встретится лимфоцит, несущий рецептор, специфичный к данному антигену. Если при этом состоятся все необходимые и достаточные корецепторные взаимодействия с АПК, Т-лимфоцит получит активационный сигнал, что и станет началом собственно антигенспецифического иммунного ответа.

Двойное распознавание – распознавание фрагментов пептидного антигена, в комплексе с молекулами МНС класса I ($CD8^+$ ЦТЛ) или МНС класса II ($CD4^+$ Т-хелпером). При этом Т-лимфоциты инициируют иммунный ответ против чужеродного антигена, презентируемого АПК в комплексе со «своими» молекулами МНС класса II или

против клеток собственного организма, несущих свои вирусные или измененные пептиды в комплексе с МНС класса I.

Распознавший антиген Т-лимфоцит начинает пролиферировать и дифференцироваться. В результате образуется клон дифференцированных антигенспецифических Т-лимфоцитов. Такие Т-клетки называют лимфоцитами-эффекторами. В процессе дифференцировки Т-лимфоциты экспрессируют в надлежащем количестве мембранные молекулы и секретируют цитокины, необходимые для взаимодействия с В-лимфоцитами, лейкоцитами или для атаки клеток-мишеней.

В Т-зависимых зонах периферических лимфоидных органов происходит взаимодействие активированных антигеном Т-лимфоцитов с активированными антигеном В-лимфоцитами.

Провзаимодействовавшие с антигеном и с Т-клетками В-лимфоциты мигрируют в зону лимфоидного фолликула, где пролиферируют и дифференцируются в антителопродуценты — плазматические клетки. Часть плазматических клеток остается в лимфатическом узле. Секретируемые ими антитела в значительном количестве связываются рецепторами для Fc-фрагмента антител (FcR) ФДК и в таком виде способны в течение продолжительного времени удерживать антиген в лимфоидном фолликуле. Остальные плазматические клетки уходят из фолликулов лимфоидных органов и мигрируют преимущественно в костный мозг или слизистые оболочки, где и осуществляют массовое образование антител, секретируя их в кровь или во внешнюю среду.

Активированные Т-лимфоциты (ЦТЛ, Th1, Th2) выходят из региональных лимфатических узлов через эфферентные лимфатические сосуды, попадают в системную циркуляцию, а оттуда — в очаг воспаления в месте проникновения или диссеминации патогена.

Если Т-лимфоциты в очаге воспаления находят и связывают специфический антиген, они начинают усиленно синтезировать и секретировать эффекторные молекулы — цитотоксины (ЦТЛ), непосредственно вызывающие гибель клеток-мишеней, или цитокины (Th1 или Th2), вовлекающие в деструкцию антигена другие лейкоциты (макрофаги, эозинофилы, тучные клетки, базофилы, нейтрофилы), в том числе различные популяции лимфоцитов.

В конечной фазе иммунного ответа связанный антиген подвергается фагоцитозу и последующему разрушению гидролитическими ферментами, кислородными радикалами и радикалами оксида азота до мелких метаболитов, выводимых из организма через почки и пищеварительный тракт.

11.5.2. Гуморальный иммунитет

Гуморальный иммунитет — одна из форм приобретенного иммунитета. Играет важную роль в противоифекционной защите организма и обусловлен специфическими антителами, выработанными в ответ на чужеродный антиген. Считается, что патогенные микроорганизмы, размножающиеся в организме внеклеточно, как правило, определяют гуморальный иммунитет.

11.5.2.1. Природа, физико-химические свойства и функции антител

Антитела — это специфические белки — иммуноглобулины, которые образуются в организме животных под влиянием антигенов и способны специфически соединяться с ними. Антитела связаны в основном с γ -глобулиновой фракцией сывороточных белков, в альбуминах их нет, меньшая часть антител принадлежит β -глобулинам.

Имуноглобулины составляют 15–20 % белков плазмы крови, а также находятся и в других жидкостях организма. В состав γ -глобулинов входит 18 аминокислот, из которых в наибольшем количестве содержатся оксиаминокислоты, дикарбоновые аминокислоты, глутаминовая и аспаргиновая аминокислоты, треонин, серин и валин.

Антитела не разрушаются при кратковременном воздействии на них слабых кислот и щелочей, выдерживают нагревание до 60 °С, не инактивируются трипсином в течение 7 дней при температуре 37 °С. Имеют молекулярную массу 150–900 кДа. Скоростное ультрацентрифугирование сывороточных белков показало, что антитела делятся на две группы. Одна состоит из небольших молекул с константой седиментации 7S, другая — из больших с константой седиментации 19S.

Участие антител в реализации иммунной защиты может осуществляться как путем прямого действия на молекулы или организмы (носители антигенов), так и косвенно, путем привлечения дополнительных эффекторных механизмов (комплемент, фагоциты).

Функции иммуноглобулинов в защитных реакциях организма:

- 1) ограничение подвижности антигенов (диффузионной или активной) во внутренней среде и на поверхности слизистых оболочек;
- 2) нейтрализация токсических или патогенных свойств антигенов;

- 3) опсонизация чужеродных частиц и усиление за счет этого эффективности фагоцитоза;
- 4) активация системы комплемента;
- 5) обеспечение антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

Нейтрализующее и блокирующее действие антител. Лучше всего изучены два механизма прямой реализации защитной функции антител — нейтрализация токсинов и поверхностная блокада патогенов. Экзотоксины — основные факторы патогенности ряда микроорганизмов (например, возбудителей дизентерии, столбняка, ботулизма, газовой гангрены). Нейтрализация наиболее эффективна, если функциональная группа токсина одновременно служит эпитопом или пространственно перекрывается с ним. На нейтрализующей способности антител основана серотерапия и серопрфилактика дифтерии, бешенства, болезней, вызываемых анаэробными бактериями. Блокада нейтрализующими антителами поверхности вирусов препятствует инфицированию ими клеток. Нейтрализация антигенов — основная функция антител субклассов IgG2 и IgG4, слабо связывающих комплемент и не взаимодействующих с Fc-рецепторами фагоцитов.

Блокирующая активность антител связана с нарушением функций мембранных структур патогенов, с которыми взаимодействуют антитела или которые пространственно экранируются ими. Общеизвестным проявлением такого действия является обездвиживание бактерий при взаимодействии антител с антигенами жгутиков или иных структур, отвечающих за подвижность клетки. Блокирующий эффект составляет основу действия IgA-антител, особенно секреторных. Их активность проявляется главным образом в полости кишечника или других трактов. Взаимодействуя с антигенами поверхности микроорганизмов, антитела не только нарушают их подвижность, но и препятствуют их адгезии на поверхности эпителиальных клеток слизистых оболочек, тем самым предотвращая колонизацию эпителиального покрова и проникновение патогенов через эпителиальный барьер во внутреннюю среду организма.

Защитная активность антител, опосредованная связыванием комплемента. Значительно больше востребован другой механизм проявления защитной активности антител. Формируя иммунный комплекс с антигенами поверхности чужеродных клеток (прежде всего патогенов), антитела изменяют свою конформацию таким образом, что при этом

демаскируются участки доменов СН2 и СН3, экранированные в интактной молекуле антитела L-цепями. Это обеспечивает связывание с иммунным комплексом сывороточной молекулы С1q, что приводит к каскадной активации комплемента по классическому пути и реализации двух эффекторных иммунных механизмов. Один из них связан с опсонизацией – отложением на поверхности клетки-мишени избыточного количества фрагментов С3b. При дальнейшем расщеплении эти фрагменты превращаются в iС3b и С3d, распознаваемые С3-рецепторами фагоцитирующих клеток, что обеспечивает поглощение и разрушение ими патогена. Другой механизм обусловлен литическим действием комплемента: последовательное вовлечение в реакцию «поздних» компонентов комплемента завершается формированием (с преимущественным участием фактора С9) в мембране клетки-мишени поры, нарушающей целостность клеточной стенки микроорганизма и приводящей к его гибели.

Комплементсвязывающая способность в наибольшей степени свойственна антителам классов IgM, IgG1 и IgG3 из-за их высокого сродства Fc-доменов к С1q. Вклад прямого литического действия комплемента в его суммарный защитный эффект невелик, и оно распространяется на ограниченный круг микроорганизмов, прежде всего нейссерий. Дефицит С3 и других, более ранних компонентов комплемента имеет больше проявлений в виде различных иммунодефицитов, что свидетельствует о важной роли опсонизирующего действия комплемента.

Защитное действие антител, опосредованное привлечением эффекторных клеток. Способность Fc-рецепторов различных клеток, прежде всего фагоцитов, распознавать участки в доменах СН2 и СН3 молекул IgG-антител в составе иммунных комплексов имеет многообразное отражение в норме и при патологии. Антитела в составе растворимых иммунных комплексов распознаются Fc-рецепторами, что обеспечивает их поглощение (эндоцитоз) и последующее расщепление внутри клеток. Элиминацию растворимых иммунных комплексов осуществляют преимущественно макрофаги. Это очень важная функция, поскольку накопление растворимых комплексов, способных взаимодействовать с самыми разнообразными клетками и откладываться в различных тканях, привлекая воспалительные клетки, приводит к развитию патологии.

Антитела, связывающиеся с молекулами поверхности патогенов или иных чужеродных клеток, сами по себе без комплемента, оказывают опсонизирующее действие, так как распознаются Fc-рецепто-

рами фагоцитов и тем самым облегчают фагоцитоз. Опсонизирующей активностью в наибольшей степени обладают антитела изотипов IgG1 и IgG3. По опсонизирующей активности антитела несколько уступают компонентам комплемента, но часто они располагаются на поверхности клетки одновременно, что обеспечивает максимальную эффективность опсонизации. Суммирование эффектов двух опсонизирующих агентов (антител и компонентов комплемента) наглядно иллюстрируют результаты экспериментов по оценке выживаемости микроорганизмов *in vitro* после введения в систему сначала антител, а затем комплемента: каждый из этих факторов снижает выживаемость на два порядка.

Установлено, что различные типы Fc-рецепторов широко представлены на всех фагоцитирующих клетках, но богаче всего ими макрофаги, которые экспрессируют все три основных типа рецепторов, в том числе FcγRI, способный связывать свободные, не входящие в иммунный комплекс антитела. На этом основан особый механизм вовлечения антител в реализацию эффекторных функций макрофагов. Свободные антитела фиксируются FcγRI на их поверхности. При накоплении в тканевой жидкости больших количеств антител к определенным патогенам (при инфицировании) макрофаги могут удерживать на своей поверхности большое число молекул антител одной специфичности. Это обеспечивает специфическое распознавание патогена макрофагами, которые сами по себе не способны осуществлять антигенспецифическое распознавание. Такие макрофаги называют армированными. Им приписывают очень высокую антимикробную активность; *in vitro* они проявляют также противоопухолевую активность.

К опсонизирующим эффектам можно отнести способность антител, прикрепленных к клеткам-мишеням (опухолевым, аллогенным), облегчать реализацию клеточного (контактного) цитолиза НК-клетками. И в этом случае наибольшую активность проявляют антитела изотипов IgG1 и IgG3 благодаря их наибольшему родству к рецептору FcγRIII, экспрессируемому естественными киллерами. Распознавание фиксированных антител облегчает узнавание киллером клетки-мишени. Такой вариант цитотоксической реакции называют антителозависимым клеточноопосредованным цитолизом. Для его реализации необходима не особая разновидность НК-клеток (как считалось ранее), а экспрессия на поверхности НК-клеток рецептора FcγRIII, т. е. молекулы CD16, что характерно для субпопуляции естественных киллеров с фенотипом CD56^{lo}CD16⁺, преобладающей в циркуляции. Этот же

механизм цитоллиза используют другие клетки, не являющиеся «профессиональными» контактными киллерами, например нейтрофилы и макрофаги.

Таким образом, как и клеточные факторы адаптивного иммунитета, антитела реализуют свое защитное действие, преимущественно привлекая факторы врожденного иммунитета – фагоциты, естественные киллеры, компоненты комплемента. При этом они существенно повышают их эффективность и придают их действию прицельность.

Структура антител. Иммуноглобулины – белки с четвертичной структурой, т. е. их молекулы построены из нескольких полипептидных цепей. Молекула каждого класса состоит из четырех полипептидных цепей – двух тяжелых (*H* – heavy) и двух легких (*L* – light), связанных между собой дисульфидными мостиками. Тяжелые цепи определяют принадлежность иммуноглобулинов к соответствующему классу.

В цепях молекулы иммуноглобулина различают константные (С) и переменные (V) фрагменты (рис. 11.3). Биологически активные участки цепей иммуноглобулина получили название доменов. Различают СL-, СH1-, СH2- и СH3-домены, в V-фрагменте – VH- и VL-домены (в зависимости от цепи).

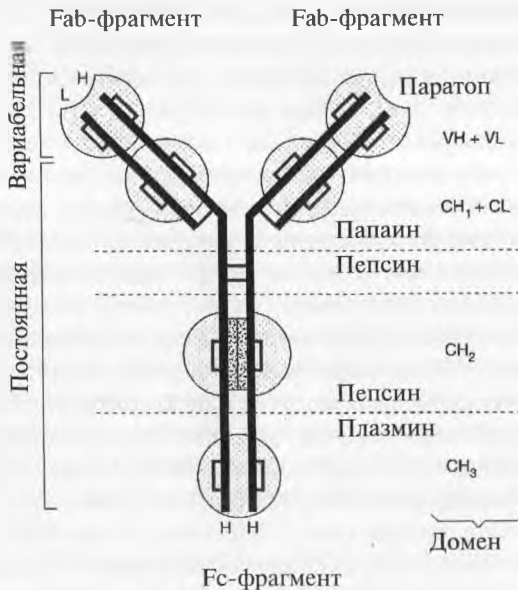


Рис. 11.3. Структура IgG

Вариабельные домены тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулинов формируют активный центр молекулы антитела. Та часть активного центра Ig, которая непосредственно соединяется с детерминантой антигена (эпитопом), называется *паратопом*. Между CH1- и CH2-доменами тяжелой цепи локализуется подвижный «шарнирный» участок молекулы иммуноглобулина, чувствительный к протеолитическим ферментам (папаину, пепсину, трипсину). Под действием папаина молекула иммуноглобулина расщепляется на два Fab-фрагмента (*fragment antigen binding* – фрагмент, связывающий антиген) и Fc-фрагмент (*fragment crystallizable* – фрагмент кристаллизующийся).

Когда молекула Ig связывается с антигеном, CH2-домен Fc-фрагмента иммуноглобулина активирует комплемент по классическому пути, CH3-домен может связываться с Fc-рецепторами, имеющимися на лейкоцитах и других клетках.

Классы иммуноглобулинов. Известно пять классов иммуноглобулинов, обозначаемых как IgG, IgM, IgA, IgD, IgE (рис. 11.4). У отдельных классов описаны подклассы.

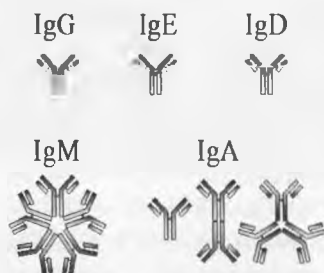


Рис. 11.4. Строение молекул иммуноглобулинов различных классов

Иммуноглобулин класса M – наиболее крупная молекула из всех иммуноглобулинов. Это пентамер, который имеет 10 антигенсвязывающих центров. Его молекулярная масса – около 900 кДа, константа седиментации – 19S. Различают подтипы M1 и M2. Тяжелые цепи молекулы IgM, в отличие от других изотипов, построены из пяти доменов. Являясь полимерной молекулой, содержит J-цепь. Период полураспада – 5 дней. На его долю приходится 5–10 % IgM из числа всех циркулирующих Ig. Среднее содержание IgM в сыворотке крови здорового взрослого человека – около 1 г/л. Этого уровня человек достигает уже к 2–4-летнему возрасту. IgM – филогенетически наиболее древний иммуногло-

булин. Образуется в начале первичного иммунного ответа. Обладает высокой авидностью, наиболее эффективный активатор комплемента по классическому пути. Большая часть нормальных антител и изоагглютининов относится к IgM. Иммуноглобулин не участвует в аллергических реакциях, не проходит через плаценту. Обнаружение высоких титров специфических антител изотипа М в сыворотке крови новорожденного указывает на внутриутробную инфекцию или дефект плаценты. IgM обеспечивает нейтрализацию, опсонизацию и маркирование антигена, осуществляет запуск комплемент-опосредованного цитолиза и антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности.

Иммуноглобулин класса G составляет основную массу иммуноглобулинов сыворотки крови, на его долю приходится 70–80 % всех циркулирующих антител, при этом 50 % содержится в тканевой жидкости. Среднее содержание IgG в сыворотке крови здорового взрослого человека — 12 г/л, что достигается к 7–10-летнему возрасту. Период полураспада IgG — 21 день. IgG — мономер, имеет два антигенсвязывающих центра. Молекулярная масса — около 160 кДа, константа седиментации — 7S. Синтезируется зрелыми В-лимфоцитами (B_{γ} , экспрессирующие гены тяжелых цепей γ -типа) и плазматическими клетками. Хорошо определяется в сыворотке крови на пике первичного иммунного ответа и при вторичном. Обладает высокой аффинностью. IgG играет основную роль в защите от многих вирусных и бактериальных инфекций (оспа, бешенство, столбняк и др.), обладает выраженными свойствами нейтрализации токсинов.

Известны четыре подкласса IgG, различающиеся по структуре тяжелой цепи. Они обладают разной способностью взаимодействовать с комплементом и проходить через плаценту. Различают подтипы G1–G4. IgG1 и G3 связывают комплемент, причем G3 активнее. IgG4, подобно IgE, обладает цитотропностью (тропностью, или сродством, к тучным клеткам и базофилам) и участвует в развитии аллергической реакции типа I.

Легко проходит через плацентарный барьер и обеспечивает гуморальный иммунитет новорожденного впервые 3–4 мес. после рождения, в том числе обнаруживается в молоке. IgG обеспечивает нейтрализацию и маркирование антигена, осуществляет запуск комплемент-опосредованного цитолиза и АЗКЦТ.

Иммуноглобулин класса A существует в сывороточной и секреторной формах. Около 60 % всех IgA содержится в секретах слизистых оболочек.

Сывороточный IgA — на его долю приходится около 10–15 % всех циркулирующих иммуноглобулинов. В сыворотке крови здорового взрослого человека содержится около 2,5 г/л IgA, максимум достигается к 10-летнему возрасту. Период полураспада — 6 дней. IgA — мономер, имеет два антигенсвязывающих центра, молекулярную массу около 170 кДа и константу седиментации 7S. Различают подтипы A1 и A2. Синтезируется зрелыми иммунными В-лимфоцитами (B_{α} , экспрессирующие гены тяжелых цепей α -типа) и плазматическими клетками. Хорошо определяется в сыворотке крови на пике первичного иммунного ответа и при вторичном. Обладает высокой аффинностью. Не связывает комплемент. Не проходит через плацентарный барьер. IgA обеспечивает нейтрализацию и маркирование антигена, осуществляет запуск АЗКЦТ.

Секреторный IgA (sIgA) существует в полимерной форме в виде димера (4-валентный), несет четыре паратопа и содержит J- и S-пептиды. Молекулярная масса — 350 кДа и выше, константа седиментации — 13S и выше (рис. 11.5). Как видно из рис. 11.5 димерная молекула IgA состоит из двух мономеров, гомологичных по структуре IgG и соединенных между собой J-цепью. Особенностью молекулы IgA является наличие секреторного компонента, защищающего ее от энзиматического расщепления. Синтезируется B_{α} -лимфоцитами, плазматическими клетками и, возможно, В1-лимфоцитами в пределах слизистых оболочек и выделяется в их секреты. Объем продукции может достигать 5 г в сутки. Пул sIgA считается самым многочисленным в организме — его количество превышает суммарное содержание IgM и IgG. В сыворотке крови sIgA не обнаруживается.



Рис. 11.5. Структура молекулы секреторного IgA

Формирование четвертичной структуры молекулы sIgA происходит при ее транслокации через эпителиальную клетку. На базальной и латеральной поверхностях эпителиальная клетка несет рецептор к J цепи полимерной молекулы Ig (JR). Присоединяясь к рецептору, IgA

эндоцитируется клеткой в виде везикулы и переносится к апикальной поверхности эпителиоцита, где JR подвергается ферментативному расщеплению. В результате IgA высвобождается в слизистый секрет просвета органа уже в секреторной форме, так как оставшийся прикрепленным к молекуле Ig фрагмент JR становится S-цепью.

Секреторная форма IgA – основной фактор специфического гуморального местного иммунитета слизистых оболочек желудочно-кишечного и респираторного тракта, мочеполовой системы. Благодаря S-цепи, он устойчив к действию протеаз. Секреторный IgA не активирует комплемент, но эффективно связывается с антигенами, нейтрализует их и препятствует адгезии микробов на эпителиальных клетках.

Имуноглобулин D – его концентрация в сыворотке не превышает 1 % от общего количества иммуноглобулинов, молекулярная масса – 160 кДа, константа седиментации – 7S. Не фиксирует комплемент. Биологическая функция не совсем ясна. Эти иммуноглобулины служат рецепторами созревших В-лимфоцитов. Количество IgD увеличивается при некоторых вирусных инфекциях, при миеломной болезни у человека и хронических воспалительных процессах.

Имуноглобулин E – молекулярная масса – 190 кДа, константа седиментации – 8,5S, концентрация в сыворотке крови в среднем – 0,25 мг/л. Термолабилен, инактивируется нагреванием при 56 °С в течение 1 ч, не связывает комплемента, быстро и прочно связывается с клетками тканей, с тканевыми базофилами, принимает участие в реакции гиперчувствительности немедленного типа. Считают, что IgE играет защитную роль при гельминтозных и протозойных болезнях. Синтезируется в основном в коже, лимфоидной ткани органов дыхания и пищеварительной системе.

Наиболее изучены пределы усредненных концентраций разных изотипов иммуноглобулинов у человека. У животных содержание разных изотипов иммуноглобулинов в значительной степени зависит от вида животного, возраста, физиологического состояния и других факторов. При этом установлено, что у крупного рогатого скота IgG регистрируется 3,4–26,5 г/л, IgM – 0,9–3,2, IgA – 0,06–0,8 г/л; у овец IgG составляет 10,8–30,0 г/л, IgA – 0,05–1,4, IgM – 0,8–8,8 г/л; у свиней – IgG 38,0 г/л, IgA – 2,4, IgM – 2,9 г/л; у цыплят-бройлеров (на 56-й день жизни) IgG составляет 5,6–7,4 г/л, IgA – 2,81–3,59, IgM – 2,09–2,71 г/л.

Виды антител. Различают естественные и иммунные антитела. *Естественные антитела* находятся в организме без предварительного

введения антигена (иммунизации). Примером таких антител являются изогемагглютинины сыворотки крови человека группы I, направленные против А- и В-антигенов эритроцитов людей групп крови II–IV. Встречаются естественные антитела против микробов, которые служат факторами естественного и видового иммунитета. В небольшом количестве в крови имеются «нормальные антитела», способные взаимодействовать с собственными антигенами организма (аутологичные антитела), они стимулируют дифференцировку клеток.

Иммунные антитела накапливаются и выявляются в сыворотке крови после предварительной иммунизации антигенами. Различают несколько видов таких антител:

противоинфекционные — образуются после попадания в организм антигенов микробов, вирусов, простейших, грибов, токсинов. Соответственно различают антибактериальные, антитоксические, антивирусные и др.;

неинфекционные — появляются при контакте с неинфекционными антигенами. Среди них различают ксеногенные (антивидовые — против антител другого вида), аллогенные (внутривидовые — против изоантигенов одного вида) и аутоантитела (к собственным антигенам организма).

По феноменологическому проявлению взаимодействия с антигенами антитела подразделяются на преципитирующие, лизирующие, агглютинирующие, комплементфиксирующие, нейтрализующие.

Бивалентные антитела (обычно класса G), имеющие два активных центра, получили название полных антител. Наряду с ними существуют моновалентные неполные (или блокирующие) антитела, которые имеют один антигенсвязывающий участок, а не два, как полноценные антитела. Неполные антитела связываются с антигенами, но не склеивают их, блокируя преципитацию и агглютинацию антигенов. Такие антитела после взаимодействия со специфическим антигеном не дают видимого проявления серологических реакций. Выявить такие антитела можно при помощи реакции Кумбса — путем использования «вторых», антииммуноглобулиновых антител.

Сила связывания (средство) одного активного центра антитела с эпитопом антигена получила название аффинности (аффинитета). Прочность связывания всей иммуноглобулиновой молекулы с антигеном называется *авидностью* (авидитетом). Обычно она прогрессивно увеличивается с повышением количества активных центров в иммуноглобулиновой молекуле. Отсюда наибольшей авидностью обладают IgM.

Известны также моноклональные и антиидиотипические антитела. При иммунизации антигеном в сыворотке крови появляется широкий спектр АТ с различной аффинностью. Это обусловлено тем, что антиген стимулирует большое количество клонов В-клеток. Получаемые таким образом поликлональные иммунные антитела и сыворотки представляют собой смесь иммуноглобулиновых молекул различных классов. Разработаны методы получения моноклональных антител (гибридная технология). Такие антитела моноспецифичны, направлены к одному эпитопу антигена.

Поскольку у антител, специфических к различным антигенным детерминантам, конструкция активных центров неодинакова за счет наличия разных аминокислот в гипервариабельных областях молекулы, должны существовать антигенные различия между разными антителами, даже если они относятся к одному классу, субклассу и аллотипу (внутривидовые антигенные различия цепей иммуноглобулинов). Эти различия обнаружены и названы *идиотипами*. Фактически идиотипы – такие антигенные детерминанты, которые отличают один V-домен от всех других V-доменов. Антитела, полученные к идиотипическим детерминантам активных центров антител, называются *антиидиотипическими*.

11.5.2.2. Синтез и динамика образования антител

Установлено, что антитела вырабатываются плазматическими клетками, находящимися в селезенке, лимфатических узлах, костном мозге, пейеровых бляшках. Плазматические клетки происходят из предшественников В-клеток, подвергшихся контакту с антигеном. Плазматические клетки имеют большой размер (20 мкм и более). Для ядра этих клеток характерна периферическая конденсация хроматина. Цитоплазма характеризуется большим объемом, базофилией и сильно развитым аппаратом синтеза белка (разветвленный эндоплазматический ретикулум, рибосомы, аппарат Гольджи). Цитоплазма имеет максимальный объем на стадии незрелой плазматической клетки, которая еще сохраняет способность к делению. Зрелые плазмциты представляют собой образец высокоспециализированных клеток. До 50 % матричной РНК в зрелых плазматических клетках кодирует иммуноглобулин, на долю которого приходится около 30 % синтезируемого белка.

Каждая плазматическая клетка синтезирует и секретирует антитела одного изо-, алло- и идиотипа одной специфичности. Все эти характеристики совпадают со свойствами мембранного иммуноглобулина

В-клетки – предшественницы плазмочита. При образовании растворимых форм иммуноглобулинов/антител плазмочита вместо мембранной синтезируют свободную молекулу иммуноглобулина. Механизм переключения состоит в удалении (путем сплайсинга) из молекулы матричной РНК, кодирующей Н-цепь, экзонов МС, ответственных за синтез мембранного домена молекулы, и экспрессии экзона SC, кодирующего С-концевую часть растворимой молекулы иммуноглобулина.

Синтез полипептидных цепей антител происходит в полисомах, связанных с шероховатым эндоплазматическим ретикулулом, причем в синтезе антител участвуют два вида полисом. Одни состоят из 6–7 рибосом, обеспечивающих синтез легких цепей, другие имеют 16–17 рибосом, синтезирующих тяжелые цепи. Сборка мономерной молекулы происходит по одному из двух путей. Первый из них состоит в димеризации Н-цепей с последовательным подсоединением к Н-димеру двух L-цепей: $H + H = H_2 \rightarrow H_2 + L = H_2L = H_2L + L = H_2L_2$.

Второй путь начинается с образования димера Н- и L-цепей; затем два таких димера объединяются и формируется «зрелая» молекула иммуноглобулина: $H + L = HL \rightarrow HL + HL = H_2L_2$.

Первый вариант характерен для синтеза IgG, второй – для синтеза IgM. Растворимая форма иммуноглобулина не способна встраиваться в мембрану; молекула поступает из эндоплазматического ретикула в аппарат Гольджи, где подвергается процессингу, гликозилированию, переходит в секреторные везикулы и секретируется.

Одна плазматическая клетка может переключаться с синтеза IgM на синтез IgG, IgA, IgE.

Динамика продукции антител, как и химическая структура их молекул, детерминирована генетически. Каждому виду животных свойственна характерная динамика образования антител. Она зависит также от особенностей и доз антигена, путей проникновения его в организм, состояния реактивности макроорганизма.

Четыре фазы образования антител:

1) покоя (лаг-фаза, фаза индукции) – с момента поступления антигена в организм до появления антител. Ее продолжительность может длиться от нескольких дней до месяца, в зависимости от свойств антигена, его дозы, способа введения в организм, возраста животного и др. В этот период происходит пролиферация и дифференцировка лимфоидных клеток в направлении синтеза иммуноглобулина класса М;

2) нарастания титров антител (лог-фаза, или продуктивная фаза) — от появления антител до момента достижения их максимального количества. Ее длительность — 2–15 дней. В этой фазе антитела освобождаются от плазмочитов и поступают в кровяное русло. Уменьшается количество клеток, синтезирующих IgM, начинается нарастать продукция IgG. Впоследствии появляются IgA, IgE, IgD;

3) стабилизации — уровень антител остается неизменным чаще в течение нескольких дней или недель. Ее длительность зависит от вида животного, характера антигенов и класса продуцируемых антител, так как класс Ig имеет разный период полураспада;

4) снижения продукции антител. Ее продолжительность различна и зависит от сохранения антигена в тканях. Этому способствует, например, введение антигена с адьювантом (например, с алюминием гидроксида), создающего депо, из которого АГ медленно поступает в организм, обеспечивая длительную антигенную стимуляцию. В результате снижение антител начинается спустя несколько недель или месяцев. Способность к длительному образованию антител и в высоких титрах можно поддерживать путем повторных введений антигена на протяжении длительного времени.

При повторном попадании антигена через несколько недель или месяцев динамика иммунного ответа изменяется. Латентный период и период нарастания титра антител становится короче. Титры антител достигают максимума быстрее и сохраняются на высоком уровне дольше, повышается аффинитет антител. При вторичном ответе синтезируются преимущественно антитела класса G.

Такое различие образования антитела при первичном и вторичном иммунных ответах объясняется тем, что после первичного введения антигена в иммунной системе формируется клон лимфоцитов с иммунологической памятью о данном антигене. После повторной встречи с этим же антигеном клон лимфоцитов с иммунологической памятью быстро размножается и интенсивно включает процесс антителогенеза.

Быстрое и энергичное образование антитела при повторной встрече с антигеном используется для получения высоких титров антител при производстве диагностических и лечебных сывороток от иммунизированных животных, а также для экстренного создания иммунитета при вакцинации.

11.5.2.3. Взаимодействие клеток при гуморальном иммунном ответе

Основой гуморального иммунного ответа является активация В-лимфоцитов и их дифференцировка в антителообразующие плазматические клетки — плазмочиты. В нем участвуют В-лимфоциты и Th2-хелперы. В-лимфоциты играют роль антигенпрезентирующей и антителообразующей клетки. Th2-хелперы дифференцируются из Th0-хелперов (наивных, нулевых) после распознавания комплекса антиген — МНС класса II на антигенпрезентирующих клетках (АПК, например, макрофагах). Презентация макрофагами данного комплекса Th0-хелперам включает:

- 1) поглощение антигена и его расщепление (процессинг) до антигенных пептидов;
- 2) связывание антигенных пептидов с молекулами МНС класса II, образующимися внутри клетки («загрузка» в желобки молекул МНС);
- 3) выход комплекса антиген — МНС класса II на поверхность клетки для контакта с TCR Th0-хелпера.

При презентации антигена формируется иммунный синапс — зона (место) контакта между клетками для распознавания антигена и проведения сигнала в клетку. Он включает: TCR (на Th0) + антиген — МНС класса II (на макрофаге) + корецептор CD4 (на Th0). Таким образом, TCR распознает измененное «свое», осуществляя двойное распознавание «своего» и от «чужого». При этом TCR одного лимфоцита распознают только один антиген. Th0-хелпер превращается в Th2-хелпер. После этого Th2-хелперы взаимодействуют с В-лимфоцитами. В-лимфоцит распознает антиген при помощи BCR (иммуноглобулиновый рецептор), и клетка поглощает его. После расщепления антигена до низкомолекулярного пептида (процессинга) и встраивания его в МНС класса II, В-лимфоцит представляет комплекс антиген — МНС класса II Th2-хелперу, который взаимодействует с ним при помощи TCR и корецептора CD4. Иммунный синапс включает: TCR (на Th2) + антиген — МНС класса II (на В-лимфоците) + корецептор CD4 (на Th2). Далее на поверхности Th2-хелпера появляется CD40-лиганд, который связывается с CD40-рецептором на В-лимфоците, после чего запускаются пролиферация, дифференцировка клеток в плазмочиты, синтезирующие иммуноглобулины различных классов. Пролиферация В-лимфоцитов усиливается под воздействием ИЛ-3. Интерлейкины (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13), продуцируемые Th2, участвуют в

переключении синтеза классов иммуноглобулинов. Плазмоциты синтезируют антитела одной специфичности.

Образовавшиеся антитела специфически связываются с антигенами, вызвавшими их образование: формируются комплексы антиген–антитело. Комплексы антиген–антитело разрушаются при помощи комплемента (за счет образования МАК) или поглощаются и перевариваются макрофагами (иммунный фагоцитоз).

На поверхности одного микроба может быть множество различных антигенов, поэтому обычно вырабатывается целая серия антител, каждое из которых при этом направлено на определенный антиген.

II.5.3. Клеточный иммунитет

Клеточный иммунитет осуществляется непосредственно лимфоцитами или их растворимыми продуктами, обуславливающими лизис клеток, содержащих чужеродные антигены. Это иммунитет клеток против клеток. Вирусы, бактерии, грибы, находящиеся внутри клетки, могут быть уничтожены только при помощи реакций клеточного иммунитета.

Клеточно-опосредованный иммунный ответ лежит в основе:

- 1) гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ);
- 2) резистентности к ряду возбудителей (туберкулеза, бруцеллеза, хламидиоза, риккетсиоза). Почкующиеся вирусы, переходя с клетки на клетку, избегают встречи с антителами: вирус гриппа, вирус бешенства, вирус простого герпеса, вирус болезни Марекка и др.);
- 3) резистентности к опухолям;
- 4) отторжения трансплантата;
- 5) реакции трансплантата против хозяина (при трансплантации костного мозга и лимфоидной ткани);
- 6) грибковой аллергии;
- 7) некоторых аутоиммунных болезней (например, аллергический энцефаломиелит).

Реакции клеточного иммунитета осуществляются отдельными видами и сложными кооперациями иммунокомпетентных и вспомогательных клеток. К клеткам, участвующим в клеточно-опосредованном иммунитете, относят: макрофаги, дендритные клетки, НК (естествен-

ные киллеры), $CD8^+$ $T\alpha\beta$ - лимфоциты, $CD4^+$ Т-лимфоциты субпопуляции Th1.

Основную роль играют цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ). ЦТЛ развиваются из предшественников, которые активируются комплексом антигена и молекул МНС-I, размножаются и созревают под действием ИЛ-2, а также факторов дифференцировки, продуцируемых Т-хелперами. ЦТЛ связываются с помощью рецепторов со своими мишенями, распознавая антиген на поверхности клетки, у которых есть новые поверхностные антигены (например, вирусные или опухолевые) в комплексе с молекулой МНС-I и выделяют специальные токсические субстанции (перфорин, гранзимы, гранулизин). Последние вызывают гибель клетки-мишени посредством апоптоза.

Клеточный иммунный ответ – формирование клона цитотоксических Т-лимфоцитов – ЦТЛ ($CD8$), способных разрушать клетки мишени, мембраны которых содержат чужеродные материалы (например, вирусные белки).

Антигепрезентирующие клетки – АПГ (макрофаги и дендритные клетки) поглощают антиген и после процессинга представляют собой комплексы:

1) антиген – МНС класса I и ЦТЛ; иммунный синапс включает: TCR (на ЦТЛ) + антиген – МНС класса I (на макрофаге) + корецептор $CD8$ (на ЦТЛ);

2) антиген-МНС класса II и Th0; иммунный синапс включает: TCR (на Th0) + антиген-МНС класса II (на макрофаге) + корецептор $CD4$ (на Th0) (как и при гуморальном иммунном ответе, но при этом Th0 и Th1).

Таким образом, ЦТЛ с помощью TCR и корецептора $CD8$ распознает антиген и МНС класса I (двойное распознавание), а Th0 с помощью TCR и корецептора $CD4$ распознает антиген и МНС класса II и дифференцируются в Th1. Th1 секретируют ИЛ-2, под действием которого происходит пролиферация ЦТЛ. После этого ЦТЛ «узнают» клетки-мишени, инфицированные внутриклеточными микробами (например, вирусами). На клетках-мишенях выставляются микробные антигены в комплексе с МНС класса I, распознаваемые TCR и корецептором $CD8$. Активированные и дифференцированные ЦТЛ вызывают гибель клеток-мишеней с помощью выделяемых ими цитотоксических белков: перфорины, гранулизины, гранзимы, которые, встраиваясь в мембрану клетки-мишени, образуют поры, способствующие проникновению гранзимов, которые запускают апоптоз клетки-мишени.

Цитотоксические Т-лимфоциты могут использовать также другой механизм контактного киллинга — *Fas-зависимый цитолиз*, причем в большей степени, чем естественные киллеры. Его суть состоит в передаче летального сигнала без экзоцитоза гранул — путем прямого контактного взаимодействия клеток, реализуемого через специализированные рецепторы и лиганды. При этом включается рецепторный механизм индукции апоптоза.

Реализация апоптотического механизма цитолиза клетки-мишени при действии цитотоксических Т-лимфоцитов происходит с участием Fas-лиганда, экспрессируемого Т-клеткой, и Fas-рецептора клетки-мишени. Наличие этого рецептора на поверхности клетки-мишени служит условием реализации данного механизма апоптоза. Fas-рецептор, относимый к активационным молекулам, присутствует на поверхности многих клеток человека и млекопитающих. Его экспрессии способствуют инфицирование вирусом и опухолевая трансформация. Реже апоптоз клеток-мишеней вызывает TNF α при условии его распознавания рецептором типа I — TNFR1 (p55). Этот вариант апоптоза больше характерен для CD4⁺ Т-клеток, в определенных обстоятельствах способных индуцировать программированную гибель клеток.

Разновидностью клеточного иммунного ответа является гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) с участием Th1-хелперов и активированных макрофагов. Наибольшую роль в активации макрофагов и NK-клеток выполняет γ -интерферон, выделяемый Th1. Активированные макрофаги производят эффективную деструкцию антигена.

11.5.4. Феномен иммунного фагоцитоза

Феномен иммунного фагоцитоза основан на поглощении фагоцитами антигенов, входящих в состав иммунных комплексов. При этом антигенами могут быть как отдельные молекулы или их агрегаты, так и цельные клетки или их обломки. Для осуществления иммунного фагоцитоза необходимо участие молекул иммуноглобулинов и/или комплемента, а также рецепторов к Fc-участку молекулы иммуноглобулина и компонентам комплемента на клеточной мембране фагоцитирующей клетки. Рецепторы обеспечивают узнавание и захват фагоцитом иммунных комплексов или опсонизированных антигенов, которые потом эндоцитируются. Таким образом, фагоциты участвуют в элиминации (удалении) антигенов из организма и восстановлении его гомеостаза.

11.5.5. Иммунологическая память

Под *иммунологической памятью* понимают способность организма давать ускоренную иммунологическую реакцию на повторное введение антигена. В процессе развития в организме продуктивного иммунного ответа часть антигенреактивных Т- или В-лимфоцитов дифференцируется в малые покоящиеся клетки, или клетки иммунологической памяти. Эти клетки различаются высокой специфичностью к конкретной антигенной детерминанте и большой продолжительностью жизни (до 10 лет и более). Они активно рециркулируют в организме, распределяясь в тканях и органах, но постоянно возвращаются в места своего происхождения за счет хоминговых рецепторов. Это обеспечивает постоянную готовность иммунной системы реагировать на повторный контакт антигеном по вторичному типу. При повторном введении антигена в организм клетки памяти обуславливают вторичный иммунный ответ. Основа вторичного ответа та же, что и первичного, однако образование антител при нем происходит быстрее и более интенсивно, синтезируется преимущественно IgG, аффинитет антител выше, чем при первичном иммунном ответе.

До сих пор неизвестно, какие именно молекулы и взаимодействия и на каком точно этапе иммуногенеза определяют формирование популяции лимфоцитов памяти. В то же время установлены отличия лимфоцитов памяти от других субпопуляций тех же лимфоцитов.

В-лимфоциты памяти отличаются от плазматических клеток (терминальной стадии дифференцировки В-лимфоцитов) по ряду признаков. В-лимфоциты памяти несут поверхностные иммуноглобулины, экспрессируют молекулы МНС класса II; способны к пролиферации, переключению изотипов иммуноглобулинов, гипермутированию гипервариабельных участков молекулы иммуноглобулина CDR (*Complementarity Determining Region*), расположенных в V-домене, но не способны к интенсивному образованию иммуноглобулинов. В-лимфоциты памяти находятся в покоящемся (неактивированном) состоянии.

Плазматические клетки, напротив, способны к интенсивному синтезу/секреции иммуноглобулинов, но не несут поверхностных иммуноглобулинов, не экспрессируют молекулы МНС класса II; не способны к пролиферации, переключению между изотипами иммуноглобулинов, гипермутированию CDR V-доменов иммуноглобулинов.

Т-лимфоциты памяти отличаются от зрелых Т-клеток и по частоте встречаемости антигенспецифических клонов в лимфоидной ткани, и по экспрессии ряда мембранных молекул (LFA-3 (CD58); CD2; LFA-1 (CD11a/CD18); CD44; CD45RO) более чем в 10–100 раз. В отличие от наивных лимфоцитов, Т-клетки памяти испытывают существенно меньшую потребность в медиаторах воспаления и в ко-стимулирующих сигналах для запуска иммунного ответа на специфический антиген и могут отвечать при минимальных симптомах воспаления или даже при их отсутствии. В то же время наивные Т-клетки, в отличие от Т-лимфоцитов памяти, экспрессируют на поверхности CD45RA и большие количества молекул L-селектина, обеспечивающие хоминг Т-лимфоцитов в лимфатические узлы.

II.5.6. Иммунологическая толерантность

Иммунологическая толерантность — явление, противоположное иммунному ответу и иммунологической памяти. Оно проявляется в том, что на повторное введение антигена вместо выработки иммунитета организм проявляет ареактивность, инертность, неотвечаемость на антиген, т. е. толерантен к антигену. Явление иммунологической толерантности было открыто в 1953 г. английским ученым П. Медваром на мышах. Оказалось, что если эмбрионам белых мышей ввести клетки селезенки других линий мышей (черных), то взрослые особи, выросшие на этих эмбрионах, не отторгали трансплантаты кожи черных мышей, т. е. становились к ним толерантными. Аналогичные опыты провел чешский ученый М. Гашек на разных породах кур. В результате экспериментов оказалось, что врожденная толерантность к антигену (толерогену) возникает, когда происходит внутриутробный контакт организма с этим антигеном. В таком случае организм после рождения будет воспринимать данный антиген как «свое». Такая толерантность объясняется тем, что в эмбриогенезе происходит гибель клонов — предшественников Т-лимфоцитов, способных взаимодействовать с толерогеном.

Кроме врожденной, существует и приобретенная толерантность. Чаще всего это обратимый процесс. Приобретенная толерантность бывает двух видов: высоко- и низкодозовая. Высокодозовая толерантность возникает при попадании в организм больших доз толерогена, особенно введенного на фоне подавления иммунитета (облучение, применение иммунодепрессантов). Такое большое количество анти-

гноз вызывает гибель реактивных к нему лимфоцитов. Низкодозовая толерантность возникает при введении малых доз определенных антигенов. Считается, что в данном случае она опосредована активацией клеток-супрессоров, подавляющих иммунную реакцию. В целом же оба механизма поддержания толерантности (деления клонов и их супрессия) рассматриваются как взаимодополняющие.

11.5.7. Идиотип-антиидиотипическое взаимодействие

Идиотип-антиидиотипическое взаимодействие лежит в основе теории иммунной системы, предложенной Н. К. Эрне (1974) как механизма регуляции функционирования иммунной системы. Сущность его заключается в следующем: к одному и тому же антигену антитела синтезируются различными клонами лимфоцитов. Такие антитела (или что равнозначно, Т-клеточные рецепторы) будут несколько отличаться по строению друг от друга. В активном центре таких антител или рецепторов находятся уникальные антигенные детерминанты, присущие только данному клону лимфоцитов и отличающие его от любых других. Они получили название идиотопов. Сам антигенсвязывающий участок антитела был назван паратопом. Совокупность всех идиотипов данного антитела называется идиотипом. Отражением структурного разнообразия антигенсвязывающего участка иммуноглобулинов-антител и является их идиотипическое разнообразие. При разворачивании иммунного ответа первоначально синтезируются антитела первого поколения, направленные к данному антигену. Они получили название идиотипических антител (несущих идиотип). К их активным центрам в свою очередь впоследствии вырабатываются антитела второго поколения — антиидиотипические. Они блокируют синтез идиотипических антител. Так осуществляется естественное заглушение иммунного ответа, снижающее вероятность развития аутоиммунных процессов.

11.5.8. Аллергия

Аллергия (от гр. *allos* — другой, *ergon* — действие) — означает повышенную и качественно измененную реактивность организма или чувствительность его к различным веществам белковой и небелковой природы, возникающую чаще всего при их повторных воздействиях на организм.

Впервые феномен аллергии был открыт Т. Смитом в 1904 г. Он определял активность антитоксической лошадиной противодифтерийной сыворотки на морских свинках, которую вводил животным внутривенно. Для опыта потребовалось много морских свинок, и ученый решил использовать те из них, которым за несколько недель до этого уже вводилась сыворотка. Т. Смит ввел им внутривенно сыворотку, и через минуту животные начали беспокойно бегать по клетке, садиться на задние лапки, чесать нос, им явно не хватало воздуха, появились чиханье, лающий кашель, а через 2–3 мин наступила их гибель.

В 1905 г. в журнале «Русский врач» были опубликованы наблюдения Г. П. Сахарова, который описал сывороточную болезнь у морских свинок. Еще год спустя появилось исследование этого явления, проведенное Р. Отто, учеником П. Эрлиха.

Понятие «аллергия» впервые ввел французский ученый К. Пирке (1906), который аллергию понимал как измененную чувствительность организма к чужеродному веществу при повторном контакте с этим веществом. Вещества, изменяющие реактивность организма, по предложению К. Пирке были названы аллергенами. Было установлено, что аллергены обладают свойствами антигенов (макромолекулярность, белковая природа, иммуногенность и т. д.). Впоследствии было выяснено, что аллергию могут вызывать вещества, не обладающие свойствами антигенов, т. е. многие микромолекулярные соединения, простые химические вещества, лекарственные препараты.

В процессе развития аллергологии было установлено, что аллергенами могут быть вещества растительного и животного происхождения, фармацевтической, химической, биологической, пищевой промышленности.

Количество аллергенов огромно, они разнообразны, что затрудняет их классификацию. В первую очередь аллергены подразделяют на экзо- и эндоаллергены.

Экзоаллергены проникают в организм из внешней среды. *Эндоаллергены* возникают в самом организме в виде аутоаллергенов. Белки крови и тканей при разных патологических процессах приобретают аллергенные свойства. Например, при ожогах, дистрофии, опухолевом росте. Экзоаллергены в свою очередь подразделяют на инфекционные и неинфекционные. К инфекционным относят бактерии, вирусы, микроскопические грибы, гельминтов, а также их токсины, к неинфекционным аллергенам – бытовые, растительного и животного происхождения, фармацевтической, химической, биологической и пищевой промышленности.

К бытовым аллергенам принадлежат пылевые частички одежды, ковровых изделий, постельного белья, книг, извести; частички обитающих в жилых помещениях насекомых, их экскременты, плесневые и другие микроскопические грибы, их споры, различные непатогенные микроорганизмы.

К растительным аллергенам причисляют пыльцу цветов, деревьев, кустарников (ольха, береза, вяз, клен, орешник), пыльцу луговых трав (тимофеевка, овсяница, мятлик), пыльцу сорных растений (лебеда, полынь, одуванчик).

К аллергенам животного происхождения относят хитиновый покров насекомых (бабочек, клопов, блох, вшей, тараканов). Сильными аллергенами являются шерсть животных, перья птиц, пух, яд пчел, ос, шершней и др.

Аллергены фармацевтической промышленности – антибиотики, сульфаниламиды, йодиды, салицилаты, инсулин, атропин, морфин, апрофан, барбитураты и др.

Аллергенами биологической промышленности являются многочисленные биопрепараты: вакцины, гипериммунные сыворотки, иммуноглобулины, анатоксины, гормоны.

К аллергенам химической промышленности принадлежат косметические и моющие средства: лосьоны, кремы, лаки, присыпки, туалетная вода, краска для волос, румяна, губная помада, краски и лаки для ногтей, стиральные порошки.

Причиной аллергий могут быть пищевые продукты и изделия пищевой промышленности: яйцо, мед, земляника, клубника, молоко, сыр, шоколад, торт, конфеты и т. д. У собак и кошек описана кормовая аллергия на рыбу и молоко.

Аллергия проявляется нарушением деятельности различных органов и систем:

функций кровообращения (повышается проницаемость кровеносных сосудов, наблюдаются кровоизлияния, застойные явления, изменяется кровяное давление); пищеварения (рвота, понос, снижение ферментативной активности); дыхания (резкое учащение, чиханье, кашель, замедление дыхания);

повышается температура тела, наблюдаются отеки, припухание суставов, их болезненность;

изменяется картина крови (число лейкоцитов, замедляется свертываемость крови, снижается фагоцитарная активность).

Чувствительность к аллергенам у всех животных разная. Наиболее ярко проявляется она у морских свинок. Затем по степени чув-

твительности к аллергенам животные располагаются в следующем порядке: кролики, овцы, козы, крупный рогатый скот, лошади, собаки, свиньи, птицы, обезьяны. У животных клиническая картина аллергии зависит не только от вида животного, но и от вида аллергена. У человека на один и тот же аллерген, в зависимости от особенностей организма, самая различная реакция: сыпи, отечность, головная боль, боль в суставах, насморк, признаки удушья, бронхиальная астма.

Классификация аллергий. Классифицируют аллергии по: скорости возникновения, виду аллергенов, характеру сенсибилизации, степени нарушений, возникающих в организме, в зависимости от вовлечения тех или иных механизмов.

В зависимости от скорости проявления и интенсивности клинических признаков аллергии подразделяют на две группы:

гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ) или повышенная чувствительность немедленного типа (ПЧНТ);

гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) или повышенная чувствительность замедленного типа (ПЧЗТ).

В зависимости от вида аллергена аллергии классифицируют следующим образом: сывороточные, инфекционные, пищевые, растительные, животного происхождения, лекарственные, бытовые, аутоаллергии.

Сывороточные аллергии – аллергии, возникающие на введение животным сывороточных препаратов. Например, противорожистой, противосальмонеллезной, противолептоспирозной и других лечебно-профилактических сывороток.

Инфекционные аллергии – это аллергии, возникающие под воздействием возбудителей инфекционных болезней (бактерий, вирусов, грибов), а также паразитарных болезней (простейших, гельминтов и др.).

Пищевые аллергии – аллергии, связанные с употреблением пищевых продуктов у людей и приемом корма у животных (кормовые). У людей часто регистрируют аллергии к меду, клубнике, землянике и т. п., а у животных (собак, кошек) – к молоку, рыбе, мясу.

Аллергии животного происхождения – это аллергии, возникающие под воздействием на организм аллергенов животного происхождения (шерсть, пух, перья, яд пчел, ос, змей, чешуя рыб и др.).

Аутоаллергии – аллергии, возникающие в результате воздействия на организм аутоаллергенов, которые образуются из собственных тканей организма при различных патологических процессах.

По характеру сенсибилизации различают специфическую и неспецифическую аллергии. Специфическая аллергия — такая аллергия, когда извращается чувствительность к тем аллергенам, какими организм сенсибилизирован, т. е. налицо строгая специфичность. Неспецифической аллергия называется тогда, когда организм сенсибилизирован одним антигеном, а реакция может быть к другому аллергену. Различают два вида неспецифической аллергии: гетеро- и парааллергию. Гетероаллергия характеризуется тем, что организм сенсибилизирован аллергенами неантигенного происхождения, а чувствительность извращается к аллергену антигенного происхождения. Парааллергия характеризуется тем, что организм сенсибилизирован одним белковым веществом, а чувствительность изменяется к другому белковому веществу. Например, вирус гриппа повышает чувствительность к туберкулезной палочке.

По степени нарушений, возникающих в организме, различают общую и местную аллергию. Общая — это такая аллергия, когда нарушается функциональная деятельность всех органов и систем, т. е. общее состояние организма. При местной аллергии аллергические изменения возникают только на месте введения аллергена. При этом на месте введения аллергена могут возникнуть воспаление, изъязвление, образование гноя. Местные аллергические реакции используют для диагностики туберкулеза, сапа, бруцеллеза и других болезней. Биологическая промышленность готовит для диагностики инфекционных болезней специфические диагностические аллергены.

Изучение молекулярно-генетических механизмов аллергии привело к созданию П. Желлом и Р. Кумбсом в 1968 г. новой классификации аллергий в зависимости от вовлечения в развитие аллергии тех или иных механизмов. В соответствии с их классификацией различают четыре основных типа аллергий:

- 1 — анафилактический;
- 2 — цитотоксический;
- 3 — иммунокомплексный;
- 4 — клеточно-опосредованный.

Реакции первых трех типов опосредуются антителами, их относят к ГНТ; реакции четвертого типа — преимущественно Т-клетками и макрофагами, их относят к ГЗТ, поэтому необходимо подробно рассмотреть сущность ГНТ и ГЗТ.

11.5.8.1. Гиперчувствительность немедленного типа

Гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ) впервые описана в 1902–1905 гг. французскими исследователями Ш. Рише и Ж. Портъс и русским ученым Г. П. Сахаровым. К ГНТ отнесены аллергические реакции, проявляющиеся через 20–30 мин после повторной встречи с антигеном и связаны с выработкой антител. ГНТ проявляется чаще всего в форме:

- анафилаксии;
- атопии;
- сывороточной болезни.

Анафилаксия (от гр. *ana* — против, *phylaxia* — защита) — представляет собой реакцию немедленного типа, возникающую при парентеральном повторном введении аллергена в организм. Анафилаксией называют экспериментально индуцированную аллергию. Для получения экспериментальной аллергии аллерген должен вводиться 2 раза. Первое введение называют сенсibilизирующим (сенсibilизацией). Сенсibilизировать организм можно очень малой дозой аллергена — 0,0001 г. Аллерген вводят парентерально, т. е. минуя желудочно-кишечный тракт. Состояние повышенной чувствительности наступает через 8–21 день. Сенсibilизированный организм внешне ничем не отличается от нормального. Вторую дозу антигена, от введения которой развивается анафилаксия, называют разрешающей.

Клиническая картина анафилаксии у животных разных видов проявляется по-разному. В основном анафилаксия характеризуется одышкой, непроизвольным моче- и калоотделением, клоническими и тоническими судорогами. Гибель животных обычно наступает от удушья.

Для анафилаксии характерна специфичность, немедленность, обусловленность реакции антителами.

Состояние сенсibilизации после встречи с аллергеном может сохраняться месяцами и даже годами. Утрата организмом состояния сенсibilизации называется десенсibilизацией или антианафилаксией. Феномен десенсibilизации обнаружил А. М. Безредка в 1907 г. Он предложил специфический, простой и весьма эффективный метод десенсibilизации. Сущность способа заключается в том, что животному, человеку, получившему ранее какой-либо препарат (вакцину, сыворотку, антибиотик) при повторном введении его вначале инъецируют небольшую дозу (0,01–0,1 см³), а затем спустя 2–3 ч — основную дозу препарата.

Анафилаксию можно предупредить неспецифическими средствами: введением препарата под эфирным наркозом, а также действием

хлоралгидрата, алкоголя. Десенсибилизирующими свойствами обладают димедрол, супрастин, атропин, уретан, новокаин и другие антигистаминные препараты.

Атопия (от гр. *atopia* – странность, необычность) – аллергическая реакция, спонтанно возникающая у людей и животных. К атопическим болезням относят бронхиальную астму, аллергический насморк, дерматиты, конъюнктивиты, крапивницу, пищевые и лекарственные аллергии. Атопические болезни носят, как правило, местный характер. В зависимости от того, где локализуется комплекс аллерген-антитело, происходит развитие определенной формы аллергической реакции. Если встреча аллергена с антителом произошла в коже, появляется крапивница, в верхних дыхательных путях возникает аллергический насморк, в слизистой оболочке глаза – конъюнктивит, в слизистой бронхов – бронхиальная астма.

Считается, что существенное значение для возникновения атопий имеет наследственность. Так, у 50 % больных людей в анамнезе отмечается аналогичная болезнь у родителей. Ученые полагают, что не менее 10 % населения нашей планеты страдают атопиями.

Атопические болезни у животных изучены мало. Описана сенная лихорадка у крупного рогатого скота при переходе на новое пастбище, при поедании корма в стойловый период со спорами грибов, которая проявляется одышкой вследствие развития бронхита.

Сывороточная болезнь – это своеобразная форма аллергии, возникающая через 8–10 сут после введения сыворотки. Клинически сывороточная болезнь проявляется повышением температуры, нарушением сердечной деятельности, увеличением лимфоузлов, появлением сыпи, зудом, болью в суставах. Болезнь протекает без смертельных исходов и через несколько дней заканчивается выздоровлением. В ветеринарной практике сывороточная болезнь предупреждается применением антигистаминных препаратов или же прогреванием сывороток перед их введением при 56 °С в течение часа.

Лечение сывороточной болезни проводят димедролом, дипразином и другими антигистаминными препаратами.

11.5.8.2. Гиперчувствительность замедленного типа

Гиперчувствительность замедленного типа – это такая форма повышенной чувствительности к аллергенам, когда ответ на него наступает через несколько часов или дней после введения аллергена.

Впервые этот тип аллергии был описан в 1890 г. Р. Кохом у больных туберкулезом при подкожном введении им туберкулина.

Различают инфекционную и контактную аллергию, аллергические реакции при трансплантации. Однако для ветеринарной практики наибольший интерес представляют аллергические реакции при диагностике ряда инфекционных болезней методом кожных проб со специфическими аллергенами. Метод аллергической диагностики используют при сапе, туберкулезе, бруцеллезе, туляремии и других болезнях. Аллергические реакции осуществляют путем внутрикожного или подкожного введения аллергенов. Протекают они в виде местного воспаления: образование припухлости, увеличение складки кожи, покраснение кожи, ее болезненность в месте введения аллергена. Аллергические реакции отличаются высокой специфичностью.

Необходимо заметить, что в некоторых случаях отмечается отсутствие аллергической реакции у больного (сенсibilизированного) животного, что получило название анергии (ареактивности). Анергия может быть положительной и отрицательной. Положительная анергия отмечается, когда иммунобиологические процессы в организме активированы и контакт с аллергеном быстро приводит к его элиминации из организма без развития воспалительной реакции. Отрицательная анергия обуславливается ареактивностью клеток организма и возникает, когда защитные механизмы подавлены, что свидетельствует о беззащитности организма.

II.5.8.3. Механизмы развития гиперчувствительности немедленного и замедленного типов

Развитие гиперчувствительности немедленного и замедленного типов характеризуется стадийностью:

I — иммунологическая — охватывает все изменения в иммунной системе, возникающие с момента поступления аллергена в организм, образование антител и сенсibilизированных лимфоцитов и их соединение с повторно поступившим или существующим в организме аллергеном;

II — патохимическая — образуются биологически активные медиаторы. Медиаторы возникают при соединении аллергена с антителами или сенсibilизированными лимфоцитами в конце иммунологической стадии;

III – патофизиологическая или стадия клинических проявлений – характеризуется тем, что образовавшиеся медиаторы оказывают патогенное действие на клетки, органы и ткани организма.

По характеру механизмов, которые участвуют в развитии аллергии, выделяют несколько типов.

Первый тип (I) – атопический, анафилактический, или реактивный – обусловлен антителами класса IgE. Отличительной чертой антител этого класса является их ярко выраженная цитофильность по отношению к базофилам и производным от них тучным клеткам. Они закрепляются на мембране этих клеток за счет взаимодействия с рецепторами FcεRI и FcεRII таким образом, что сохраняют способность связывать антиген (иммунологическая стадия). При взаимодействии аллергена с IgE происходит активация этих клеток и высвобождение депонированных и вновь образованных медиаторов аллергии (гистамин, аденозин, серотонин, лейкотриены, простагландины, некоторые цитокины, медиаторы хемотаксиса, включающие эозинофильный хемотаксический фактор и нейтрофильный хемотаксический фактор – патахимическая стадия) с последующим развитием аллергической реакции. Выбрасываемые тучными клетками медиаторы воспаления (прежде всего гистамин) и вызывают симптомы той или иной формы аллергии (патофизиологическая стадия). Примеры таких реакций – анафилактический шок, отек Квинке, поллиноз, бронхиальная астма, пищевая аллергия, крапивница, сенная лихорадка, аллергический ринит, атопический дерматит).

Второй тип (II) – цитотоксический. При этом типе аллергенами становятся собственные клетки организма, мембрана которых приобрела свойства аутоаллергенов. Это происходит в основном при их повреждении в результате воздействия лекарств, ферментов бактерий или вирусов, вследствие чего клетки изменяются и воспринимаются иммунной системой как антигены. В любом случае для возникновения данного типа аллергии антигенные структуры должны приобрести свойства аутоантигенов. Цитотоксический тип обусловлен IgG или IgM, которые направлены против антигена, расположенных на эндоизмененных клетках собственных тканей организма. Связывание антитела с антигеном на поверхности клетки приводит к активации комплемента, который вызывает повреждение и разрушение клеток, последующий фагоцитоз и их удаление. В процесс, кроме того, вовлекаются лейкоциты и цитотоксические Т-лимфоциты. Связываясь с IgG, они участвуют в формировании антителозависимой клеточной

цитотоксичности. Именно по цитотоксическому типу происходит развитие аутоиммунной гемолитической анемии, лекарственной аллергии, аутоиммунного тиреозита, агранулоцитоза, тромбоцитопении.

Третий тип (III) — иммунокомплексный, при котором ткани организма повреждаются циркулирующими иммунными комплексами с участием IgG или IgM. В отличие от типа II при аллергической реакции типа III антитела взаимодействуют с растворимыми антигенами, а не с находящимися на поверхности клеток. Образовавшиеся иммунные комплексы длительно циркулируют в организме и фиксируются в капиллярах различных тканей, где активируют систему комплемента, вызывая приток лейкоцитов, высвобождение гистамина, серотонина, лизосомальных ферментов, повреждающих эндотелий сосудов и ткани, в которых фиксирован иммунный комплекс. Этот тип реакций является основным при сывороточной болезни, лекарственной и пищевой аллергии, при некоторых аутоаллергических болезнях (СКВ, ревматоидный артрит и др.).

Четвертый (IV) тип реакций — гиперчувствительность замедленного типа или клеточно-опосредованная гиперчувствительность. Реакции замедленного типа развиваются в сенсибилизированном организме через 24—48 ч после контакта с аллергеном. Основную роль в таких реакциях играют Т-хелперы подтипа 1, которые появляются в ходе ответов на тимусзависимые антигены. Ранее такие клетки считались особой группой, обозначались как $T_{ГЗТ}$ и не относились к группе хелперов. Сейчас считается доказанным, что эти $CD4^+$ -клетки являются результатом активации $Th0$ антигенпредставляющими клетками в лимфоузлах. Фактически сенсибилизация организма при ГЗТ заключается в формировании в нем клонов таких $Th1$. Именно они при повторных попаданиях этого же антигена перемещаются в места его локализации и, выделяя цитокины, активируют местные макрофаги, одновременно привлекая сюда новых, которые также активируются. Активированные макрофаги и уничтожают измененные чужеродным антигеном клетки, т. е. выступают в качестве эффекторов защитного ответа. Таким образом, $T_{ГЗТ}$ действительно являются хелперами, регуляторами гиперчувствительности замедленного типа, только помощь они оказывают не В-лимфоцитам, как $Th2$, а макрофагам.

Клеточный тип реакции лежит в основе развития вирусных и бактериальных инфекций (контактный дерматит, туберкулез, микозы, сифилис, лепра, бруцеллез), некоторых форм инфекционно-аллергической бронхиальной астмы, реакций отторжения трансплантата

и противоопухолевого иммунитета, некоторых форм лекарственной аллергии, ревматоидного артрита, гранулем при шистосоматозе. В большинстве случаев развивающиеся по такому механизму иммунные ответы на чужеродные антигены не приводят к серьезным повреждениям собственных органов и тканей, в силу чего их трудно отнести к гиперчувствительности. Лишь при некоторых болезнях защитная реакция может действительно стать причиной патологии, в частности при лепре или туберкулезе. Считается, что часть поражений кожи или легких при таких болезнях возникают как результат уничтожения макрофагами пораженных возбудителем клеток.

11.5.9. Особенности противои инфекционного иммунитета

Особенности иммунитета при бактериальных инфекциях. Патогенные микроорганизмы, размножающиеся в макроорганизме внеклеточно, как правило, обуславливают гуморальный иммунитет. При этом вначале появляются антитела, относящиеся к IgM, а спустя несколько дней — IgG и IgA. Антитела связываются с бактериальной клеткой и в присутствии комплемента вызывают цитотоксическую реакцию, т. е. бактериолиз. Кроме того, антитела нейтрализуют токсины, вырабатываемые бактериями, а также опсонизируют бактерии и тем самым способствуют усилению фагоцитарной активности.

Важно отметить, что при остром течении инфекционного процесса выработка антител в организме запаздывает, в результате чего наступает гибель животного. Вот почему так важно при таких инфекционных болезнях как можно раньше ввести животному специфическую иммунную сыворотку (рожа свиней, столбняк и др.).

В случае если патогенные микроорганизмы при попадании в организм размножаются внутриклеточно, то, как правило, они уничтожаются реакциями клеточного иммунитета (Т-киллерами, активизированными макрофагами). Клеточный иммунитет имеет особое значение, когда наблюдается незавершенный фагоцитоз бактерий. В таком случае возникает необходимость уничтожения фагоцитов, в которых находятся микробы. Уничтожают зараженные фагоциты активизированные Т-киллеры. Одновременно они выделяют лимфокины, которые активизируют в очаге воспаления макрофаги, уничтожающие микробы.

При некоторых болезнях, обусловленных бактериями (туберкулез, бруцеллез и др.), микроскопическими грибами (микроспория, три-

хофития и др.), формируется преимущественно клеточный иммунитет, что подтверждается развитием ГЗТ, где главную роль выполняют Т-хелперы подтипа I (Th1) и лимфокины. Такие болезни характеризуются длительным хроническим течением с периодическими обострениями, без склонности к самопроизвольному излечению.

Особенности иммунитета при вирусных инфекциях. Иммунитет при вирусных инфекциях обеспечивается антителами и сенсibilизированными Т-лимфоцитами. Вирусы, распространяющиеся гематогенно, могут быть обезврежены и удалены механизмами гуморального иммунитета. К группе защитных антител принадлежат только вируснейтрализующие антитела, подавляющие способность вирусов к репродукции благодаря блокированию первых этапов взаимодействия с чувствительными клетками (адсорбция и проникновение). Эти антитела нейтрализуют и токсические свойства вирусов. Стабильность комплекса вирус–антитело зависит от различий чувствительности вируса к антителам, их avidности, температуры и времени контакта и др.

Часто соединение вируса с антителами носит обратимый характер, т. е. вирус после контакта с антителом сохраняет свои биологические свойства. Антитела не оказывают влияния на вирус, находящийся внутри зараженной клетки. В этом случае на вирусы, находящиеся в зараженной клетке, образуются цитотоксические Т-лимфоциты, способные лизировать только клетки, зараженные вирусом. Следовательно, из-за внутриклеточного размножения вирусов особая роль принадлежит клеточному иммунитету. На роль механизмов клеточного иммунитета в защите от вирусных инфекций указывает и тот факт, что при большинстве вирусных инфекций возникает ГЗТ. Кроме сенсibilизированных Т-лимфоцитов при внедрении вируса в клетку включаются цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ) и НК-клетки, особенно при вирусных болезнях, отличающихся коротким инкубационным периодом (грипп, парагрипп).

Существуют вирусы, которые, несмотря на иммунный ответ, пожизненно персистируют в организме хозяина (вирус ИНАН, простого герпеса и др.). Они могут интегрироваться в геном клетки хозяина без проявления клинических симптомов.



12.1. Понятие об иммунодиагностике

Иммунодиагностика — это диагностика инфекционных болезней животных и человека с помощью иммунологических методов исследования.

В основе этих методов лежат лабораторные иммунологические реакции, т. е. реакции между антигенами и антителами или между антигенами и сенсibilизированными лимфоцитами.

Реакции между антигенами и антителами называют серологическими, а между антигенами и сенсibilизированными лимфоцитами — клеточными.

Иммунодиагностика может быть осуществлена *in vivo* непосредственно на животных — это аллергическая диагностика. При аллергической диагностике животному вводят внутрикожно — в кожу шеи, уха, хвоста — или наносят на слизистую глаза специфический аллерген (например, туберкулин — при исследовании на туберкулез, маллеин — при исследовании на сальмонеллез) и через определенное время учитывают реакцию со стороны кожи или слизистой оболочки глаза, по которой судят о наличии или отсутствии болезни.

Ценность аллергической диагностики заключается в простоте выполнения диагностических манипуляций, ее высокой специфичности, возможности прижизненной постановки диагноза и способности выявить больных при отсутствии клинических признаков.

Серологическую диагностику осуществляют путем постановки серологических реакций (*in vitro*) с помощью различных диагностикумов (специфических диагностических сывороток, антигенов, комплемента, гемолитической сыворотки), изготавливаемых биологической промышленностью.

Большинство серологических реакций, применяемых для диагностики инфекционных болезней бактериальной природы, просты в техническом исполнении, не требуют сложного оборудования, приборов и компонентов, высокочувствительны, демонстративны, специфичны, позволяют поставить диагноз в течение непродолжительного времени (от нескольких часов до 2–3 сут). Серологические реакции широко применяют для экспресс-диагностики многих инфекционных болезней животных и человека. Из сказанного следует, что иммунодиагностику можно проводить как *in vivo*, так и *in vitro*.

12.2. Понятие об иммунном статусе и критерии его оценки

Иммунный статус – это структурное и функциональное состояние иммунной системы индивида, определяемое комплексом клинических и лабораторных иммунологических показателей.

Иммунный статус (иммунный профиль, иммунореактивность) характеризует способность организма конкретного индивидуума (особи) к иммунному ответу на определенный антиген в данный момент времени.

Наличие у животных и людей иммунной системы автоматически подразумевает способность к иммунному ответу, но его сила и форма у разных особей могут варьировать в широких пределах.

Работа иммунной системы может нарушаться под влиянием различных воздействий (инфекций, излучений, лекарственных препаратов, климатических условий и т. д.), а также в результате врожденных генетических дефектов анатомического и функционального характера. Нарушения иммунного статуса, неполноценное функционирование иммунной системы называют иммунодефицитами. Иммунодефициты подразделяют на врожденные (первичные) и приобретенные (вторичные).

Врожденные иммунодефициты встречаются редко. Их причинами могут быть удвоение хромосом, мутации, нарушение обмена нуклеиновых кислот, повреждение генома и т. д. Приобретенные иммунодефициты могут возникать после перенесенных инфекций, инвазий, при тяжелых травмах, облучении, обширных хирургических операциях, нарушении условий содержания и кормления животных, нерациональном применении антибиотиков, специфических средств профилактики инфекционных болезней и т. п.

Оценку иммунного статуса проводят на основании данных общего клинического обследования, большого количества лабораторных тес-

тов, которые сложны, требуют дорогостоящих реагентов, лабораторного оборудования, высокой квалификации специалистов, поэтому по рекомендации академика Р. В. Петрова все тесты разделены на два уровня.

К тестам уровня I относят показатели состояния иммунной системы, которые могут быть определены в большинстве лабораторий медицинского и ветеринарного профиля. К ним относятся:

определение количества и морфологии лимфоцитов в периферической крови;

определение количества Т- и В-лимфоцитов;

определение сывороточных иммуноглобулинов;

установление фагоцитарной активности лейкоцитов;

кожные тесты;

рентгеноскопия, рентгенография внутренних органов.

К тестам уровня II относят:

гистохимический анализ лимфоидных органов;

определение цитотоксичности;

выявление гормонов тимуса;

установление синтеза и секреции цитотоксинов и т. д.

12.3. Серологические реакции

Серологическими называют такие реакции, для постановки которых используют сыворотку (от лат. *serum* – сыворотка), содержащую антитела. В их основе лежит специфическое взаимодействие антител с антигенами. Эти реакции называют еще гуморальными (от лат. *humor* – жидкость).

Известно очень большое количество серологических реакций и их модификаций. Они представляют собой лабораторные иммунологические тесты, которые различаются по технике постановки и регистрируемому эффекту, однако все они основаны на взаимодействии антигенов с антителами и применяются для их выявления.

В микробиологической практике нашли широкое применение реакции агглютинации, преципитации, нейтрализации, реакции с участием комплемента, с использованием меченых антител и др.

Реакция взаимодействия антигена с антителом протекает в две фазы: первая – специфическая, вторая – неспецифическая. В специфической фазе происходит специфическое связывание активного центра антитела (паратоп) с соответствующей детерминантой антигена (эпитопом). Связывающие детерминанты антигена с активным

центром Fab-фрагмента антитела обусловлено ван-дер-ваальсовыми силами, водородными связями и гидрофобным взаимодействием. Прочность и количество связывающегося антигена с антителами зависит от аффинности, avidности антител и их валентности.

Аффинность — это сила специфического взаимодействия антитела с антигеном. Аффинность зависит от степени пространственного соответствия (комплементарности) структуры антигенсвязывающего центра антитела и антигенной детерминанты, чем выше их комплементарность, т. е. чем больше они подходят друг другу, тем больше образуется межмолекулярных связей и тем выше устойчивость образовавшегося комплекса антиген + антитело.

Под термином avidность понимают прочность связывания антитела и антигена. Avidность антител зависит от аффинности и количества антигенсвязывающих центров. При равной аффинности наибольшей avidностью обладают антитела класса М, так как они имеют 10 антигенсвязывающих центров.

Особенности строения антигена также влияют на прочность его взаимодействия с антителом. Большое значение имеют стерическая (пространственная) доступность антигенной детерминанты для антигенсвязывающего центра молекулы иммуноглобулина и количество эпитопов в составе молекулы антигена.

Специфическая фаза серологических реакций протекает быстро. Затем наступает неспецифическая фаза, которая развивается медленнее и может визуально проявляться образованием хлопьев, осадка (феномен агглютинации) или помутнения (феномен преципитации).

Эффективность взаимодействия антигена с антителом зависит от условий, в которых происходит реакция, прежде всего от рН среды, присутствия электролита, температуры среды. Наиболее приемлемыми для реакции антиген — антитело являются физиологические условия внутренней среды макроорганизма: показатель рН, близкий к нейтральному значению, присутствие 0,85%-го раствора NaCl, температура 36–37 °С.

Серологические реакции характеризуются специфичностью и чувствительностью. Под специфичностью понимают способность антигена реагировать только с комплементарными антителами. Чувствительность — это возможность определения минимальных количеств антигена или антител.

Серологические реакции применяют для: а) выявления неизвестных антител, находящихся в сыворотке крови животного, с помощью

известного антигена; б) определения неизвестного вида микроорганизмов с помощью известных антител.

Кроме того, серологические реакции позволяют выявить активность защитных сил организма после перенесения инфекционной болезни и вакцинации, судить о напряженности иммунитета.

Реакция агглютинации (РА) – была первой серологической реакцией, разработанной в конце XIX в. (Груббер, Дурхам, 1897).

Агглютинацией (от лат. *agglutinatio* – склеивание) называют склеивание бактерий и выпадение их в осадок, а также эритроцитов с адсорбированными на них антигенами под влиянием антител в среде с электролитом. Реакция основана на способности антигенов бактерий специфически соединяться с антителами иммунной сыворотки в физиологическом растворе с образованием зерен, комочков, хлопьев.

Антиген, участвующий в реакции агглютинации и связанный с микробной клеткой, получил название агглютиногена, а антитела – агглютинины. Образующийся специфический комплекс «корпускулярный антиген + антитело», выпадающий при положительной реакции в виде осадка, стали называть агглютинатом.

Для постановки реакции агглютинации используют только корпускулярные антигены (суспензии бактерий, эритроцитов). Характер и скорость агглютинации зависит от вида антигена. Неподвижные бактерии, имеющие соматический О-антиген, образуют мелкозернистый агглютинат, а имеющие жгутиковый Н-антиген – крупнозернистый.

Существуют различные модификации постановки реакции агглютинации:

пробирочная (классическая);

ориентировочная на стекле (сывороточно-капельная – СКРА, кровяно-капельная – ККРА);

кольцевая реакция с молоком;

реакции гемагглютинации и ее разновидности.

Необходимо отметить, что реакция гемагглютинации (РГА) не относится к серологическим и диагностическим точным реакциям, однако позволяет обнаружить антиген-гемагглютинин и установить способность агглютинировать эритроциты у некоторых бактерий, микоплазм, вирусов.

Реакцию агглютинации применяют для диагностики многих инфекционных болезней: бруцеллеза, лептоспироза, сальмонеллеза, ишерихиоза и др.

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА) основана на использовании эритроцитов (латекса) с адсорбированными антиге-

нами или антителами, взаимодействие которых с соответствующими антигенами или антителами сыворотки крови вызывает склеивание и выпадение эритроцитов в осадок. Связывание серологически активного вещества (сенситина) с эритроцитами называется сенсibilизацией. Сенситинами могут быть антигены и антитела. *Реакция непрямой гемагглютинации* по своей высокой чувствительности и специфичности занимает ведущее место в серодиагностике.

Реакция преципитации (от лат. *praecipitatas* – осадок) (РП) – это формирование и выпадение в осадок комплекса растворимого молекулярного антигена со специфическими антителами. Антигены в этой реакции называют преципитинами, образующийся осадок – преципитатом. В отличие от реакции агглютинации, в реакции преципитации применяют растворимые антигены в виде прозрачных растворов. Антигеном в реакции преципитации может служить фильтрат убитой культуры или фильтрат экстракта исследуемого материала. Антитела получают путем гипериммунизации животных антигенами. Антигены для реакции преципитации резистентны к нагреванию. В ветеринарной практике наиболее широко применяют реакцию кольцепитации для диагностики сибирской язвы. Реакция преципитации может быть поставлена в агаровом геле и называется реакцией диффузной преципитации (РДПА). С помощью реакции преципитации определяют фальсификацию мясных, мучных и других продуктов. Используют ее в судебно-медицинской экспертизе при определении видовой принадлежности крови.

Реакция связывания комплемента (РСК) разработана Ж. Борде и О. Жангу в 1901 г. Сущность реакции состоит в полном связывании комплемента комплексом антиген–антитело, в результате чего лизис эритроцитов гемолитической сывороткой становится невозможным. В реакции участвуют две системы: *бактериальная* (антиген + антитела + комплемент) и *гемолитическая* (эритроциты барана + антитела против эритроцитов барана). Реакция протекает в два этапа: вначале в бактериальной, а затем в гемолитической системе. На первом этапе происходит образование комплекса антиген + антитело + комплемент. Реакция между компонентами бактериальной системы невидима, поэтому на втором этапе в пробирки вносят индикаторную гемолитическую систему. Реакция считается положительной, если отсутствует гемолиз эритроцитов, и отрицательной, если происходит их гемолиз, так как гемолиз обусловлен наличием активного комплемента, не связавшегося на первом этапе реакции в бактериальной системе.

Реакция нейтрализации (РН) предложена П. Рамоном в 1922 г. В основе реакции лежит взаимодействие микробного токсина (антигена) с антитоксином (антителом). Реакцию нейтрализации в основном применяют для определения вида или типа токсигенных микроорганизмов (возбудителей ботулизма, злокачественного отека и др.). Суть реакции в том, что в пробирку вносят токсин и антитоксическую сыворотку и помещают в термостат на 30 мин при 37 °С для контакта антигена и антител. Для выявления результата реакции смесью заражают лабораторных животных. Показатель положительной РН – отсутствие гибели животных, что является свидетельством нейтрализации токсина антителами антитоксической сыворотки.

Метод флуоресцирующих антител (МФА), или реакция иммунофлуоресценции (РИФ), предложен А. Кунсом в 1942 г. Сущность метода заключается в том, что антитела меченые, т. е. соединенные с флуорохромом (веществом, светящимся под микроскопом), способны вступать в специфическую связь с гомологичным антигеном. Комплекс антиген + антитело обнаруживают под люминесцентным микроскопом по характерному свечению. Метод имеет высокую чувствительность и специфичность. К его достоинствам относится возможность:

провести исследование в течение 2–3 ч, т. е. является экспресс-методом;

идентифицировать микроб в патологическом материале без выделения его чистой культуры;

выявить взаимодействие антигена и антитела на предметном стекле, на котором фиксирован антиген.

В качестве флуорохрома используют флуоресцеин изотиоцианат (зеленое свечение) и родамина сульфохлорид (красное свечение). Антитело, меченное флуорохромом, называют конъюгатом. Биологическая промышленность выпускает флуоресцирующие сыворотки для диагностики многих болезней: рожи свиней, листериоза, сибирской язвы, сальмонеллеза, микоплазмозов и др. Результат реакции считают положительным при наличии яркого свечения только периферии клетки, отрицательным – при отсутствии свечения. У извитых бактерий (лептоспиры, вибрионы) светится вся клетка.

Имуноферментный анализ (ИФА) – аналогичен методу флуоресцирующих антител, но в качестве метки антител используют фермент пероксидазу хрена, кислую и щелочную фосфатазу, глюкозооксидазу и другие ферменты. Для идентификации бактериальных антигенов ИФА применяют в двух вариантах: гистохимическом и твердофазном.

На практике чаще всего применяют твердофазный вариант ИФА, который используется для обнаружения бактериальных антигенов, а также специфических антител. Метод основан на применении антител или антигенов, фиксированных на нерастворимых носителях. В качестве носителей широкое распространение получили полистироловые микропанели. Для выявления антигенов используют метод двойных антител (сэндвич-метод). Для этого в лунки вносят суспензию специфических антител, панели инкубируют 1 ч при 37 °С и оставляют на ночь при 4 °С. На следующий день из лунок удаляют раствор иммуноглобулинов, панели промывают калийфосфатным буфером, затем вносят исследуемый антиген и инкубируют 1 ч при 37 °С. После этого в лунки вносят иммуноглобулины, специфические к антигену и меченные (конъюгированные) ферментом – пероксидазой хрена. После взаимодействия и отмывания избытка компонентов в лунку добавляют субстратную смесь, главным компонентом которой является ортофенилендиамин или 5-аминосалициловая кислота (для пероксидазы). Инкубируют в темноте при комнатной температуре 5–30 мин. При положительной реакции образцы будут иметь оранжево-коричневую окраску.

Для выявления антител в ячейках панелей фиксируют антиген, затем добавляют исследуемую сыворотку, оставляют на контакт, промывают и добавляют меченный ферментом антиглобулин, содержащий антитела к глобулинам исследуемой сыворотки. Он фиксируется на комплексе антиген–антитело. Количество прикрепленного конъюгата измеряют после добавления субстрата (проявляющего раствора) по изменению интенсивности окраски вследствие разложения последнего под действием фермента.

12.4. Клеточные реакции

Реакции антигена с сенсibilизированными лимфоцитами называются *клеточными*. Наибольшее значение среди методов иммунодиагностики с использованием проявления клеточного иммунитета имеет аллергическая диагностика. Это диагностика инфекционных болезней с помощью реакций, выявляющих повышенную чувствительность клеток и тканей организма к специфическим инфекционным аллергенам. На введение аллергена (в кожу, под кожу, на слизистые оболочки) инфицированный организм отвечает аллергической реакцией,

которая протекает как местное (гиперемия, отек, болезненность) или общее явление (угнетение, повышение температуры тела, учащение дыхания, нарушение сердечной деятельности). В неинфицированном организме таких явлений при введении аллергена не наблюдают.

Практическая ценность аллергодиагностики заключается в высокой специфичности, в возможности прижизненной постановки диагноза, простоте выполнения, в способности выявлять больных при отсутствии клинических признаков.

Широко используются аллергические пробы при сапе, туберкулезе, бруцеллезе, паратуберкулезе, туляремии, эпизоотическом лимфангите, сибирской язве и др. При этом используют аллергены (вещества антигенной или гаптенной природы, обуславливающие аллергию). Аллергены выпускают корпускулярные (состоят из бактерий, находящихся во взвеси) и лизированные (экстракты бактериальных культур):

1) маллеин — стерильный фильтрат убитой нагреванием бульонной культуры возбудителя сапа, применяется нанесением на слизистую глаза или введением подкожно;

2) ППД туберкулин для млекопитающих и ППД туберкулин для птиц, состоящие из лиофильно высушенных осажденных белков культурального фильтрата возбудителя туберкулеза бычьего и человеческого видов в первом случае. ППД туберкулин для птиц — аналог ППД туберкулина для млекопитающих, но готовится из штаммов возбудителя туберкулеза птиц. Применяют их в основном внутрикожно;

3) бруцеллин ВИЭВ — опалесцирующая жидкость, содержащая специфические вещества, извлеченные из бруцелл, вводят под- и внутрикожно;

4) тулярин — взвесь туляремиальных микробов на физиологическом растворе с добавлением 3%-го глицерина, выращенных на твердой питательной среде, убитых путем нагревания. Пробу с ним ставят как внутрикожно, так и на кожно (у людей);

5) антраксин — представляет собой продукт гидролиза вакцинного штамма противосибиреязвенной вакцины СТИ-1.

Клеточных реакций довольно много: реакция бласттрансформации лимфоцитов, реакция торможения миграции макрофагов, реакции повреждения антигенами сенсibilизированных гранулоцитов, реакция лизиса лейкоцитов и др.

Реакция бласттрансформации лейкоцитов (РБТЛ) — переход малых лимфоцитов в бластные формы, способных к пролиферации и дальнейшей дифференцировке, называется *бласттрансформацией* и

сопровождается морфологическими изменениями лимфоцитов. Бласти – крупные, округлой формы клетки, имеют большое ядро, занимающее большую часть цитоплазмы. В ядре содержится несколько крупных базофильных ядрышек, цитоплазма бластов зернистая. РБТЛ изучают в культуре лимфоцитов *in vitro* под влиянием антигена, к которым лимфоциты сенсибилизированы, прямым подсчетом бластов в окрашенных препаратах под микроскопом.

Реакция торможения миграции макрофагов заключается в том, что лимфоциты сенсиблизованного организма в присутствии специфического антигена в культуральной среде продуцируют лимфокин – фактор, угнетающий миграцию макрофагов.

Глава 13. **БИОПРЕПАРАТЫ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЖИВОТНЫХ**



13.1. Ветеринарные биологические препараты и их классификация

К биологическим ветеринарным препаратам относят средства биологического происхождения, которые используют для создания активного и пассивного иммунитета, лечения больных животных, диагностики инфекционных болезней.

По характеру назначения биологические препараты применяют для:

активной иммунизации животных против инфекционных болезней (вакцины, анатоксины);

пассивной иммунизации и лечения больных животных (гипериммунные сыворотки, иммуноглобулины, бактериофаги);

диагностики инфекционных болезней (диагностические сыворотки, аллергены, анитоксины, бактериофаги).

13.1.1. Биопрепараты для активной иммунизации животных

Для активной иммунизации используют вакцины и анатоксины. Эти препараты применяют для профилактики инфекционных болезней. Профилактика (от гр. *prophylaktikos* – предохранительный) означает предупреждение инфекционных болезней людей и животных. Профилактика – система мероприятий, обеспечивающих предупреждение возникновения и распространения инфекционных болезней. Профилактика, помимо общих мер (карантин, ограничительные мероприятия, дезинфекция и т. д.), включает специфическую профилактику, т. е. применение вакцин, иммуноглобулинов и других препаратов.

Вакцинами называют препараты, которые получают из различных микроорганизмов, отдельных компонентов микробной клетки, продуктов жизнедеятельности бактерий. Термин «вакцина» был предложен Л. Пастером в честь открытия Э. Дженнера, применившего вирус оспы коров для иммунизации людей против оспы. Материал для создания иммунитета назвали вакциной, а процесс введения вакцины – вакцинацией (от лат. *vacca* – корова).

Вакцины относят к сложным иммунологическим препаратам. В их состав, кроме активного начала – антигена, входят его стабилизаторы, вещества, активирующие действие антигена, – адьюванты, а также консерванты.

Вакцины подразделяют:

- 1) живые;
- 2) инактивированные;
- 3) поливалентные (ассоциированные);
- 4) химические.

Живые вакцины получают чаще всего из аттенуированных штаммов патогенных микроорганизмов. Эти штаммы слабовирулентны или авирулентны. Получают их различными способами – путем пассивирования через организм маловосприимчивых животных, культивированием на искусственных питательных средах, воздействием температуры, бактериофагов, антибиотиков. Аттенуированные штаммы, потерявшие свою патогенность, – это штаммы с пониженной вирулентностью, но сохранившие антигенные свойства и способные при введении в организм вызывать формирование иммунитета.

Живые вакцины представляют собой взвесь микроорганизмов или вирусов, выращенных на специальных средах, не содержащую

консервантов. В живых вакцинах в качестве действующего начала используют:

аттенуированные штаммы природных бактерий и вирусов;

дивергентные штаммы непатогенных бактерий и вирусов, имеющие родственные антигены с антигенами болезнетворных бактерий и вирусов (например, туберкулезная вакцина БЦЖ, используемая для прививок против туберкулеза человека, содержит аттенуированный штамм возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота, имеющего общую антигенность с возбудителем туберкулеза человека);

рекомбинантные штаммы бактерий и вирусов, полученные генно-инженерным способом, т. е. используют непатогенные бактерии и вирусы со встроенными в них генами специфических антигенов патогенных микробов. Введенный в организм живой непатогенный рекомбинантный штамм вырабатывает (экспрессирует) антиген патогенного микроба, обеспечивающий формирование специфического иммунитета. Рекомбинантный штамм выполняет роль вектора (проводника) специфического антигена, поэтому такие рекомбинантные вакцины называют векторными.

Живые вакцины при введении в организм вызывают развитие так называемого вакцинального процесса, который заключается в размножении вакцинного штамма и воздействии бактерий на иммунокомпетентные клетки. При вакцинации живыми вакцинами создается длительный и напряженный иммунитет. Их преимущества в том, что эти вакцины применяют однократно, их дозы меньше, чем инактивированных. Однако при хранении живых вакцин необходимо строго соблюдать температурный режим (4–10 °С), а при вакцинации выполнять требования по их применению. Живые вакцины могут вызывать аллергию и осложнения в форме повторного перенесения болезни вакцинированных животных. После вакцинации живыми вакцинами нельзя применять антисептики в течение 7 дней. В ветеринарной практике используют ряд живых вакцин: СТИ против сибирской язвы, живую сухую против сальмонеллеза свиней, против сальмонеллеза молодняка, живую сухую против рожи свиней и др.

Инактивированные вакцины представляют собой препараты, приготовленные из инактивированных (убитых) различными способами возбудителей инфекционных болезней. Для инактивации выращенных культур возбудителей используют различные физико-химические факторы (нагревание, ультрафиолетовое облучение, формалин, фенол, этанол, мертиолят и др.). В результате инактивации бактерии

и вирусы полностью теряют жизнеспособность, но сохраняют антигенные и иммуногенные свойства.

Инактивированные вакцины можно разделить на две группы: корпускулярные и молекулярные. Корпускулярные вакцины — это препараты, в которых действующим началом являются инактивированные цельные клетки бактерий или структурные элементы микробов, несущие специфические протективные антигены. Молекулярные вакцины — это препараты, в которых антиген находится в молекулярной форме. Типичным примером молекулярных вакцин являются анатоксины: столбнячный, дифтерийный, ботулинический и др.

Метод перевода токсина в анатоксин был разработан французским иммунологом П. Рамоном в 1923 г. Он установил, что прибавление к токсину формалина и выдерживание его при 37 °С в течение месяца лишает токсин токсичности с сохранением способности вызывать формирование иммунитета. Анатоксин представляет собой обезвреженный формалином и теплом токсин. В практике применяют анатоксины против столбняка, дифтерии, ботулизма, клостридиозов овец, газовой гангрены, стафилококковых инфекций.

Инактивированные вакцины широко применяют в ветеринарной практике. Для формирования напряженного иммунитета у вакцинируемых животных эти вакцины обычно вводят дважды. В состав инактивированных вакцин входят инактиваторы (фенол, формалин, ацетон и другие вещества), являющиеся сильными мутагенами, поэтому эти препараты необходимо точно дозировать.

Биологическая промышленность готовит большое количество инактивированных вакцин для активной профилактики многих инфекционных болезней. Например, вакцину поливалентную против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей, вакцину эмульгированную против пастереллеза свиней, поливалентную вакцину ВГНКИ против лептоспироза животных, депонированную вакцину против рожи свиней и многие другие.

При выборе биопрепарата для проведения вакцинации можно руководствоваться данными, относительно свойств живых и инактивированных вакцин, представленных в таблице.

Поливалентные (ассоциированные) вакцины — препараты, полученные из культур нескольких возбудителей инфекционных болезней или содержащие несколько сероваров одного вида микроорганизмов. Организм способен формировать полноценный иммунитет при одновременном введении нескольких антигенов. Это послужило основанием для создания ассоциированных вакцин.

**Таблица. Положительные и отрицательные свойства
живых и инактивированных вакцин**

Свойства	
положительные	отрицательные
<i>Живые вакцины</i>	
Вводятся чаще однократно	Обладают остаточной реактогенностью, тогенностью
Небольшая доза	Могут вызывать поствакцинальные осложнения и заболевания части животных
Иммунитет наступает быстро, он более напряженный и продолжительный	В организме животных с низким иммунным статусом возможна реверсия живых вакцинных штаммов в исходное вирулентное состояние и возникновение заболевания
	Живые вакцинные штаммы могут включаться в различные ассоциации, формируя в организме животных смешанные паразитоценозы, в состав которых могут входить бактерии, вирусы, микоплазмы, хламидии, возбудители паразитарных болезней и т. п., что может приводить к возникновению пневмоэнтеритов сложной этиологической природы
	Могут быть контаминированы различными вирусами, бактериями, хламидиями и даже анаэробами
	Некоторые вакцинные штаммы обладают иммунодепрессивным действием и приводят к активизации условно патогенной микрофлоры в организме вакцинированных животных (вакцинные штаммы классической чумы свиней, репродуктивно-респираторного синдрома свиней и др.)
	Иммунизация беременных животных может привести к развитию у родившегося молодняка толерантности и они могут стать бессимптомными носителями вирулентных эпизоотических штаммов соответствующего возбудителя
	Дифференциация вакцинного и эпизоотического штаммов в организме привитого животного при абсолютном большинстве инфекционных болезней не разработана, за исключением маркированных вакцинных штаммов

Свойства	
положительные	отрицательные
<i>Инактивированные вакцины</i>	
Слабая реактогенность	Вводятся двух- или трехкратно
Отсутствие реверсии у вакцинных штаммов к исходному вирулентному состоянию	Большая доза
Не создают проблем в дифференцировке вакцинных и эпизоотических штаммов, циркулирующих в организме привитого животного	Менее напряженный и более короткий, медленно наступающий иммунитет
Можно применять к микробоносителям и больным животным	

В медицинской и ветеринарной практике применяют бивалентные, трех- и поливалентные вакцины. В ветеринарной практике разработан метод комплексной вакцинации животных, основанной на одновременном введении животному смеси двух-трех производственных вакцин. Ассоциированные вакцины и метод комплексной вакцинации позволяют сократить сроки вакцинации, экономят время, труд ветеринарных специалистов, снижают количество стрессовых ситуаций, обеспечивают за короткий срок создание устойчивости к нескольким возбудителям.

В качестве примера можно привести следующие ассоциированные вакцины, используемые для иммунизации животных: ассоциированная (поливалентная) вакцина против сальмонеллеза, пастереллеза и диплококковой септицемии поросят, поливалентная вакцина ВГНКИ против лептоспироза животных, поливалентная концентрированная вакцина против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят.

Химические вакцины — это вакцины, содержащие экстрагированные из микроорганизмов химические фракции, обладающие антигенными свойствами и способные формировать иммунитет. Эти препараты имеют ряд неоспоримых преимуществ. Они характеризуются высокой степенью очистки от балластных белков, слабыми аллергизирующими и пирогенными свойствами, отсутствием поствакцинальных осложнений, применением небольших по объему доз, возмож-

ности длительного хранения, приготовления из химических фракций бактерий ассоциированных вакцин.

Для повышения иммуногенной активности вакцин применяют неспецифические стимуляторы иммуногенеза, которые называют депонирующими веществами или адьювантами (от *adjuvant* – помощник). Вакцины, в которые добавлены адьюванты, называют депонированными. Адьювантами могут быть разнообразные вещества минеральной или органической природы. В качестве адьювантов используют, например, алюминия гидроксид, вазелиновое масло, кальция хлорид, сапонин, липиды и т. д.

Механизм действия адьювантов многообразен. В основном он сводится к созданию депо антигена в месте введения вакцины и, следовательно, пролонгации действия антигена на иммунную систему, воспалительной реакции, активизирующей иммунокомпетентные клетки, активации процесса захвата антигена и его переработке фагоцитирующими клетками. Адьюванты повышают иммуногенность вакцин в десятки раз и более.

13.1.2. Биопрепараты для пассивной иммунизации и лечения животных

К группе препаратов для пассивной иммунизации относят гипериммунные сыворотки, иммуноглобулины, иммунолактон, бактериофаги.

Гипериммунная сыворотка – это сыворотка крови животных, гипериммунизированных микробными антигенами, содержащая специфические антитела, способные нейтрализовать действие патогенных возбудителей и их токсинов.

Различают антибактериальные, антитоксические, противовирусные и смешанные сыворотки. Антибактериальные сыворотки содержат антитела против бактерий, антитоксические – антитела против токсинов микроорганизмов, противовирусные – антитела против вирусов, смешанные – антитела против бактерий и токсинов.

Для лечения и пассивной иммунизации применяют сыворотку крови реконвалесцентов – переболевших животных. Однако предварительно реконвалесцентов необходимо проверить на наличие хронических инфекционных болезней. Сыворотку реконвалесцентов часто применяют при остропротекающих респираторных болезнях крупного рогатого скота (инфекционный ринотрахеит, парагрипп, микоплазмоз

и др.). Реконвалесцентов желательно подбирать из числа животных, находящихся на одной и той же ферме, переболевших определенной болезнью. Кровь от них можно брать непосредственно в хозяйствах из расчета 15–16 г на 1 кг массы донора. Реконвалесцентов можно тотально обескровливать на мясокомбинате.

Иммуноглобулины – препараты, представляющие собой водный раствор глобулиновой фракции сыворотки крови животных, гипериммунизированных против определенной болезни. Препараты иммуноглобулинов, содержащие гамма- и бета-фракции глобулинов, превосходят по своей профилактической и лечебной эффективности препараты, состоящие из одних гамма-глобулинов. Это связано с тем, что иммунные тела могут быть связаны не только с гамма-глобулиновой, но и бета-глобулиновой фракцией. Иммуноглобулины по превентивной активности превосходят гипериммунные сыворотки, из которых их в основном и получают.

Имунолактон – это лиофильно высушенная сыворотка молока коров, гипериммунизированных против определенной болезни. Высокая активность лактосыворотки достигается методом диателической гипериммунизации лактирующих коров – через канал сосков в цистерну молочной железы. После гипериммунизации от коров получают молоко и обезжиривают сепарированием. Обратно створаживают 50%-й уксусной кислотой, сгустки казеина удаляют, а сыворотку фильтруют и высушивают лиофильным способом. В бывшем СССР было налажено промышленное производство противоящурного иммунолактона. Этот препарат выпускала для нужд животноводства Витебская биофабрика.

Бактериофаги относят к иммунобиологическим препаратам, в которых в качестве активного начала используют фаги, т. е. вирусы, поражающие бактерии путем лизиса и инактивации. Бактериофаги широко распространены в природе. Их обнаруживают в воде, почве, кормах, выделениях людей и животных. Бактериофаги обнаружены практически у всех патогенных микроорганизмов. Препараты бактериофагов получают путем инфицирования фагом культуры бактерий определенного вида, выращенной в производственных условиях и чувствительной к данному фагу.

Бактериофаги обладают специфичностью. Специфичность проявляется в отношении не только определенного вида бактерий, но и штаммов одного и того же вида. С учетом специфичности бактериофагов их целесообразно использовать для диагностики инфекционных болезней и лечения больных животных. Препараты бактериофагов при-

меняют с целью идентификации возбудителей не только чистых бактериальных культур, но и в свежем патологическом материале.

Сущность промышленного производства бактериофагов сводится к тому, что из культуральной жидкости получают фильтрат фага, его концентрируют, проводят очистку и лиофильную сушку. Бактериофаги выпускают в виде таблеток, в жидком виде, дозируют числом вирусных частиц в 1 мл или в одной таблетке, хранят при 4–8 °С для предотвращения инактивации.

С диагностической целью применяют бактериофаги для диагностики листериоза, сибирской язвы, стафилококковых и других инфекций. Для профилактики и лечения применяют бактериофаги против сальмонеллеза, колибактериоза, дизентерии, пуллороза, тифа птиц и других болезней. При кишечных инфекциях бактериофаги назначают перорально, а при раневых инфекциях ими орошают раны.

13.1.3. Биопрепараты для диагностики инфекционных болезней животных

В ветеринарной практике для диагностики инфекционных болезней применяют диагностические специфические сыворотки, глобулины, антигены, аллергены. Эти препараты позволяют выявлять возбудителей болезней, определять его тип и вариант.

Диагностические сыворотки содержат специфические антитела. Их применяют для постановки серологических реакций: агглютинации, преципитации, нормализации, РСК и др. С помощью диагностических сывороток можно установить вид бактерий, их тип и вариант.

При проведении лабораторных исследований применяют сальмонеллезные монорецепторные О- и Н-агглютинирующие сыворотки, лептоспирозные агглютинирующие сыворотки, преципитирующую сибиреязвенную сыворотку и др.

Антигены — генетически чужеродные для организма вещества, которые при проникновении в него вызывают синтез антител и способны вступать с ними в специфическое взаимодействие. При выявлении антител у больных и переболевших животных можно ставить диагноз. Такой метод диагностики называют ретроспективным. Антигены для диагностики инфекционных болезней готовят биофабрики. Они могут содержать цельные микробные клетки, предварительно инактивированные или экстракт микробной культуры. Антигены используют для постановки серологических реакций (агглютинации, преципитации,

РСК и др.), при диагностике многих инфекционных болезней. Например, при диагностике бруцеллеза применяют единый бруцеллезный антиген для реакций агглютинации, РСК и РДСК, для диагностики вибриоза — антиген вибриозный, для диагностики листериоза — антиген листериозный, для сапа — сапной антиген, для сальмонеллеза — сальмонеллезные антигены и т. д.

Аллергены — препараты, изготовленные из соответствующих микроорганизмов или экстрактов из них, способные вызывать изменение реактивности организма. Эти препараты представляют собой взвесь инаktivированных микробных клеток или извлеченных из них активных фракций (туберкулин, маллеин, бруцеллин и др.). Они являются специфическими белками возбудителей инфекционных болезней. Введение аллергена внутривенно или нанесение на слизистую оболочку глаза больных животных вызывает воспалительную реакцию со стороны как кожи, так и слизистой оболочки. В ветеринарной практике применяют туберкулин, маллеин, бруцеллин и другие аллергены.

13.2. Принципы изготовления ветеринарных биологических препаратов и контроль их качества

Для изготовления активных специфических биопрепаратов (вакцин, анатоксинов) биопредприятия получают необходимые производственные штаммы из ФГУ.

Для производства любого биопрепарата необходима нормативно-техническая документация — НТД (инструкция по изготовлению и контролю препарата, ТУ — технические условия, рекомендации по применению).

Производство вакцинных препаратов включает:

- 1) проверку производственных штаммов на соответствие их паспортным данным, т. е. определение их культурально-морфологических, тинкториальных, биохимических и других свойств;
- 2) приготовление питательной среды для культивирования штаммов;
- 3) выращивание матровых культур микроорганизмов;
- 4) посев матровых расплодок производственных штаммов в реактор;
- 5) глубинное выращивание штаммов бактерий в реакторах;

6) инактивация культур, обычно путем добавления 0,2–0,3 % формалина или же другого инактиватора и выдерживание выращенной биомассы при температуре 36–37 °С на протяжении определенного срока, предусмотренного инструкцией по изготовлению биопрепарата;

7) проверку полноты инактивации культур путем высева их на питательные среды и введения в организм лабораторных животных;

8) расфасовку, обкатку и этикетировку приготовленного биопрепарата;

9) контроль качества биопрепарата на соответствие требованиям ТУ, т. е. определение безвредности, активности, величины рН и других показателей.

Антигены и аллергены для диагностики инфекционных болезней животных в общих чертах готовят так же, как и вакцинные препараты, но с учетом объема их производства, специфики биологических свойств штаммов, применяемых для изготовления диагностикумов, назначения препаратов и в связи с этим особенностей оценки качества этих диагностических средств.

Производство гипериммунных сывороток для пассивной профилактики и терапии животных включает:

1) проверку производственных штаммов, т. е. изучение их культурально-морфологических, биохимических, патогенных и других свойств;

2) приготовление питательной среды, культивирование штаммов бактерий и их инактивацию;

3) составление антигена для гипериммунизации продуцентов сыворотки и контроль его качества, т. е. определение стерильности, безвредности, иммуногенности;

4) гипериммунизацию продуцентов по схеме, предусмотренной нормативно-технической документацией;

5) взятие крови от продуцентов, ее сепарацию (отделение плазмы от эритроцитов), дефибринизацию плазмы, получение сыворотки и ее консервацию;

6) отстой сыворотки, ее фильтрацию, расфасовку, этикетировку;

7) контроль качества препарата на соответствие показателям, регламентированным техническими условиями.

Имуноглобулины готовят из гипериммунных сывороток путем разделения белков этих препаратов на отдельные фракции, выделения и концентрации фракций, содержащих специфические антитела. Для

производства иммуноглобулинов предложены различные методы: солевой, спиртовой, риванольный, полиэтиленгликолевый и др. Иммуноглобулины представляют собой более эффективные препараты, чем гипериммунные сыворотки, из которых они приготовлены.

Диагностические сыворотки готовят принципиально так же, как и гипериммунные, но в качестве продуцентов используют более мелких животных (овец, кроликов, морских свинок), в то время как продуцентами лечебных сывороток являются крупные животные (лошади, волы, мулы, ослы). Эти препараты не проверяют на безвредность, но контролируют на стерильность, специфичность и активность.

13.3. Хранение препаратов и их применение

Эффективность биопрепаратов в значительной степени зависит от соблюдения режима и правил их хранения, а также квалифицированного применения в практике. Биопрепараты необходимо хранить в темных, сухих помещениях с равномерной температурой в течение всего года в пределах 2–15 °С. Разные виды препаратов можно хранить в одном помещении, но отдельно по видам на специальных стеллажах, полках и в шкафах. Помещение для хранения препаратов должно быть замкнуто и опечатано, ключ от него должен находиться у ответственного лица, которому вменяется в обязанности следить за режимом хранения, учетом поступления и расходования препаратов. Контроль за температурным режимом и влажностью воздуха в хранилище осуществляют ежедневно и результаты его заносят в специальный журнал. Для хранения биопрепаратов можно использовать холодильные специальные установки, обеспечивающие поддержание микроклимата (температура, влажность).

Не допускается совместное хранение выбракованных и годных к применению препаратов. Выбракованными следует считать препараты при наличии в них посторонних примесей, плесени, изменении консистенции и цвета, неразбивающихся пленок и комков, в случае промерзания, отсутствия этикеток, просачивания содержимого через пробку и т. д. Бракуют препараты комиссионно, уничтожают автоклавированием или кипячением, при этом составляют акт.

Вакцины и анатоксины применяют согласно рекомендациям, учитывая величину дозы, способ введения, кратность инъекций и т. д.

Препараты, содержащие адьюванты, перед использованием тщательно встряхивают до получения однородной взвеси. Эмульгированные вакцины, в состав которых входят минеральные масла, подогревают в водяной бане при 36–37 °С, а затем флаконы с препаратом встряхивают до получения равномерной взвеси.

Запрещено использовать биопрепараты с истекшим сроком годности. При растворении лиофильно высушенных препаратов следует применять растворитель, указанный в рекомендациях.

Транспортировать биопрепараты независимо от сезона года необходимо в условиях, исключающих снижение их качества, например большие партии препаратов в зимнее время — в теплых вагонах, обогреваемых машинах, а в летнее время — в специальных рефрижераторах, где можно поддерживать заданную температуру.

14.1. Общие сведения о кокках

Кокки (от гр. *kokkus* — зерно, от лат. *coccus* — ягода) — широко распространенная в природе группа шаровидных сапротрофных условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. К патогенным коккам относятся стафило-, стрепто-, пневмо-, менинго- и гонококки, которые принадлежат к семействам *Staphylococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Neisseriaceae*. Микроорганизмы этих родов обитают на коже, слизистых оболочках пищеварительного, дыхательного и мочеполового трактов.

Биологические свойства патогенных кокков разнообразны:

1) кокки одного вида часто являются причиной различных инфекционных процессов — от местного воспаления до множественных абсцессов и сепсиса;

2) у некоторых кокков выражена органотропность — диплококки вызывают пневмонии, мытный стрептококк — воспаление шейных лимфоузлов и протоков, менингококки — воспаление оболочек спинного и головного мозга, гонококки — гнойное воспаление слизистых оболочек, чаще мочеполовой системы;

3) кокки ряда видов (чаще из рода *Staphylococcus*) благодаря образованию энтеротоксинов обусловли-

вают пищевые отравления у людей и кормовые у животных (особенно плотоядных);

4) все патогенные кокки токсигенны, так как способны продуцировать различные экзотоксины и эндотоксины;

5) основное свойство патогенных кокков – способность вызывать гнойно-воспалительные процессы;

6) компоненты бактериальных клеток многих кокков и их метаболиты проявляют сенсибилизирующее действие, выражающееся в реакциях немедленного и замедленного типов. Клинически сенсибилизация проявляется дерматитами, бронхоспастическим синдромом и т. д.;

7) большинство кокков имеют шаровидную или овальную форму, клетки некоторых видов могут быть эллипсоидными, бобовидными или ланцетовидными, диаметром до 1,5 мкм, в основном грамположительны (за исключением гоно- и менингококков – грамотрицательны), спор не образуют, капсул не формируют (за исключением диплококков, некоторых штаммов золотистого стафилококка), неподвижны, в основном неприхотливы к питательным средам.

14.2. Возбудители стафилококкозов

Стафилококкозы – инфекционные болезни, характеризующиеся разнообразными формами проявления инфекционной патологии: маститами, дерматитами, абсцессами, остеомиелитами, эндометритами, менингитами, циститами, энтероколитами, токсикоинфекциями, пневмониями, сепсисом.

Стафилококки впервые были открыты в 1880 г. независимо друг от друга Л. Пастером и А. Огстоном и более детально изучены Ф. Розенбахом в 1984 г.

Стафилококки отнесены к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Bacillales*, семейству *Staphylococcaceae*, роду *Staphylococcus*, включающему 36 видов стафилококков.

Типичными представителями являются *S. aureus* (золотистый), *S. epidermidis* (эпидермальный), *S. saprophyticus* (сапрофитический).

Морфология. Стафилококки – клетки шаровидной формы, диаметром до 1,5 мкм. В препаратах из гноя, бульонных культур бактерии располагаются по одному, по два, цепочками, небольшими скоплениями неопределенной формы. В препаратах из агаровых культур могут

расположены довольно характерно в виде скоплений, напоминающих гроздь винограда (от греч. *Staphylle* – гроздь) (рис. 14.1). Бактерии неподвижны, спор и капсул не образуют, грамположительны, в старых культурах приобретают способность окрашиваться грамтрицательно. В МИБ могут образовывать инволюционные формы – крупные или очень мелкие кокки. В материале от животных, больных ботриомикозом, можно обнаружить зооглейные скопления стафилококков (кокков, окруженных общей гомогенной капсулой).

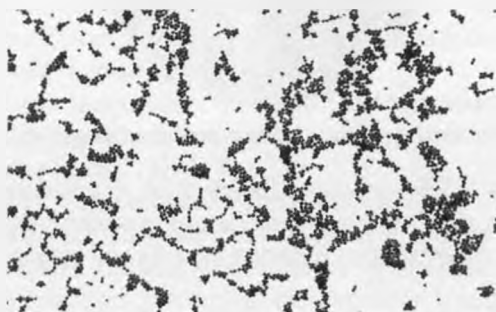


Рис. 14.1. Мазок чистой культуры *S. aureus*, окраска по Граму

Культуральные свойства. Бактерии – факультативные анаэробы, но лучше развиваются в аэробных условиях. Стафилококки – хемоорганотрофы с окислительным и броидильным типом метаболизма. Хорошо культивируются на простых питательных средах, T° – 35–37 $^{\circ}C$, pH 7,2–7,4; лучше с добавлением к среде глюкозы или крови. Культивируют стафилококки в течение 18–24 ч. Основное свойство большинства штаммов – способность расти в присутствии 15 % NaCl или 40 % желчи.

На МПА образуют круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара колонии с гладкой блестящей поверхностью и ровным краем, диаметром 2–5 мм. Стафилококкам присуще пигментообразование, что отчетливо наблюдается при добавлении к среде молочного сахара (10 %), а также на картофеле в аэробных условиях при рассеянном свете. Цвет колоний серый или серо-белый с желтоватым, желто-оранжевым, оранжевым, кремовым или коричневатым оттенком (рис. 14.2). Цвет пигмента колоний может быть различным у разных штаммов одного и того же вида, поэтому он не является дифференциальным признаком. Колонии имеют грубозернистую структуру с уплотненным центром.



Рис. 14.2. Рост на кровяном агаре стрептококка и стафилококка

При росте в МПБ вызывают диффузное помутнение среды с выпадением на дне пробирки хлопьевидного рыхлого осадка, возможно образование на поверхности бульона серо-белой пленки или пристеночного кольца.

Патогенные штаммы стафилококков образуют на кровяном агаре колонии, окруженные значительной зоной гемолиза. Считают, что кровяной агар является лучшей средой для выделения стафилококков из патологического материала. Для приготовления кровяного агара к расплавленному обычному агару, охлажденному до 45–50 °С, прибавляют 5–10 % дефибринированной или цельной свежевзятой крови животных. Характерным для стафилококков является то, что они могут расти в присутствии в средах 15–16 % NaCl или 40 % желчи. Под действием антибиотиков могут превращаться в карликовые и фильтрующиеся формы.

В столбике желатина растут по месту укола и на 4–5-й день на поверхности среды образуется воронка, наполненная жидкостью.

Биохимические свойства. Стафилококки – биохимически активные микроорганизмы. Они продуцируют сахаролитические и протеолитические ферменты. Бактерии расщепляют до кислоты без газа глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, маннит, леулузу, не разлагают дульцит, салицин, раффинозу, свертывают и пептонируют молоко, разжижают желатин, восстанавливают нитраты в нитриты, выделяют аммиак и сероводород, не образуют индол, продуцируют каталазу, фосфатазу, уреазу; патогенные штаммы – аргиназу. Стафилококки синтезируют бактериоцины.

Антигенная структура. Стафилококки имеют сложную и вариабельную антигенную структуру. Известно около 30 антигенов, представляющих собой белки, полисахариды и тейхоевые кислоты. Пептидогликан — общий видовой антиген стафилококков. Тейхоевые кислоты — высокоспецифические полисахаридные антигены. Протеин А обнаружен у золотистого стафилококка. Это низкомолекулярный белок, имеющий свойство соединяться с Fc-фрагментами IgG млекопитающих, но используется для постановки реакции коагутинации. Штаммы, продуцирующие белок А, обладают высокой резистентностью к фагоцитозу. У мукоидных штаммов золотистого стафилококка выявлен также капсульный полипептидный антиген.

Антигенными свойствами обладают и выделяемые стафилококками токсины. Энтеротоксины по антигенным свойствам подразделяются на серовары А, В, С, D, E, F.

Устойчивость. Стафилококки устойчивы к неблагоприятным факторам внешней среды. Прямые солнечные лучи убивают их только через несколько часов. В пыли сохраняются 50–100 дней. Они хорошо переносят высушивание, длительно сохраняются в навозе, замораживание их консервирует. В жидкой среде при 70 °С погибают через 1 ч, при 85 °С — через 30 мин, при 100 °С — за несколько секунд. Стафилококки устойчивы к антибиотикам, что контролируется R-плазмидой. Однако бактерии чувствительны к кристаллвиолету, пиоктантину, малахитовой зелени. Известно, что 1%-й раствор хлорамина губит их в течение 2–3 мин, 1%-й раствор формалина, 2%-й раствор NaOH — в течение 1 ч.

Патогенность. Стафилококки следует рассматривать как условно-патогенные микроорганизмы. Они постоянно обитают в организме животных (на коже и слизистых). При неблагоприятных условиях — снижении резистентности макроорганизма, нарушении целостности кожного покрова, слизистых оболочек и др. — проявляют вирулентные свойства.

Стафилококки могут поражать любой орган и любую ткань макроорганизма. Они вызывают мастит у коров, коз, свиней, дерматит у лошадей, стафилококкоз собак, пушных зверей, кроликов, птиц и мочепушняка первых дней жизни других видов животных.

К факторам патогенности относят синтезируемые бактериями токсины и ферменты: соответственно гистотоксин, гемолизины, лейкоцидин, энтеротоксины и коагулаза, гиалуронидаза, ДНКаза, фибринолизин.

Коагулаза — коагулирует плазму крови, ее наличие является одним из наиболее важных и постоянных критерием патогенности стафилококков. Ее выделяют *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. delphini*, *S. lutrae*.

Гистотоксин — летальный токсин общего действия.

Энтеротоксины вызывают пищевые токсикозы человека, к ним чувствительны кошки, особенно котята, и щенки собак.

Лейкоцидин вызывает дегрануляцию и разрушение лейкоцитов.

Гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту, которая препятствует проникновению микробов в ткани.

Гемотоксин (альфа-, бета-, гамма-, дельта-) лизирует эритроциты, агрегирует и лизирует тромбоциты.

Фибринолизин растворяет фибрин, что нарушает формирование кровяного сгустка.

ДНКаза — фермент, деполимиризирующий ДНК.

Основная роль в инфекционной патологии животных и человека принадлежит *S. aureus*. Возбудителями стафилококковых инфекций могут быть также *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*.

К стафилококкам чувствительны лошади, крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, утки, гуси, индейки, куры, из лабораторных животных — кролики, белые мыши, котята, а также человек (например, *S. aureus* — синдром «ошпаренной кожи», синдром «ошпаренных младенцев», синдром токсического шока, бактериемия, инфекции опорно-двигательного аппарата — остеомиелита, артрита и др., эндокардита, пневмоний).

Патогенез. Бактерии проникают в организм через поврежденную кожу, слизистые оболочки пищеварительного, дыхательного и мочеполового трактов, энтеротоксины — с пищей. Стафилококки могут вызывать патологические процессы местного и общего характера (воспаление на месте проникновения в ткани, пиемию, сепсис). Они могут проникать в лимфососуды и лимфоузлы и вызывать развитие септицемии. Ведущую роль в патогенезе болезни играют экзотоксины и ферменты патогенности. Важное значение может иметь и аллергия.

Стафилококковые инфекции чаще развиваются и тяжелее протекают в условиях снижения естественной резистентности организма и при иммунодефицитных состояниях.

Лабораторная диагностика. Она основывается на микроскопическом, бактериологическом и биологическом методах исследования.

Для исследования в лабораторию посылают трупы мелких животных и птиц целыми, от трупов крупных животных направляют части паренхиматозных органов, головной мозг, кровь из сердца; от больных животных в зависимости от клинических признаков — абортированные плоды, истечения из шейки матки, содержимое абсцессов, синовиальную жидкость из воспаленных суставов.

Патологический материал для исследования на стафилококковую инфекцию берут от животных, не подвергавшихся лечению антибиотиками, сульфаниламидными или нитрофурановыми препаратами в последние 10 дней. Из исследуемого материала готовят препараты, окрашивают по Граму, микроскопируют. Патологический материал высевают в обычные среды и на кровяной, молочно-солевой, желочно-солевой агар. Определение патогенности проводят в реакции плазмокоагуляции, по дермoneкротической пробе или биопробой на цыплятах.

В реакции плазмокоагуляции используют кроличью плазму. У кролика берут кровь из ушной вены или сердца в пробирку с 5%-м раствором лимонно-кислого натрия (2 мл раствора на 8–10 мл крови). Цитратную кровь центрифугируют при частоте вращения 3000 мин⁻¹ в течение 10 мин, затем плазму отсасывают и переносят в стерильные пробирки, которые закрывают пробками и хранят в холодильнике до 3 нед. Перед употреблением плазму разводят стерильным физиологическим раствором 1:5. Подготовленную для исследования плазму разливают по 0,5 мл в стерильные уленгутевские пробирки по количеству изучаемых культур. Затем в пробирку вносят 2 капли бульонной или одну петлю агаровой 18–24-часовой культуры. Одновременно ставят контроль плазмы без добавления культуры.

Пробирки помещают в термостат при температуре 37–38 °С. Учет реакции проводят через каждый час в течение 5–6 ч. При отсутствии коагуляции пробирки выдерживают при комнатной температуре 18 ч. При положительной реакции плазмокоагуляции образуется сгусток, который не выпадает из пробирки при наклоне. В случае, если коагулирована не вся плазма, сгусток плавает в ней.

Дермoneкротическую пробу ставят на кроликах (лучше белой масти) массой 2–2,5 кг. Накануне у кролика на боку в двух местах выстригают шерсть на площади 2 × 2 см. Суточную бульонную культуру вводят внутрикожно в выстриженные участки кожи в дозе 0,2 мл. При положительном результате на местах введения культуры через сутки появляется покраснение, на вторые сутки кожа темне-

ет и образуется некроз. Наблюдение за кроликами ведут в течение 4 дней.

При выделении от птиц культур стафилококков, не обладающих плазмокоагулирующими свойствами, их патогенность определяют на 1–2-суточных цыплятах. Суточную бульонную культуру в дозе 0,1 мл вводят двум цыплятам интраорбитально – во внешний угол глазницы между глазным яблоком и краем орбиты. Гибель цыплят наступает на 3–5-е сут.

Стафилококки необходимо дифференцировать от стрептококков. Стрептококки не образуют каталазу, никогда не ферментируют маннит, не растут на средах с добавлением 10 % NaCl.

Диагноз на стафилококкоз считают установленным при выделении из патологического материала культуры стафилококков со свойствами, характерными для *S. aureus*, и подтверждении ее патогенных свойств.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. У здоровых животных имеется естественная резистентность к стафилококковой инфекции. Она обусловлена барьерной функцией кожи, слизистых оболочек, фагоцитозом и наличием специфических антител, синтезированных в результате скрытой иммунизации. Иммунитет при стафилококкозе носит преимущественно антитоксический характер, слабой напряженности и непродолжительный, при этом развивается ГЗТ.

Для профилактики предложены очищенный адсорбированный анатоксин и аутовакцина (прогретый при 70–75 °С смыв агаровой культуры стафилококка, выделенного из организма больного животного). Иногда местно применяют фаг и противовирусный фильтрат 2–3-недельной культуры стафилококка.

14.3. Возбудители стрептококкозов

Стрептококкозы – это многочисленные инфекционные болезни, которые характеризуются разнообразными формами проявления инфекционной патологии: маститами, метритами, эндометритами, артритами, фарингитами, эндокардитами, ишемией, септицемией.

Стрептококки впервые выделил из тканей людей при раневых инфекциях Т. Бильрот, затем их описали Л. Пастер и А. Огстон, чистую культуру стрептококков получили и изучили Ф. Флейзен (1883) и А. Розенбах (1884).

Стрептококков относят к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*, который насчитывает 62 вида, семейству *Enterococcaceae*, роду *Enterococcus*, который насчитывает 29 видов.

Морфология. Стрептококки – бактерии сферической формы, диаметр клеток от 0,6 до 1 мкм, грамположительны, неподвижны, спор и капсул не образуют (образуют капсулу – *Str. pneumoniae*, *Str. equi subsp. zooepidemicus*). В поле зрения микроскопа в препаратах могут располагаться одиночно, попарно и длинными короткими цепочками (от гр. *streptos* – цепочка), например *Str. equi subsp. equi*, а также скоплениями неопределенной формы (рис. 14.3–14.6). Более крупные бактерии выстилают в препаратах из гноя и жидких питательных сред.



Рис. 14.3. *Sr. pneumoniae*



Рис. 14.4. *Ent. faecalis*

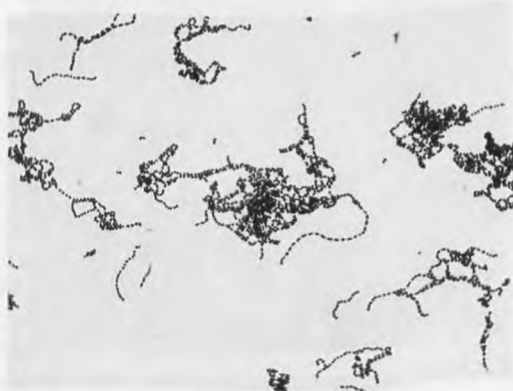


Рис. 14.5. *St. pyogenes*



Рис. 14.6. *St. equi subsp. equi*

Культуральные свойства. Стрептококки – факультативные анаэробы, некоторые разновидности – аэробы, более требовательны к питательным средам, чем стафилококки, температурный оптимум роста – 37–38 °С, рН сред 7,2–7,4. Хорошо растут в МПБ с добавлением 1 % глюкозы и 15–20 % сыворотки крови лошади, на МПА – 1 % глюкозы и 10 % дефибринированной крови (или ее сыворотки) барана или кролика. В жидкой питательной среде наблюдают придонный и пристеночный рост, помутнение бульона, образование крошковидного осадка. На МПА образуют мелкие (0,5–1 мм в диаметре) серовато-белые колонии. На кровяном агаре вокруг колоний образуется зона просветления – бета-гемолиз. Стрептококки могут вызывать альфа-гемолиз, т. е. вокруг колонии наблюдают зеленую зону гемолиза вследствие превращения гемоглобина в метгемоглобин (рис. 14.7 и 14.8).

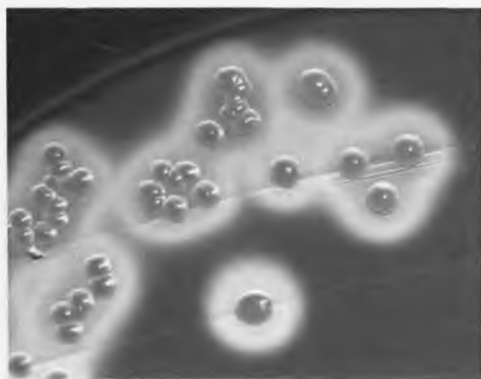


Рис. 14.7. На кровяном агаре вокруг колоний *Streptococcus pyogenes* – бета-гемолиз эритроцитов

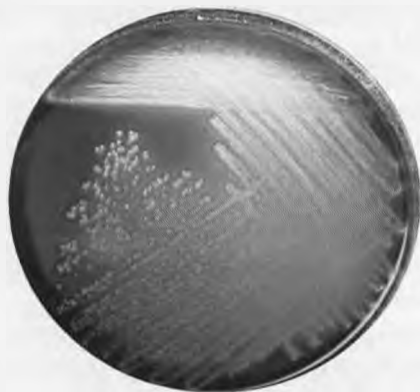


Рис. 14.8. Альфа-гемолиз (позеленение) вокруг колоний *Streptococcus pneumoniae*

Антигенная структура. У стрептококков имеется О-соматический полисахаридный антиген, который позволяет разделить стрептококки на 20 серогрупп. Ведущую роль в патологии животных и человека играют серогруппы – А, В, С, D, Е, F и Z. У отдельных видов (*Str. pneumoniae*, *Str. equi* и др.) выявляется капсульный антиген.

Устойчивость. Стрептококки не теряют жизнеспособности в навозе, почве, помещениях в течение 3–4 нед. При нагревании культур до 85 °С гибнут через 30 мин. Дезрастворы формалина (1%-й), щелочей (2%-е), взвесь свежегашеной извести (10%-я) приводит бактерии к гибели в течение 1–2 мин.

Биохимические свойства. Патогенные стрептококки биохимически малоактивны. Наиболее активен маститный стрептококк. Он ферментирует глюкозу, сахарозу, мальтозу, салицин, свертывает молоко, в отличие от стафилококков не ферментирует маннит. Некоторые штаммы стрептококков способны ферментировать раффинозу, трегалозу, инулин и непостоянно салицин.

Патогенность. Факторами патогенности у стрептококков являются токсины (гемолизин, лейкоцидин, некротоксин), ферменты (фибринолизин, гиалуронидаза) и эндотоксин (обуславливает аллергические реакции). Некоторые патогенные стрептококки продуцируют нефротоксин, дезоксирибонуклеазу, нейраминидазу, амилазу, лигазу и другие ферменты патогенности.

Стрептококки, как и стафилококки, заселяют слизистые оболочки, кожу у животных и человека и проявляют свою патогенность

при снижении резистентности животного или отдельных тканей (при травме, ожоге и т. п.).

Стрептококки могут вызывать болезнь у лошадей, крупного рогатого скота, овец, коз, собак, кошек, пушных зверей, многих видов птиц и рыб. В зависимости от вызываемой бактериями патологии стрептококкозы подразделяют на возбудителей специфических инфекций (мыта у лошадей и других цельнокопытных животных в возрасте от 6 мес. до 1–2 лет, инфекционного мастита у коров, стрептококкозов сельскохозяйственных животных, диплококковой септицемии) и возбудителей гнойно-воспалительных процессов.

Чаще всего инфекционную патологию у животных вызывают:

Str. pyogenes – возбудитель различных нагноительных процессов;

Str. agalactiae – возбудитель мастита коров;

Str. equi subsp. equi – возбудитель мыта лошадей;

Str. pneumoniae – возбудитель пневмококковой инфекции телят, поросят, ягнят, жеребят, козлят;

Str. equi subsp. zooepidemicus – возбудитель стрептококковой септицемии птиц;

Ent. faecalis и *Ent. faecium* – энтерококковой инфекции (гастроэнтеритов, менингитов, артритов поросят и телят, септицемии у кур, маститов коров, инфекций мочевого тракта у собак, эндокардитов у ягнят и крупного рогатого скота).

Данные микроорганизмы часто осложняют вирусные и бактериальные инфекции.

Мыт лошадей – болезнь, характеризующаяся катарально-гнойным воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей, глотки, подчелюстных лимфоузлов (клинически проявляется образованием абсцессов, истечением из носа, рис. 14.9).



Рис. 14.9. Клиническое проявление мыта

Стрептококкоз – различают острое, подострое и хроническое течение. Острое и подострое течение болезни наблюдают у молодняка сельскохозяйственных животных. Оно характеризуется повышением температуры, угнетением, нарушением координации движений, отеками, артритами, диареей. У взрослых животных стрептококкоз протекает преимущественно бессимптомно, но у беременных может сопровождаться абортными, а у абортированных и принесших приплод животных – метритами и маститами. От сельскохозяйственных животных выделяют стрептококки серогрупп А, В, С, D, Е, М, L, O, R, S, а наиболее часто серогрупп С и D (энтерококки).

Диплококковая септицемия – у молодняка различают септическую, легочную, суставную и смешанную формы болезни. У взрослых животных пневмококковая инфекция проявляется гнойно-катаральным эндометритом, гнойно-катаральным или фибринозным маститом с острым или хроническим течением.

Патогенез. Стрептококки проникают в организм животных через поврежденную кожу, слизистые оболочки желудочно-кишечного и полового трактов и вызывают гнойно-воспалительные процессы. Эндотоксины могут разрушать эндотелий сосудов, в результате чего происходят выход эритроцитов в ткани (диапедез) и, как следствие, обильные кровоизлияния на серозных покровах и слизистых оболочках.

Лабораторная диагностика. Включает микроскопическое, бактериологическое и биологическое исследование.

Материал для исследования: головной и костный мозг, кровь из сердца, кусочки селезенки, печени, легкого, суставная жидкость, головной мозг и кровь из сердца абортированного плода, при мастите – секрет из пораженных долей вымени, истечения из шейки матки при метрите.

При микроскопии препаратов необходимо иметь в виду, что бактерии из тканей и суставной жидкости нередко расположены кучками, из гноя – в виде цепочек различной длины, из крови сердца – одиночно, попарно, короткими цепочками. Однако микроскопия имеет ориентировочное значение, тем более при лечении больных антибактериальными препаратами наблюдается полиморфизм бактерий.

При необходимости дифференцировать стрептококки используют следующие тесты: определяют гемолитические свойства; устойчивость к желчи; терморезистентность; редукцию метиленового синего; рост на среде с 10 % NaCl; рост на среде с 0,07 % теллурита калия; чувствительность к оптохину; каталазную пробу.

Устойчивость к желчи — культуру стрептококков выращивают в МПБ с содержанием 40 % желчи 24 ч. Просветление бульона, т. е. отсутствие роста, указывает на лизис бактерий, помутнение — на рост.

Терморезистентность — бульонную культуру прогревают при 60 °С 30 мин, затем помещают в термостат на 24–48 ч. Наличие последующего роста при 37 °С указывает на терморезистентность бактерий.

Редукция метиленового синего — культуру стрептококков засевают в пробирку с молоком, содержащим индикатор в концентрации 1:1000, и помещают в термостат на 24 ч. Стрептококки способны обесцветить метиленовый синий.

Рост на среде с NaCl — стрептококки, в отличие от стафилококков, в МПБ с 10 % NaCl не растут.

Рост на среде с теллуридом калия — патогенные *Ent. faecalis* растут на поверхности МПА в присутствии 0,07 % теллурида калия, образуя колонии черного цвета, а облигатные *Ent. faecium* — не растут.

Каталазная проба — в каплю свежеприготовленного 3%-го раствора водорода пероксид вносят культуру стрептококков. Бактерии не вызывают пенообразования, так как не образуют каталазу.

Оптохиновый тест — чистую культуру засевают на агар, содержащий 1:50 000 — 1:100 000 оптохина. Посевы помещают в термостат на сутки. Стрептококки не растут в присутствии оптохина, можно использовать диски, пропитанные оптохином, которые накладывают на поверхность среды после посева. У стрептококков образуется зона задержки роста диаметром не менее 18 мм.

Определение патогенных свойств чистых культур стрептококков проводят на белых мышах массой 14–16 г. Для заражения используют только свежeweделенные культуры стрептококков 18–20-часового роста на глюкозосывороточном бульоне.

Культуру стрептококков вводят трем белым мышам внутрибрюшинно в дозе 0,5 см³. При заражении патогенной культурой белые мыши гибнут, как правило, через 1–2 сут. Наблюдение за подопытными животными ведут в течение 5 сут.

Культуру признают патогенной при гибели не менее двух белых мышей. Из спинного мозга, крови сердца, печени и селезенки каждой павшей мыши делают посевы на глюкозокровяной агар и глюкозо-сывороточный бульон для выделения исходной культуры.

Диагноз на стрептококкоз считают установленным в случае выделения из патологического материала культуры стрептококков, патогенной для белых мышей.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Животные, переболевшие мытом, приобретают стойкий иммунитет. После перенесения стрептококкоза у молодняка формируется активный иммунитет продолжительностью до 1 года, но животные длительное время остаются бактерионосителями. Для специфической профилактики стрептококкоза (диплококковой септицемии) телят, ягнят, поросят применяют вакцину против энтерококковой инфекции телят, ягнят и поросят; вакцину против пастереллеза, паратифа и диплококковой септицемии поросят; вакцину, депонированную против стрептококкоза свиней серогрупп С и D, а также формолгидроокисьалюминиевую вакцину против стрептококкоза крупного рогатого скота. Для профилактики стрептококкоза жеребят применяют убитую бета-пропиолактоном ГОА-вакцину из *S. equi* или концентрированный очищенный экстракт М-протеина *S. equi*.

В качестве специфического лечебного препарата используют сыпуротку против диплококковой инфекции телят, ягнят и поросят.

Глава 15 ЭНТЕРОБАКТЕРИИ

15.1. Общая характеристика энтеробактерий

Энтеробактерии (от гр. *entero* – кишечник) своим названием обязаны тому, что большинство их видов является постоянным обитателем кишечного тракта позвоночных.

Энтеробактерии широко распространены в природе. Средой обитания энтеробактерий являются почва, вода, кишечник млекопитающих. Их обнаруживают в продуктах питания, в кормах для животных. Они являются одним из основных компонентов кишечной микробиоты человека и животных. Среди них имеются патогенные, условно-патогенные и сапротрофы. Патогенные и условно-патогенные энтеробактерии могут вызывать у животных и человека болезни, различающиеся по клиническим признакам и формам течения.

Энтеробактерий относят к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Gamma proteobacteria*, порядку *Enterobacteriales*, семейству *Enterobacteriaceae*, включающему 43 рода (Справочник Берджи. 2005. Т. 2).

За последние годы состав семейства *Enterobacteriaceae* существенно расширился. Так, семейство *Enterobacteriaceae* включает 47 родов: *Arsenophonus*, *Biostraticola*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Cedecea*, *Cronobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Gibbsiella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Mangrovibacter*, *Moellerella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Saccharobacter*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia*, *Shigella*, *Shimwellia*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Thorsellia*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, *Yokenella*.

Семейство *Enterobacteriaceae* – это грамотрицательные тонкие палочки шириной 0,3–1,0 мкм и длиной от 0,6–1,0 до 3–6 мкм, подвижные перитрихи (кроме *Tatumella*) или неподвижные бактерии. Они не образуют эндоспор или микроцист, не кислотоустойчивы, капсул не формируют, за исключением отдельных сероваров. Растут в присутствии кислорода или без него. Хорошо развиваются в пептонных и мясных средах, обычно на среде МакКонки. Некоторые используют D-глюкозу как единственный источник углерода; другие требуют в качестве добавок витамины и (или) аминокислоты. Питание осуществляют за счет органических соединений; механизм метаболизма дыхательный и ферментативный; не являются галлофилами. При ферментации D-глюкозы, других углеводов и многоатомных спиртов продуцируют кислоты и газ.

Представители семейства каталазоположительны, за исключением *Shigella dysenteriae* серовара 1 и *Xenorhabdus nematophila*, оксидазонегативны (за исключением бактерий вида *Plesiomonas shigelloides*, которые продуцируют оксидазу). Нитраты редуцируют в нитриты, за исключением некоторых штаммов *Erwinia* и *Yersinia*. Ферментативные реакции положены в основу дифференциации энтеробактерий на роды, виды и подвиды.

Два представителя энтеробактерий – *E. coli* и *K. pneumoniae* – входят в число бактерий, являющихся индикаторами развития резистентности к антимикробным препаратам.

Концентрация нуклеотидов Г+Ц в ДНК 38–60 моль/л ДНК видов, принадлежащих к большинству родов, родственны между собой не более чем на 20 %. Такая же степень родства наблюдается и к

E. coli — типовому виду всего семейства. Исключения составляют некоторые виды *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, ДНК которых имеют 10–20 % родства с ДНК видов, принадлежащих к другим родам. Все изученные виды содержат энтеробактериальный общий антиген (СА), кроме *Dickeya chrysanthemi* (до реклассификации — *Erwinia chrysanthemi*).

Чаще всего инфекционную патологию у животных вызывают бактерии родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Yersinia*, значительно реже — гиперобактерии родов *Citobacter*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Providencia*, *Morganella*, *Hafnia*, *Edwardsiella*.

К новым и редким родам энтеробактерий относятся: *Budvicia*, *Buttiaxella*, *Cedecia*, *Ewingella*, *Kluuyvera*, *Koserella*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Obesumbacteria*, *Pragia*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Rahnella*, *Iatumella*, *Trabusiella*, *Xenorhabdus*, *Yokenella*. Роль этих микроорганизмов как оппортунистических патогенов возможна у иммунокомпрометированных индивидов.

15.2. Возбудитель колибактериоза

Колібактеріоз (эшерихиоз) — инфекционная болезнь в основном молодняка разных видов животных, характеризующаяся диареей, обезвоживанием организма, депрессией, нарастающей слабостью, интоксикацией, смертельным исходом. У взрослых животных эшерихии могут вызывать аборты и артриты.

Возбудитель колибактериоза — кишечная палочка, впервые выделена в 1885 г. Т. Эшерихом из фекалий больного ребенка. Кишечную палочку относят к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichia*. Согласно Справочнику Берджи род представлен пятью видами: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, впоследствии был идентифицирован еще новый вид — *Escherichia albertii*. Основную роль в инфекционной патологии играет вид *E. coli*. Вид включает условно-патогенные кишечные палочки, которые являются постоянными обитателями кишечника человека, животных, птиц, рыб. *E. coli* как нормальный обитатель кишечника синтезирует витамины К, В, Е и др., является антагонистом патогенных бактерий (выделяет колицины), участвует в пищеварении, стимулирует иммунитет. При подавлении *E. coli* антибиотиками и другими антисептиками развивается дисбактериоз.

E. coli – санитарно-показательный микроорганизм, обнаружение его в воде, кормах, пищевых продуктах указывает на их фекальное загрязнение. Кишечную палочку применяют в генной инженерии как реципиента генов человека, ответственных за образование препаратов, необходимых в медицине и биотехнологии (интерлейкины, инсулин и др.).

Морфология. *E. coli* – это полиморфные палочки с закругленными концами шириной 0,3–0,6 мкм, длиной 1–3 мкм. В препаратах они располагаются беспорядочно; грамотрицательные, не образуют спор, капсул, за исключением отдельных сероваров, например O8, O9, O101, подвижны, но встречаются и неподвижные варианты. Кроме жгутиков, некоторые штаммы имеют ворсинки или фимбрии (пили) (рис. 15.1).



Рис. 15.1. *Escherichia coli* в мазке из культуры, окраска по Граму

Культуральные свойства. *E. coli* хорошо растет на обычных питательных средах: МПБ, МПА, МПЖ, МППЖА и дифференциально-диагностических: Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфитном агаре. Оптимальная температура роста 37–38 °С, рН сред 7,2–7,4. Несмотря на это, *E. coli* может развиваться как при более низкой (15 °С), так и более высокой (46 °С) температуре, а также в кислой и щелочной средах.

Для выявления эшерихий, имеющих адгезивные антигены K99, F18 и F41, применяют 2%-й агар Минка (4 % агар-агара в фосфатно-буферном растворе с добавлением микроэлементов, глюкозы, дрожжевого экстракта и гидролизата казеина), а для выявления гемолитических свойств – кровяной агар.

Для изоляции и идентификации *E. coli* серовара O157:H7 и некоторых других используют селективную среду с сорбитолом (сорбитом).

На указанной среде эшерихии данной серогруппы образуют колонии серовато-белого цвета; колонии других серологических групп красно-малинового цвета.

В МПБ кишечная палочка интенсивно растет, вызывая его помутнение с образованием осадка, который легко разбивается при встряхивании пробирки. На поверхности бульона может образовываться пленка или пристеночное кольцо.

На МПА через 24 ч появляются сочные, круглые, выпуклые, с ровными краями и гладкой поверхностью (S-форма) серо-белого цвета колонии диаметром 2–3 мм. Колонии в R-форме плоские, имеют неровные края.

Среды Эндо, Левина и Плоскирева используют для первичной дифференциации энтеробактерий по способности ферментировать углевод лактозу. На среде Эндо лактозопозитивные штаммы *E. coli* образует два типа колоний – темно-вишневые с металлическим блеском и малиново-красные с розовым ободком, диаметром 0,3–0,5 см. На среде Плоскирева – колонии розового цвета, среде Левина – темно-фиолетового цвета. Лактозонегативные штаммы кишечной палочки на данных средах формируют колонии серо-розового цвета. На висмут-сульфитном агаре колонии *E. coli* серо-белого цвета.

В МПЖ наблюдают рост по месту укола в виде серо-белого стержня, разжижение среды не наступает. В полужидком агаре подвижные бактерии растут по всей массе агара, неподвижные – по месту укола в виде серо-белого стержня.

Биохимические свойства. *E. coli* ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, маннит, не изменяет адонин и инозит, образует индол, не образует сероводород, не растет на среде Симмонса, не расщепляет мочевины. Кишечная палочка дает положительную реакцию с метиловым красным (розовое окрашивание – рН ниже 5,0, что регистрируется при добавлении в среду Кларка с выращенной культурой раствора метилрота) и отрицательную Фогеса–Проскауэра (желтый цвет культуры – отсутствие образования ацетилметилкарбинола из глюкозы, что регистрируется добавлением в данную питательную среду калия гидроксида и альфа-нафтола). Наиболее важным отличительным признаком *E. coli* от других представителей семейства является ее способность ферментировать лактозу (за исключением отдельных лактозонегативных штаммов). *E. coli* как возбудитель отечной болезни поросят на кровяном агаре дает бесцветную зону гемолиза.

Для обнаружения расщепления мочевины используют среду с мочевиной (по Кристенсену): при ее расщеплении среда приобретает малиновый цвет, при отсутствии расщепления мочевины она окрашивается в желтый цвет.

Бактерии, способные усваивать цитрато-аммонийные соли, дают рост на агаре Симмонса с изменением его в синий цвет. При отсутствии указанного свойства роста культуры не происходит и цвет среды не изменяется.

При использовании реактива Эрлиха к двухсуточной культуре бактерий, выращенной в любой из сред для определения индола, добавляют 0,5 см³ реактива, пробирку встряхивают и через 1–2 мин учитывают результаты. При образовании индола верхний слой жидкости приобретает розовый цвет, при отрицательной реакции – желтый.

В случае образования индола при применении реактива Ковача верхний слой жидкости окрашивается в красный цвет, при отрицательной реакции – в желтый цвет. Индикаторная бумажка, пропитанная насыщенным (12%-м) водным раствором щавелевой кислоты, в положительных случаях окрашивается в розовый цвет.

При изучении ферментативных свойств на агаре Клиглера и трехсахарном агаре с мочевиной по Олькеницкому для посева используют агаровую культуру бактерий, которую засевают бактериологической петлей вначале на поверхность скошенной части среды (косяка), затем уколом в столбик. Засеянные пробирки инкубируют при 37–38 °С в течение 24–48 ч. На ферментацию лактозы в среде Клиглера и Олькеницкого указывает появление желтой окраски в скошенной части агара, а на ферментацию глюкозы – аналогичный цвет столбика. В культурах, ферментирующих лактозу и сахарозу, вся среда (столбик и косяк) приобретает желтый цвет. Газообразование устанавливают по наличию пузырьков в среде, разрывов агара или его отслоению от стенок пробирки. При образовании сероводорода происходит почернение среды в столбике, а при значительной его продукции – почернение всей среды. В случае гидролиза мочевины столбик и косяк среды окрашиваются в малиновый цвет.

Антигенная структура. *E. coli* имеют сложную антигенную структуру. Различают О-антиген, соматический; К-антиген, поверхностный, капсульный; Н-антиген (жгутиковый), содержащийся у подвижных штаммов; адгезивный антиген, состоящий из пилей или фимбрий.

Сочетание О-, К- и Н-антигенов характеризует серологический вариант (серовар) бактерий. Антигенное строение эшерихий приня-

то выражать формулой, за буквенным обозначением каждого антигена идут цифры, отделяемые двоеточием, например: O55:K59 /В/:Н6; O111:В5:Н10.

По O-антигену определяют принадлежность к серогруппам. Известно 180 серогрупп. У различных серогрупп обнаружено 104 разновидности поверхностных K-антигенов и 56 жгутиковых H-антигенов. Известно более 9000 серологических вариантов эшерихий по O-, K- и H-антигенам.

O-антиген — термостабильный липополисахаридно-белковый комплекс. Белковый компонент ответствен за иммуногенные, липидный — за эндотоксические свойства, а полисахаридный — за серологическую специфичность O-антигена.

K-антиген — полисахаридной природы и включает группу поверхностных антигенов трех видов — L, В и А. L и В-антигены термостабильные, разрушаются при 100 °С в течение 1 ч. А-антиген термостабильный, разрушается при автоклавировании (121 °С) в течение двух часов, содержится у бактерий некоторых серологических групп (O8, O9, O101 и др.). Поверхностные (L, В и А) антигены препятствуют агглютинации бактерий соответствующей агглютинирующей O-сывороткой, по этой причине при серогрупповой типизации культур эшерихий, их подвергают термической обработке: прогреванию в водяной бане или автоклавированию.

H-антиген эшерихий белковой природы и в отличие от O- и K-антигенов относится к типоспецифическим, термолabileм.

Антигенными свойствами обладает выделяемый эшерихиями термолabileмный экзотоксин. Кроме токсинов патогенетическим фактором возбудителя являются антигены фимбрий (пилей), состоящих из белка пилина и обеспечивающих прикрепление к эпителию кишечника, вследствие чего их называют адгезивными антигенами. К адгезивным антигенам относят K88, K99, 987P, A20, F18, F41, Att25 и др.

Патогенные эшерихии одних и тех же серогрупп могут вызывать болезни у животных разных видов и человека.

Биологическая промышленность выпускает O- и H-диагностические колисыворотки, антиадгезивные колисыворотки (комплексные и моновалентные) для серологической типизации эшерихий.

Устойчивость. Эшерихии устойчивы к воздействию факторов внешней среды. В фекалиях и слизи бактерии выживают до 30 сут, в почве и воде — до нескольких месяцев. К высокой температуре бактерии неустойчивы. При 100 °С погибают моментально, при 80 °С — за 15 мин.

Губительно действуют на эшерихий 4%-й горячий раствор гидроксида натрия или калия, 5%-я эмульсия ксилонафта, 10%-я эмульсия дезинфекционного креолина, 10%-я взвесь свежегашеной извести, осветленный раствор хлорной извести, содержащий 3 % активного хлора, и др.

Патогенность. Факторами патогенности эшерихий являются энтеротоксин, эндотоксин, адгезия, колицины.

Колицины — это антибиотикоподобные вещества, которые продуцируют некоторые эшерихии, они подавляют рост и размножение филогенетически родственных бактерий. Их наличие — стойкий наследственный признак, обусловленный внехромосомными генетическими детерминантами, так называемыми колициногенными факторами или плазмидами колициногенности. Доказана возможность передачи плазмиды колициногенности другим видам бактерий при конъюгации. Колициногенные культуры обладают более высокой патогенностью.

E. coli патогенна для многих видов животных, особенно для молодняка. Телята восприимчивы к инфекции в первые часы и дни после рождения. Поросята болеют как в период новорожденности, так и после отъема. Ягнята восприимчивы с первых дней после рождения до 5–6-месячного возраста. Птица поражается в первые 2–4 мес. *E. coli* может поражать эмбрионы птиц.

Источник возбудителя — больные и переболевшие животные — бактерионосители. Заражение происходит алиментарным путем, реже — аэрогенным.

E. coli может быть причиной эндометрита, мастита, цистита, абсцессов и даже сепсиса у взрослых животных.

Основную роль в развитии колидиареи новорожденных телят, поросят и ягнят играют энтеротоксигенные штаммы эшерихий с адгезивными антигенами K88, K99, 987P, F41, F18, A20. За счет адгезивных антигенов происходит прикрепление бактерий к эпителиальным клеткам ворсинок тонкого отдела кишечника и интенсивное их размножение (колонизация), приводящие к развитию воспалительного процесса и гибели клеток с последующим проникновением эшерихий в регионарные лимфатические узлы, а иногда и кровоток.

Отечную болезнь поросят обуславливают эшерихии, продуцирующие вероцитотоксин VT2 и образующие адгезивный антиген F18a,b; в преобладающем большинстве случаев эти бактерии обладают гемолитическими свойствами. При колиэнтеротоксемии (отечной болезни),

вызываемой бета-гемолитическими разновидностями эшерихий (серогрупп О9, О15, О18, О26, О138, О139, О140, О141), болеют преимущественно поросята-отъемыши с поражением центральной нервной системы и появлением отеков в различных органах и тканях.

Диарею животных с признаками геморрагического гастроэнтерита вызывают эшерихии серологических вариантов О157:Н7 и некоторых других. Медицинские специалисты к энтерогеморрагическим штаммам *E. coli* относят О26:Н11; О103:Н2; О104:Н21; О113:Н21; О157:Н7; О104:Н4 и др. Известно около 150 различных серотипов *E. coli*, способных продуцировать шига-токсины. Бактерии выделяют не только из клинического материала, отобранного от больных людей, а также из продуктов животного и растительного происхождения.

Энтерогеморрагические эшерихии (ЕНЕС – от англ. *enterohemorrhagic E. coli*) выделяют цитотоксин, вызывающий гибель клеток; его образование кодирует ген, переносимый бактериофагом. Практически все ЕНЕС образуют шигаподобный токсин 1 (веротоксин), аналогичный токсину *Shigella dysenteriae* типа 1, а большинство – шигаподобный токсин 2 (веротоксин 2, цитоксин), которые обуславливают дизентериеподобную диарею и отечный синдром. Встречаются штаммы, выделяющие оба токсина в совокупности.

Патогенез. Колибактериоз может протекать в септической, энтеротоксемической и энтеритной форме. При септической форме возбудитель быстро проникает в кровь, размножается, распространяется, вызывает гибель в течение нескольких часов, суток. Септическую форму колибактериоза вызывают штаммы эшерихий, не обладающие адгезивными антигенами. Вирулентность этих штаммов зависит от наличия капсульных антигенов, обеспечивающих проникновение бактерий в лимфатическую систему, а затем в кровь и органы, где они хорошо размножаются при недостатке в организме иммуноглобулинов. Образовавшийся эндотоксин после гибели *E. coli* приводит к шоку животного (слабость, сосудистый коллапс). Смерть наступает в результате поражения центральной нервной системы. Септическая форма характеризуется сверхострым и острым течением с высокой летальностью.

При энтеротоксемической форме возбудитель проникает в кишечник, брыжеечные лимфоузлы, вызывает воспаление в органах и тканях, токсикоз. Энтеротоксемическая форма болезни обусловлена энтеротоксигенными эшерихиями, которые прикрепляются с помощью адгезивных антигенов фимбрий к поверхности энтероцитов тонкого кишечника, размножаются и продуцируют энтеротоксины.

При накоплении энтеротоксинов повышается активность кишечной гуанилциклазы, что обуславливает гиперсекрецию жидкости и электролитов в просвет кишечника, возникает диарея, развивается токсикоз.

При энтеритной форме поражаются желудочно-кишечный тракт, лимфоузлы. Энтеритная форма болезни связана с внедрением в организм инвазивных форм эшерихий, обладающих слабой подвижностью и не имеющих адгезивных антигенов. Такие бактерии проникают в слизистую оболочку тонких кишок, размножаются, при их разрушении образуются эндотоксины, которые вызывают диарею.

У молодняка птиц колибактериоз протекает преимущественно в септической, а у взрослых – в хронической формах.

Лабораторная диагностика. Колибактериоз диагностируется микроскопическим, бактериологическим, серологическим и биологическим методами.

Материалом для исследования служат трупы павших животных (поросята, ягнята, птица) или убитых с диагностической целью. В лабораторию направляют долю печени с желчным пузырем, сердце с перевязанными сосудами, селезенку, пораженный участок тонкой кишки, перевязанной с двух концов, лимфоузлы, голову, трубчатую кость, при жизни – фекалии.

Биологическое исследование проводят на трех белых мышах массой по 14–16 г или на трех цыплятах 3–4-недельного возраста (при исследовании материала от птиц) путем внутрибрюшинной инъекции 0,5 см³ смыва с агаровой культуры в концентрации 1 млрд микробных клеток/см³.

Серологическое исследование проводят в реакции агглютинации на стекле с групповыми и моновалентными O-колизыворотками, а затем в пробирочной реакции с каждой сывороткой, давшей положительную реакцию агглютинации на стекле.

Лабораторный диагноз считают установленным при выделении:

чистых культур не менее чем из двух нижеуказанных органов и тканей: селезенка, кровь, сердце, костный и головной мозг свежего трупа животного без определения их патогенности для белых мышей или цыплят и установления серогрупповой принадлежности;

из исследуемого материала культур эшерихий с одним, двумя и более гипами адгезивных антигенов: K88, K99, 987P, F41, F18, A20;

из патологического материала культур эшерихий, относящихся к патогенным серогруппам или обладающих патогенностью для белых мышей или цыплят.

Энзоотические вспышки колибактериоза наиболее часто вызывают патогенные штаммы эшерихий следующих серогрупп: у телят – O8, O9, O15, O20, O26, O35, O78, O86, O101, O115, O117, O119, O141, реже O2, O33, O41, O55, O103, O127, O137; у поросят – O8, O26, O33, O101, O136, O139, O141, O142, O149, O351, O157; у ягнят – O4, O8, O9, O15, O20, O26, O35, O41, O78, O101, O137; у птиц – O1, O2, O8, O15, O18, O26, O35, O78, O111, O113, O28, O141;

культур эшерихий от поросят-отъемышей, погибших с признаками отечной болезни, из содержимого тонкого отдела кишечника или брыжеечных лимфатических узлов, обладающих гемолитическими свойствами.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. У новорожденных животных факторы естественной защиты развиты слабо, поэтому в неблагополучных хозяйствах с целью создания колострального иммунитета вакцинируют стельных коров, супоросных свиноматок, суягных овец. С этой целью ОАО «БелВигунифарм» готовит поливалентную вакцину против колибактериоза (эшерихиоза) телят, поросят, ягнят. Препарат представляет собой взвесь инактивированных эшерихий разных серологических групп, наиболее часто поражающих упомянутых животных.

15.3. Возбудители сальмонеллезов

Сальмонеллез – полиэтиологическая инфекционная болезнь с фекально-оральным механизмом передачи, вызываемая бактериями рода *Salmonella*, характеризующаяся разнообразными клиническими проявлениями – повышением температуры тела, энтеритом, бронхопневмонией, артритами, коликами, параличами, абортами.

Сальмонеллезом болеет преимущественно молодняк сельскохозяйственных животных – телята, поросята, ягнята, жеребята, щенки пушных зверей, цыплята, гусята, индюшата и т. д.

Болеет сальмонеллезом и человек. Болезнь у человека проявляется в виде пищевых токсикоинфекций. Резервуаром сальмонелл, представляющим опасность для инфицирования людей, является домашняя птица.

Источники возбудителя инфекции – больные и переболевшие животные-сальмонеллоносители, включая грызунов и диких птиц. Факторами передачи возбудителя являются обсемененные (контами-

нированные) корма, подстилка, предметы ухода за животными. У птиц возможна трансвариальная передача сальмонелл.

В 1885 г. американские ветврачи Д. Сальмон и Т. Смит выделили из трупов свиней, павших от чумы, представителя обширной группы сальмонелл, которого они ошибочно приняли за возбудителя чумы и назвали *Bact. suipestifer*.

В 1888 г. Г. Гертнер при отравлении людей обнаружил один и тот же микроб в мясе коровы и селезенке умершего человека, употреблявшего мясо этой коровы. Он был назван *Bact. enteridis*. В 1892 г. Ф. Леффлер выделил микроб от павших мышей, который получил название *Bact. typhimurium*.

В честь Д. Сальмона Международное общество микробиологов в 1934 г. рекомендовало именовать бактерии, выделенные им и Т. Смитом сальмонеллами, а болезни, вызываемые ими – сальмонеллезами.

Сальмонелл относят к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Salmonella*.

Род состоит из двух видов: *S. enterica* и *S. bongori*. Вид *S. enterica* по фенотипическим и генотипическим критериям разделен на шесть подвидов: *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*, *salamae*. Многие сероварианты внутри подвида *S. enterica subsp. enterica* имеют названия (например, *S. enterica subsp. enterica serovar choleraesuis*, *S. enterica subsp. enterica serovar enteritidis* и др.).

Род объединяет около 2400 сероваров, разделенных по набору соматических антигенов на 52 серологические группы. (Международный сальмонеллезный центр ежегодно регистрирует 15–20 новых серотипов.)

Однако возбудителями сальмонеллеза у животных являются сальмонеллы сравнительно немногих сероваров, адаптировавшихся в ходе эволюции к организму животных определенных видов. Основные возбудители сальмонеллеза животных относятся к серогруппам В, С, D, которые входят в состав вида *enterica*.

Морфология. Сальмонеллы – палочки с закругленными концами, длиной 2–5 мкм, шириной 0,7–1,5 мкм, грамотрицательны, спор и капсул не образуют, некоторые сероварианты формируют микрокапсулу, подвижны (за исключением *S. enterica enterica serovar Gallinarum*), перитрихи (рис. 15.2, 15.3), в старых культурах встречаются нитевидные формы, иногда в виде стрептобактерий и коккобактерий, хорошо окрашиваются всеми анилиновыми красками.

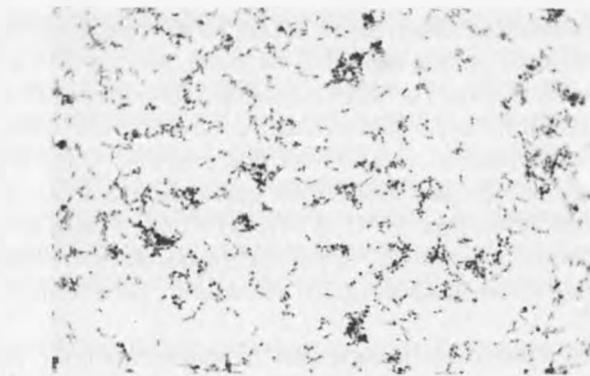


Рис. 15.2. *Salmonella* в мазке из культуры, окраска по Граму



Рис. 15.3. Бактерия рода *Salmonella*. Жгутики расположены по всей поверхности клетки (перитрих)

Среди сальмонелл могут быть неподвижные мутанты. Подвижность, как правило, выявляется в висячей капле бульонной культуры. Если у бактерий предполагают наличие жгутиков, а подвижность отсутствует, то нужно исследовать 6–8-часовые культуры, выращенные при комнатной температуре, или использовать конденсационную воду культур, выросших на скошенном агаре.

Сальмонеллы, выращенные на МПА, имеют меньшие размеры, чем выращенные в МПБ.

Культуральные свойства. Сальмонеллы – аэробы и факультативные анаэробы. Температурный оптимум 37 °С (могут расти при температуре от 3 до 45 °С); оптимальная реакция среды слабощелочная (рН 7,2–7,6, могут расти при рН 4,5–9,0). Хорошо растут в МПБ, на МПА, среде Эндо, Левина и др.

Бактерии вызывают помутнение МПБ, на дне пробирки через 18–20 ч роста образуется осадок серо-белого цвета, иногда тонкая пленка или пристеночное кольцо. На МПА сальмонеллы формируют колонии от 1 до 4 мм в диаметре серо-белого цвета с голубоватым оттенком.

Многие сероварианты сальмонелл при росте на МПА способны к валовообразованию. Для его выявления культуры высевают на МПА, растят в течение суток при 37 °С, а затем 1–2 сут – при комнатной температуре. Валик слизистый, круто поднимающийся, сильно преломляющий свет, при микроскопии наблюдают поперечную исчерченность.

Некоторые сероварианты образуют дочерние колонии, например *S. enterica enterica serovar Typhimurium*, а некоторые, например *S. enterica enterica serovar Abortusovis*, растут слабо, образуют мелкие колонии.

Кроме колоний в S-, R-форме, колонии могут быть в O-, D-, M-форме.

На среде Эндо колонии прозрачные розоватые; на среде Левина – прозрачные с голубоватым оттенком; на среде Плоскирева – бесцветные плотные, слегка мутноватые; на висмут-сульфитном агаре – черного цвета с металлическим блеском, при этом наблюдается окрашивание в черный цвет участка среды под колонией (рис. 15.4) (исключение составляют сероварианты *S. enterica enterica: paratyphi A, choleraesuis, abortusuis, gallinarum* и некоторые другие, образующие светло-зеленые колонии). Для выделения и идентификации сальмонелл предложен ряд питательных сред обогащения (селенитовая среда, селенитовый бульон с аминокептидом, магниевая среда, среда Мюллера, среда Кауфмана, среда Киллиана).

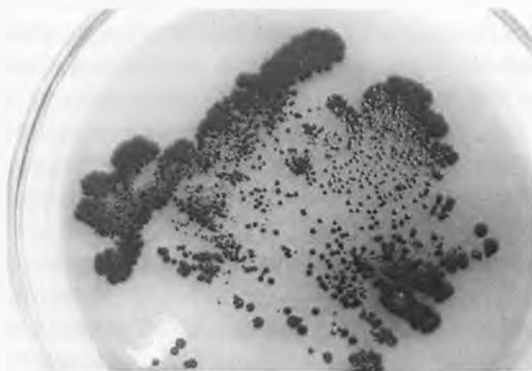


Рис. 15.4. Рост сальмонелл на висмут-сульфитном агаре

Биохимические свойства. Варьируют в зависимости от разных сероваров. Сальмонеллы не ферментируют сахарозу, лактозу, адонит, салицин, мочевины. Не образуют индол, но образуют сероводород. Глюкозу ферментируют все типы сальмонелл с выделением газа, однако встречаются штаммы *S. enterica enterica: typhimurium, dublin, anatum, gallinarum, derby, abortusequi*, разлагающие глюкозу без образования газа. Подавляющее большинство сальмонелл ферментируют маннит.

Сальмонеллы растут на среде Симмонса (т. е. усваивают цитрато-аммонийные соли), в МПБ, содержащем 40 % желчи крупного рогатого скота.

Большинство видов сальмонелл дают положительную реакцию с метиловым красным (среда окрашивается в розово-красный цвет), отрицательную реакцию Фогеса–Проскауэра (желтое окрашивание среды).

Антигенная структура. У сальмонелл различают О-антиген – соматический и Н-антиген жгутиковый. К числу соматических относят поверхностные или капсульные К-антигены, которые локализованы в субстанции, покрывающей стенку бактерий, микрокапсуле. В клеточной стенке имеется Vi-антиген, который назван антигеном вирулентности.

О-антиген представляет собой термостабильный фосфолипидо-полисахаридный комплекс.

Н-антиген содержит белок флагелин, термолабильный, разрушающийся при кипячении. Н-антиген может быть как специфическим для определенного вида и типа, так и неспецифическим.

Род сальмонелл объединяет более 2400 серовариантов, которые по О-антигену разделены на 52 группы. Насчитывают 14 основных серогрупп. Их обозначают прописными буквами латинского алфавита – А, В, С, D, Е и т. д.

Н-антиген разделяют на антигены 1-й фазы – специфические и антигены 2-й фазы – неспецифические; 1-я фаза обозначается строчными буквами латинского алфавита (a, b, c, d, e), 2-я – арабскими цифрами 1, 2, 3 и т. д. или латинскими буквами – a, b, c, d и т. д.

Во всех лабораториях мира используют диагностическую схему Кауфмана–Уайта, построенную на анализе трех основных антигенов – О, Н, Vi.

Биопромышленность готовит для микробиологической практики диагностические поли- и моновалентные О-сыворотки, монорецепторные Н-сыворотки, которые используют в реакциях агглютинации на стекле.

Устойчивость. Сальмонеллы устойчивы к неблагоприятным факторам внешней среды. В почве могут сохраняться от 30 до 270 дней, в трупях — до 100, в водоемах — 11–120 дней, в сухих экскрементах животных до нескольких лет, в замороженном мясе — 6–13 мес. Сальмонеллы могут оставаться жизнеспособными и выдерживать 5–6-кратное замораживание и оттаивание в течение 2–3 мес. В комбикорме, мясокостной муке не теряют своей жизнеспособности в течение года.

Патогенность. Сальмонеллы патогенны для всех видов сельскохозяйственных, домашних и промысловых животных, домашних и диких птиц. Болеет молодняк: телята — в возрасте от 10 дней до 2 мес., поросята — с первых дней жизни до 4 мес., ягнята — в первые дни жизни, жеребята — в первую неделю после рождения и до 3 мес., цыплята — до 15–18-дневного возраста. Из лабораторных животных наиболее восприимчивы к сальмонеллам белые мыши, морские свинки, кролики. Источником возбудителя являются больные и переболевшие животные. Заражение происходит через желудочно-кишечный тракт и органы дыхания.

Наиболее патогенными для крупного рогатого скота являются бактерии *S. dublin*, *S. typhimurium*, для свиней — *S. cholerae suis*, *S. typhimurium*, для овец — *S. abortusovis*, для лошадей — *S. abortus equi*, для песцов и лисиц — *S. dublin*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, для кур — *S. gallinarum*, *S. enteritidis*, для водоплавающей птицы — *S. typhimurium*.

Факторы патогенности у сальмонелл — экзо- и эндотоксин. Основной компонент эндотоксина — полисахарид, состоящий из полисахарида и липида А, который определяет токсичность всей молекулы.

Патогенез. Обычно сальмонеллы проникают в организм через ротовую полость, достигают тонкого отдела кишечника, проникают через ворсинки в глубокие слои слизистой оболочки, размножаются, проникают в лимфососуды, кровь, паренхиматозные органы, при распаде бактерий образуется эндотоксин, который вызывает кровоизлияния в органах и тканях, воспалительные, дистрофические, дегенеративные процессы. Больные животные выделяют сальмонелл с фекалиями, мочой, птицы — с пометом, яйцом.

Патогенные свойства сальмонелл более выражены, чем у *E. coli*, но в организме бактерионосителей они не проявляются, т. е. сальмонеллы — типичные условно-патогенные микроорганизмы.

Лабораторная диагностика. Для посмертной диагностики сальмонеллез в лабораторию направляют свежие трупы мелких животных и птиц, от трупов крупных животных — паренхиматозные органы или

часть их (печень с желчным пузырем и лимфатическими узлами, селезенку, почку), мезентеральные лимфатические узлы, трубчатую кость; при подозрении на хроническую форму от свиней, кроме того, направляют слепую кишку с содержимым, от телят — измененные участки легких; в случае аборта — свежий плод.

Для прижизненной диагностики в лабораторию направляют фекалии, кровь, истечения из матки при абортках, а для серологического исследования по реакции агглютинации — сыворотку крови.

Лабораторная диагностика включает микроскопию препаратов-мазков и препаратов-отпечатков из материала с помощью световой и люминесцентной микроскопии (РИФ), выделение чистой культуры возбудителя болезни и изучение его морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных, антигенных (с агглютинирующими поливалентными О-сыворотками и с монорецепторными О- и Н-сыворотками) и при необходимости патогенных свойств, фаготипирование.

Диагноз на сальмонеллез считают установленным при выделении из материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя сальмонеллеза, и последующем определении серовариантной принадлежности с помощью О-комплексных и О- и Н-монорецепторных агглютинирующих сывороток.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет преимущественно создается иммунизацией с использованием различных вакцин.

15.4. Возбудитель кишечного иерсиниоза

Иерсинии широко распространены в природе, хорошо приспособлены к сапротрофному образу жизни. Микробы обладают адгезивными свойствами, высокой инвазивностью и способностью противостоять фагоцитозу, неприхотливы к питательным средам, имеют высокую биохимическую активность.

Иерсинии способны вызывать у животных и человека инфекционные болезни под общим названием иерсиниозы. К иерсиниозам относят чуму, псевдотуберкулез, кишечный иерсиниоз.

Зооантропонозная чума — инфекционная болезнь животных (чаще перелюдов) и человека, относящаяся к группе особо опасных инфекций, характеризующаяся интоксикацией, поражением лимфатической системы, тенденцией к септицемии.

Впервые бактерии чумы открыли и выделили в чистой культуре в 1894 г. К. Сибасабуро и А. Йерсен во время эпидемии чумы в Гонконге. В честь А. Йерсена эти бактерии получили название «иерсинии». Детальное изучение возбудителя началось с 1934 г.

Псевдотуберкулез — природно-очаговая инфекционная болезнь, характеризующаяся интоксикацией, узелковым поражением внутренних органов (легкие, печень, селезенка, почки, лимфоузлы) и общей аллергической реакцией. Поражения в органах животных схожи с поражениями при туберкулезе, поэтому в 1885 г. К. Эберт предложил термин «псевдотуберкулез».

Кишечный иерсиниоз — инфекционная болезнь, характеризующаяся поражением органов пищеварения и диареей, а при тяжелом и осложненном течении — геморрагическим диатезом, дерматитами, артритами, маститами, абортами. У человека болезнь характеризуется поражением желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата, интоксикацией.

Иерсинии относятся к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Enterobacteriales*, семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Yersinia*.

Согласно Справочнику Берджи (2005. Т. 2) род включал 11 видов. Систематика иерсиний постоянно пересматривается и дополняется, и по состоянию на 2015 г. к данному роду относится 18 видов, в том числе *Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica* (*Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica*, *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica*), *Y. entomophaga*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, *Y. pestis*, *Y. philomiragia*, *Y. pseudotuberculosis* (*Y. pseudotuberculosis* subsp. *pestis*, *Y. pseudotuberculosis* subsp. *pseudotuberculosis*), *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. similis*. Из них только *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и некоторые штаммы *Y. enterocolitica* являются патогенными для теплокровных животных и человека.

Возбудителем кишечного иерсиниоза является *Y. enterocolitica*. Она является очень гетерогенным видом, объединяющим в себя штаммы с различными биохимическими и антигенными свойствами. Многие из представленных в роде *Yersinia* видов первоначально являлись биоцарами очень неоднородного вида *Y. enterocolitica*, однако при последующей реклассификации были выделены в качестве отдельных видов.

Морфология. *Y. enterocolitica* представляет собой палочковидные бактерии шириной 0,5–0,8 мкм, длиной 1–3 мкм (рис. 15.5). В поле

чения микроскопа они расположены одиночно, парами, иногда короткими цепочками. В препаратах из молодых культур могут иметь вид длинных нитей. Грамотрицательны, спор и капсул не образуют, могут окрашиваться биполярно, подвижны (перитрихи). Подвижность выражена в культурах, выращенных при 30 °С, и утрачивается у культур, выращенных при 37 °С.



Рис. 15.5. *Yersinia enterocolitica* в мазке из культуры, окраска по Граму

Культуральные свойства. *Y. enterocolitica* хорошо растет на обычных питательных средах. Для микроорганизма характерны некоторые особенности сапротрофного существования, поэтому оптимальный температурный оптимум лежит ниже температуры культивирования патогенных бактерий, т. е. в пределах 25–28 °С, оптимальное значение pH сред 7,2–7,4. Бактерии являются факультативными анаэробами и сапроорганотрофами.

При росте в МПБ вызывают равномерное помутнение среды с обильным осадком. На МПА возбудитель кишечного иерсиниоза образует колонии в S-форме в диаметре 0,1–0,5 мм, гладкие с ровным краем, прозрачные, с голубоватым оттенком. В старых культурах наблюдается незначительная диссоциация изолята в сторону образования R колоний, что совпадает в основном с потерей бактерией своей вирулентности.

На агаре Эндо 48-часовые культуры микроорганизма имеют розовый оттенок, часто приобретают более темное окрашивание по центру колонии (рис. 15.6), на среде Плоскирева – колонии с голубоватым оттенком, т. е. в обоих случаях *Y. enterocolitica* образуют типичные для лактозонегативных бактерий колонии; на висмут-сульфитной среде – мелкие колонии цвета среды, а крупные окрашены в коричневый цвет.

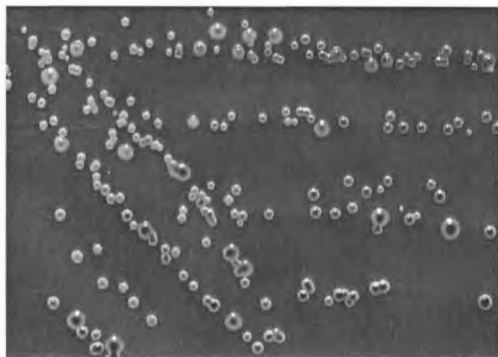


Рис. 15.6. Колонии *Yersinia enterocolitica* на среде Эндо

Биохимические свойства. *Y. enterocolitica* не ферментирует лактозу, оксидазонегативна, каталазопозитивна, ферментирует сахарозу, маннит, сорбит и мальтозу, не разлагает рамнозу, образует уреазу, не разжижает желатин, дает положительную реакцию Фогеса—Проскауэра.

Y. enterocolitica является очень неоднородным по биохимическим и культуральным свойствам видом, что дало основание выделить его шесть биотипов. Из них пять биотипов (обозначены 1В и 2–5) признаны патогенными для животных, у человека наиболее часто выделяют биотипы 2–4.

Антигенная структура. Она обусловлена сочетанием соматического О-антигена и жгутикового Н-антигена. Первый из них представляет собой липополисахарид, покрывает более 70 % поверхности бактериальной клетки и представлен несколькими серологическими разновидностями, благодаря чему *Y. enterocolitica* разделяют на серовары соответствующего обозначения: наибольшее эпизоотологическое значение имеют серовары О3, О9, О5.27, О8 и некоторые другие. Серовар *Y. enterocolitica* О9 имеет уникальное свойство антигенной идентичности с отдельными видами бруцелл, поэтому положительные серологические реакции на бруцеллез требуют исключения иерсиниозной инфекции у серопозитивных животных. У некоторых штаммов обнаружен К-антиген.

В отличие от О-антигена, Н-антиген имеет белковую природу и более сложную структуру, состоящую из нескольких субфакторов. Возможны его различные сочетания с О-антигеном, поэтому его идентификация имеет второстепенное значение.

Описаны 57 серовариантов по О-антигену и 19 вариантов по H-антигену. Полная идентификация патогенного штамма требует определения не только серотипа возбудителя, но и его биотипа, потому что некоторые штаммы могут содержать общий О-антиген.

Устойчивость. Возбудитель кишечного иерсиниоза, обладая свойствами сапротрофного микроорганизма, относительно устойчив во внешней среде, особенно к низким температурам и может размножаться при температуре 4 °С, что используется в методе так называемого «холодового обогащения», т. е. предварительного выдерживания исследуемого материала в холодильнике в течение 7–10 дней.

На бактерии губительно действуют 2%-й раствор натрия гидроксида, 2%-й раствор формальдегида, 2%-й раствор хлорной извести и другие дезрастворы. Указанные растворы вызывают гибель иерсиний в течение одного часа.

Патогенность. Вид *Y. enterocolitica* широко распространен в природе и обладает некоторой способностью к сапротрофному существованию. С большой частотой микроорганизм обнаруживают в кишечном тракте млекопитающих, птиц и хладнокровных животных, а также в объектах внешней среды (как сухопутных, так и водных). Тем не менее большинство экологических изолятов являются авирулентными. Наиболее часто патогенные для человека штаммы микроорганизма и колируют из кишечника свиней, в меньшей степени у кошек, собак и овец.

Клинической формой болезни могут болеть крупный рогатый скот, лошади, овцы, олени, свиньи, кролики, домашние животные — собаки, кошки, однако наиболее тяжело кишечным иерсиниозом болен человек. По данным официальной статистики микроорганизм *Y. enterocolitica* является шестым по частоте возбудителем инфекций желудочно-кишечного тракта после *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, интратоксикогенных *E. coli* и *Vibrio*.

Y. enterocolitica обладает полным набором факторов патогенности, придающих бактерии способность вызывать инвазивную инфекцию. Основные из них кодированы генами хромосом (факторы адгезии и интратоксин), остальные определяются генами плазмиды, обозначенной рYV. Фактор адгезии фактически представляет собой набор трех различных протеинов (Ail, YadA, инвазин), которые обеспечивают не только прикрепление бактерии к интестинальным клеткам, но и их распространение в ткани. Белок инвазин способствует прикреплению бактерии к рецепторам эпителиальных клеток кишечника.

Энтеротоксин является вторым по важности фактором патогенности и очень схож по действию с термостабильным энтеротоксином *E. coli*. Тем не менее он продуцируется бактерией только при температуре ниже 30 °С, поэтому его образование происходит только во внешней среде, например в хранящемся при низких температурах молоке, мясе и других продуктах питания и корме. Для лабораторного подтверждения присутствия термостабильного энтеротоксина *Y. enterocolitica* в материале предложен метод внутрижелудочного введения его экстракта подсосным мышам.

Дополнительные факторы патогенности кодируются генами плазмиды рYV, поэтому обнаруживаются только у вирулентных штаммов бактерии. Это в основном факторы резистентности к фагоцитозу нейтрофилами и опсонизации. О наличии плазмиды вирулентности рYV косвенно судят по феномену аутоагглютинации при 35–37 °С, подавлению роста культуры с низким содержанием ионов кальция, окрашиванию кристалвиолетом при 35–37 °С, резистентности к человеческой нормальной сыворотке и способности вызывать конъюнктивит у мышей и морских свинок (положительный тест Шереня). Однако исследованиями установлено, что полная экспрессия генов плазмиды вирулентности определяется отдельными хромосомными генами, т. е. в значительной степени зависит от сероварианта и штамма микроорганизма.

Источником иерсиний являются больные животные и бактерионосители. В естественных условиях возбудитель сохраняется благодаря циркуляции среди диких птиц, зайцев, крыс, мышей. Резервуаром инфекции могут быть крупный рогатый скот, овцы, свиньи, кролики. Заражение животных происходит чаще всего алиментарным путем.

Патогенез. Иерсинии вызывают воспаление желудочно-кишечного тракта, а при генерализации инфекции — лимфоузлов, внутренних органов, их дегенерацию и последующий сепсис.

После алиментарного заражения возбудитель первоначально инвазирует слизистую оболочку подвздошной кишки, после чего проникает в пейеровы бляшки, тесно связанные лимфатическими сосудами с брыжеечными лимфоузлами. Диссеминация бактерий по организму сопровождается в основном попаданием возбудителя в селезенку гематогенным или лимфогенным путем из пейеровых бляшек.

Лабораторная диагностика. Проводится с помощью микроскопического, бактериологического, биологического и серологического методов исследования.

Исследуемым материалом служат пробы фекалий, сыворотка крови, тонкий отдел кишечника с содержимым, брыжеечные лимфоузлы, миндалины, паренхиматозные органы. Трупы грызунов исследуются с целью изучения эпизоотической ситуации в хозяйстве.

Выделение микроорганизма производят на одной из дифференциально-диагностических сред для энтеробактерий (Эндо, Плоскирева). В случаях трудности выделения возбудителя непосредственно из фекалий, вызванных присутствием в них большого числа других энтеробактерий, проводят метод холодого обогащения, при котором пробы фекалий после добавления фосфатно-буферного раствора хранят в течение недели в холодильнике. Кроме того, рекомендуется использовать щелочной метод выделения, основанный на устойчивости микроорганизма к слабым растворам калия гидроксида. Для этого перед посевом на плотную питательную среду бактериологическую петлю на 2–3 с опускают в 0,1 мл 0,5%-го раствора КОН на изотоническом растворе.

Выделенные культуры идентифицируют по биохимическим свойствам. Подвижность бактерии определяют при двух температурных режимах – 37 и 22–24 °С.

Биопробу ставят на трех белых мышах. Их заражают орально или интубрибушинно в дозе 1 мл с концентрацией 10^8 микробных клеток. Срок наблюдения за мышами – 7 сут. Мыши обычно погибают в течение 3–4 сут.

Серологическое исследование заключается в постановке РНГА. Для постановки реакции исследуют сыворотку крови с промышленно выпускаемым эритроцитарным диагностикумом в отношении серовариантов О3 и О9.

Диагноз на иерсиниоз считают установленным в случае выделения из биоматериала культуры *Y. enterocolitica*, патогенной для белых мышей, а также в случае обнаружения антител в титре 1:200 и выше после многократного исследования сыворотки крови или четырехкратного и более нарастания титра антител при двукратном исследовании сыворотки крови в интервале 10 сут.

Иммунитет, средства для специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет при иерсиниозе животных изучен плохо. Специфических препаратов для профилактики болезни и лечения животных не предложено.

15.5. Возбудители протеоза

Протеоз — инфекционный процесс, обусловленный протеем, как нозологическая единица до сих пор остается неопределенным. Данный микроорганизм вызывает остро протекающую инфекционную болезнь молодняка всех видов животных, с признаками септицемии или профузного поноса, тяжелой интоксикацией и обезвоживанием организма, болезнь может сопровождаться менингитом и поражением мочевыводящих путей.

Патологоанатомические изменения у погибших животных имеют картину катарального или катарально-геморрагического гастроэнтерита, нередко с множественными кровоизлияниями в слизистой желудка, под капсулой селезенки, почек; иногда отмечаются очаговая катаральная пневмония и отек легких.

Микроорганизмы данной группы способны менять их внешние проявления роста на агаровых пластинчатых средах, что послужило основанием для наименования *Proteus* (бог, способный менять свой облик).

Протеи относят к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Proteus*.

Род состоит из четырех видов: *Pr. vulgaris*, *Pr. mirabilis*, *Pr. myxofaciens*, *Pr. penneri*.

Морфология. Протеусы имеют форму палочек размером, в среднем аналогичным таковому у других энтеробактерий (длиной 1–3 мкм, шириной 0,4–0,8 мкм), встречаются нитевидные формы (рис. 15.7). Однако протеям в большей мере присущи проявления полиморфизма, обнаружение при микроскопии мазков кокковидных и неправильных очертаний инволюционных форм, в тех или иных условиях возможно образование сферопластов. У некоторых штаммов *Pr. mirabilis* обнаружены фимбрии. Возбудитель не образует капсул и спор. Протеи, как правило, подвижны, причем более выраженная подвижность имеет место при температуре 20–22 °С.

Культуральные свойства. Протеусы являются факультативными анаэробами, хорошо растут на простых питательных средах с образованием гнилостного запаха в широком диапазоне температур (от 10 до 43 °С).

На МПБ бактерии рода *Proteus* образуют поверхностную пленку в виде вуалеобразного налета с придонным ростом и неприятным запахом.



Рис. 15.7. *Pr. vulgaris* в мазке из культуры, окраска по Граму

Характерной особенностью роста протей на МПА является роение и образование вуалеобразного налета в виде концентрических колец роста по периферии центральной колонии. Поверхность роющих культур покрывается тонким слоем налета с голубоватым оттенком (Н-формы колоний). При наличии в составе питательных сред солей желчных кислот (среда Плоскирева, висмут-сульфитный агар и др.) происходит подавление роения и протей образует выпуклые, сероватые, бесцветные колонии (О-формы).

На среде Плоскирева протей формирует изолированные, крупные, правильных очертаний, слегка выпуклые, полупрозрачные колонии желтовато-розового (перламутрового) цвета. В зоне роста среда подщелачивается и желтеет. При более длительном хранении чашек с посевами колонии мутнеют, а их центр приобретает бурую окраску.

На висмут-сульфитном агаре через 48 ч культивирования образуются серо-коричневые колонии, а под ними формируется черно-коричневая редуционная зона.

На агаре МакКонки и Эндо протей формирует бесцветные колонии.

Для выделения чистой культуры посев производят в конденсационную жидкость скошенного агара (посев по Шукевичу), при этом на протяжении роста по всей поверхности среды.

Биохимические свойства. Важнейшим признаком, отличающим протеев от других видов энтеробактерий, является способность дезаминировать фенилаланин. Для этого к одно- и двухсуточной культуре на среде с фенилаланином в наклонном положении добавляют 10–15 капель 10%-го раствора железа хлорида ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). При положительной реакции через 2–3 мин культура окрашивается в зелено-си-

ний или зелено-голубой цвет. В случае отрицательной реакции цвет культуры не изменялся.

Общими свойствами представителей рода *Proteus* является способность к росту в присутствии KCN, положительная реакция с метиловым красным и отрицательная реакция Фогеса—Проскауэра.

Для изучения биохимических свойств протея делают посев изучаемых культур на среды с углеводами. Протеи не ферментируют лактозу, арабинозу, дульцит, не обладают декарбоксилазой лизина, дегидролазой аргинина, не утилизируют малонат. Выраженная гетерогенность протеев проявляется в их вариабельности по отношению к манниту, сахарозе, адониту, глицерину, инозиту, мальтозе, салицилину, инозиту, мальтозе, салицину, мочеvine, сероводороду, утилизации цитрата в среде Симмонса.

Антигенная структура. Сходна в принципе с таковой у других членов семейства *Enterobacteriaceae*. Она формируется из соматических O-антигенов и жгутиковых H-антигенов, адгезивных антигенов, в некоторых случаях у протеев обнаруживались и поверхностные соматические K-антигены. O-антигены термостабильны, представляют собой липополисахаридно-белковые комплексы; H-антигены термолабильны, имеют белковую природу. Известно более 150 O-антигенов и 80 H-антигенов. Сочетание O- и H-антигенов в микробной клетке определяет принадлежность возбудителей к той или иной O-серогруппе или серовару.

Устойчивость. Сравнительно устойчивы во внешней среде. Переносят нагревание до 60 °С в течение часа и воздействие слабых растворов дезинфицирующих веществ. Неустойчивы к высушиванию. Обладают устойчивостью ко многим антибиотикам.

Патогенность. Бактерии относятся к условно-патогенным микроорганизмам. Они способны вызывать пищевые и кормовые токсикоинфекции соответственно у человека и животных. Кроме того, они вызывают нагноение ран, энтериты, перитониты и сепсис. Проникая через яичную скорлупу птиц, протеи вызывают замирание зародышей птиц. Протеусы проявляют патогенные свойства при ослаблении естественной резистентности, особенно среди молодняка сельскохозяйственных животных, постоянно выделяются в ассоциации с патогенными эшерихиями при колибактериозе.

К факторам патогенности относят патогенные амины — индол, скатол; адгезины — пили; ферменты агрессии — протеазы; эндотоксин.

Патогенез. Изучен слабо.

Лабораторная диагностика. Включает микроскопическое исследование исходного патологического материала, его посевы на питательные среды, идентификацию выделенных культур по культурально-биохимическим свойствам, заражение лабораторных животных, при необходимости серологическое типирование.

Для посмертной диагностики в лабораторию направляют от 2—4 свежих трупов или убитых с диагностической целью: сердце, перевязанное лигатурой вблизи разреза сосудов, долю печени с желчным пузырем, селезенку, почки, голову (головной мозг), трубчатую кость, брыжеечные лимфатические узлы, регионарные воспаленному участку кишечника, а также пораженный отрезок тонкого отдела кишечника, перевязанный с двух концов лигатурой (в отдельной посуде или полиэтиленовом пакете), замершие эмбрионы птиц. Патологический материал исследуют в день его поступления.

Для прижизненной бактериологической диагностики направляют корма, рвотные массы, отделяемое ран, пробы фекалий от 5—6 больных животных одной фермы в стерильных пробирках с закругленными краями из последних порций стула, с примесями крови, слизи, пленок и т. п. по 2—3 г или непосредственно взятые из прямой кишки с помощью прокипяченного резинового катетера. Пробирки вместе с сопроводительной запиской упаковывают в полиэтиленовый пакет и в картонную коробку. Материал допускается хранить не более суток в холодильнике при температуре 4 °С или в морозильной камере.

Посев материала в МПБ и на скошенный МПА проводят пастеровской пипеткой, и на чашки Петри — путем отпечатков разрезанной поверхностью органа из предварительно профламбированного участка или вносят материал пастеровской пипеткой на поверхность агара, а затем равномерно распирают стеклянным шпателем.

Пробы фекалий и содержимого тонкого отдела кишечника (в количестве не более 0,5 г) суспендируют в 10 см³ стерильного 0,85%-го раствора хлорида натрия, тщательно размешивают и затем выдерживают 10—15 мин при комнатной температуре для осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость используют для посева на питательные среды не позднее 1—2 ч после приготовления взвесей, засевают бактериологической петлей частыми и ровными штрихами в чашки со средой для получения изолированных колоний.

Для получения чистых культур протей посев делают в конденсационную жидкость свежеприготовленного скошенного питательного агара. Н-формы протей, быстро размножаясь и роаясь на нем, через

16–18 ч достигают верхней части косяка в чистой культуре, «самовыделяясь» из микробных ассоциаций.

Патологический материал засевают в пробирки с МПБ, на скошенный МПА и на плотные дифференциально-диагностические среды в чашках: среду Эндо или Левина, среду Плоскирева и Вильсона–Блера (висмут-сульфитный агар), SS-агар, агар МакКонки.

Чашки и пробирки с посевами на жидких и плотных питательных средах инкубируют при температуре 37–38 °С в течение 24–48 ч и проводят осмотр на наличие и характера роста выросших культур.

На МПА образуют характерный, сливающийся рост без образования отдельных колоний (феномен роения) с образованием вуалеобразного налета. При наличии в составе среды солей желчных кислот (среда Плоскирева, висмут-сульфитный агар, SS-агар и др.) происходит подавление роения (рост протея в О-форме). На среде Плоскирева образуются крупные (2–7 мм) колонии, слегка выпуклые с желтовато-розовым (перламутровым) оттенком; среда в месте роста подщелачивается и приобретает желтизну. На висмут-сульфитном агаре через 48 ч культивирования колонии протея имеют грязно-коричневый цвет, а после их снятия на среде остается темно-коричневая редуционная зона.

В МПБ протеусы вызывают равномерное помутнение и осадок с тонкой пленкой на поверхности среды.

После инкубации в течение 18–24 ч при 37 °С чашки с посевами просматривают и отмечают колонии, подлежащие дальнейшему использованию. Если рост 18–24-часовой культуры однородный, то для дальнейшего изучения используют не менее трех колоний. При росте разных колоний берут те, которые различаются по внешнему виду.

Наличие характерного в виде тонкого муарообразного налета, поднимающегося вверх от конденсата на свежескошенном агаре, резкого гнилостного запаха, неспорообразующих грамтрицательных палочек в мазках указывает на присутствие бактерий рода *Proteus*.

Для определения родовой принадлежности выделенного штамма бактерий из изолированной колонии засевают данные микроорганизмы в пробирку с МПБ, из которого после 4–5-часовой инкубации при 37 °С производят посев на следующие среды:

агар с фенилаланином для определения фермента фенилаланиндезаминазы;

бульон или пептонную воду для выявления индола;

среду с мочевиной для установления фермента уреазы;

среду с 0,5 % мальтозы.

Посевы помещают в термостат при 37 °С на 16–18 ч.

Наличие фермента фенилаланиндезаминазы определяют путем наслоения на скошенную поверхность среды 4–5 капель 10%-го раствора железа хлорида. Появление интенсивной окраски свидетельствует о наличии фермента.

Гидролиз мочевины (наличие фермента уреазы) устанавливают по изменению цвета среды из желтого в красный.

Грамотрицательные бактерии, гидролизующие мочевины, дезаминирующие фенилаланиндезаминазу, относят к роду *Proteus*. Штаммы, ферментирующие мальтозу и образующие индол, относят к *P. vulgaris*; штаммы, не ферментирующие мальтозу и не образующие индол, — к *P. mirabilis*.

Важным дифференциальным признаком, отличающим протей от бактерий родов *Providencia* и *Morganella*, является способность 85–100 % изолятов рода *Proteus* давать феномен «роения» на плотных питательных сферах и вызывать покраснение скоса лизино-железного агара, что обусловлено дезаминированием лизина и образованием кетокилот, дающих оранжево-красное окрашивание в присутствии хлорида железа.

Дифференциальным признаком бактерий рода *Providencia* является:

способность у 25–40 % изолятов образовывать полиморфные структуры в виде деревьев, протуберанцев, но не классических концентрических кругов, свойственных для протей;

образование от бесцветных до оливково-зеленых колоний при росте на висмут-сульфитном агаре и желтых колоний на селективной среде с колистином (100 мкг/мл) и инозитом (1 %);

выделение провиденций на РАМ-агаре. Принцип выделения основан на отсутствии у провиденций способности ферментировать глюкозу, галактозу и маннит. Их выросшие колонии окрашиваются в красный цвет, прочие оксидазоотрицательные бактерии образуют лимонно-желтые колонии.

Дифференциальным признаком, отличающим морганелл от протей, является отсутствие покраснения скоса лизино-железного агара, что обусловлено отсутствием способности дезаминировать лизин и образовывать кетокилоты.

Характерная для рода *Proteus* реакция дезаминировать фенилаланин проявляется и у *M. morgani*, но она менее интенсивно выражена и дает слабое зеленое окрашивание.

Серологическое исследование – штаммы, отнесенные по основным биохимическим свойствам к роду *Proteus*, подвергают серологическому типированию при помощи диагностических поливалентных и типовых (О- и Н-сывороток в реакции агглютинации на стекле). Для типирования используют суточную агаровую культуру. При нечетких результатах, полученных в реакции агглютинации на стекле с живой культурой, ее проводят в пробирках или на стекле с прогретой (1 ч – 100 °С), отцентрифугированной культурой. Серологический вариант определяют в соответствии со схемой Ф. Кауфмана.

Для определения патогенных свойств бактерий используют агаровые культуры на скошенном МПА, выделенные из двух внутренних органов и тканей погибших или фекалий больных животных. Из каждой культуры одного вида бактерий готовят смывы стерильным физиологическим раствором, устанавливают взвесь бактерий в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл, после чего их смешивают в равной пропорции и заражают по три белые мыши массой 16–18 г внутрибрюшинно в дозе 1 млрд микробных клеток по стандарту мутности. Наблюдение за зараженными животными проводят в течение трех суток.

Культуру признают патогенной в случае гибели двух и более мышей в течение трех суток после заражения.

Общий срок бактериологического исследования патологического материала – до 7 сут, однако положительный ответ может быть выдан на 4–5-е сут.

Лабораторный диагноз на протеоз считают установленным в случае выделения из исследуемого материала культуры микроорганизмов с характерными свойствами для протей и определения патогенности выделенных культур.

Иммунитет, средства специфической профилактики болезни и лечения животных. Иммунитет изучен слабо. Специфическая профилактика отсутствует. Профилактика протеоза у животных в условиях промышленного производства основана на строгом соблюдении ветеринарно-санитарных и зооигиенических правил ухода за животными; создании оптимальных условий содержания и кормления; своевременной диагностики болезни и изоляции источника возбудителя, на повышении резистентности организма животных, а также на предотвращении заражения новорожденных возбудителем болезни через объекты внешней среды; своевременной и качественной очистки и дезинфекции помещений для животных и территории ферм; дератизации и дезинфекции помещений для животных и прилегающих территорий.

15.6. Возбудители ассоциированной кишечной инфекции молодняка животных

Ассоциированная кишечная инфекция – остропротекающая инфекционная болезнь молодняка разных видов сельскохозяйственных животных, которая имеет полиэтиологическую природу и вызывается двумя-тремя и более видами патогенных энтеробактерий, относящимся к родам *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella* и другими родами семейства *Enterobacteriaceae*.

С учетом того что некоторые представители названных родов уже изучались, а некоторые еще будут изучаться при анализе отдельных болезней, коснемся только родов *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*.

Название рода *Citrobacter* было предложено К. Веркманом и Й. Гелленом (1932). Отдельные представители этого рода первоначально были включены в другие роды и были известны под различными названиями. По Берджи (2005. Т. 2) данный род включает 11 видов: типовой *C. freundii* – синоним *Salmonella coli*.

Клебсиелл впервые описал немецкий исследователь Э. Клебс (*E. Klebs*) (1875), в чистой культуре выделил немецкий микробиолог К. Фридлиндер (*K. Friedlander*) (1882) от людей, умерших от крупозного воспаления легких. Род *Klebsiella* включает шесть видов: типовой вид – *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp. ozaenae*, *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*). Из общего количества более чем 60 наименований вначале принятым было «палочки Фридлиндера» (по имени ученого, выделившего клебсиелл, – *C. Friedlander*, 1882), в дальнейшем переименованные в клебсиеллы (по предложению *Trevisan*).

Morganella morganii был впервые выделена из кала младенцев как палочка Моргана. По Фултоне в 1943 г. *B. columbensis* и *P. morganii* были определены в род *Morganella*. Однако в 1962 г. У. Юинг сообщил, что *M. columbensis* была реидентифицирована как вид кишечной палочки, поэтому удалена из рода *Morganella*. Согласно современной классификации в роде *Morganella* один вид *Morganella morganii*, который имеет подвиды: *Morganella morganii subsp. morganii* и *Morganella morganii subsp. sibirii*.

Название *Enterobacter* предложено в 1960 г. и утверждено в 1963 г. на заседании Подкомитета по *Entero-bacteriaceae* Международного зоономического комитета и в дальнейшем на заседании Юридичес-

кой комиссии того же подкомитета в 1970 г. Многие ученые считают этот род типовым родом сем. *Enterobacteriaceae*. В него входят 12 видов, типовой вид — *E. cloacae*.

Помимо указанных микроорганизмов возбудителями болезни могут быть также бактерии других родов и семейств — *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* и пр. Наряду с бактериальными агентами нередко (особенно на крупных фермах) болезнь обуславливают корона- и ротавирусы.

Морфология. Бактерии рода *Citrobacter* — мелкие палочки $2-6 \times 0,5-0,9$ мкм, расположены одиночно или парами, как правило, подвижные благодаря наличию перитрихально расположенных жгутиков, спор и капсул не образуют, грамотрицательные.

Бактерии рода *Enterobacter* — $1,2-3 \times 0,6-1$ мкм подвижные, грамотрицательные палочки с перитрихальным расположением жгутиков, расположены поодиночке, парами, иногда короткими цепочками (рис. 15.8), некоторые штаммы имеют капсулу.

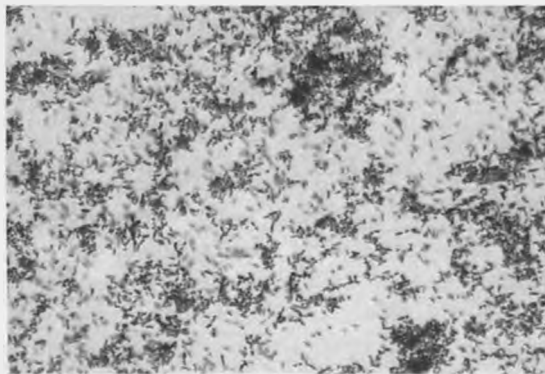


Рис. 15.8. *Enterobacter cloacae* в мазке из культуры, окраска по Граму

Бактерии рода *Klebsiella* грамотрицательные, короткие, толстые, неподвижные палочки с закругленными концами, размером $0,3-1,0 \times 0,6-6$ мкм, расположены одиночно, парами или короткой цепочкой. Обычно они локализованы в капсуле, которая является характерным морфологическим признаком у штаммов, непосредственно выделенных от животных (рис. 15.9). При высушивании и окрашивании размеры их уменьшаются. Спор не образуют.

Бактерии рода *Morganella* — грамотрицательные, прямые палочки с закругленными концами, около $0,6-0,7$ мкм в диаметре и $1,0-1,7$ мкм

и длину (рис. 15.10). Спор и капсул не образуют. Этот организм движется путем перитрихальных жгутиков, но некоторые штаммы не образуют жгутики при 30 °С. В мазках из бульонных и агаровых культур в поле зрения расположены одиночно, реже – попарно.



Рис. 15.9. *Klebsiella pneumoniae*, окраска конго красным



Рис. 15.10. *Morganella morganii* в мазке из культуры, окраска по Граму

Культуральные свойства. Факультативные анаэробы. Хорошо растут на обычных питательных средах при 37–38 °С, в течение 18–24 ч, рН среды $7,4 \pm 0,2$.

В отличие от эшерихий рост цитробактеров на средах, содержащих желчные соли, желчные кислоты и бриллиантовый зеленый, не подавляется. На среде Эндо лактозоположительные варианты *Citrobacter* образуют колонии, окрашенные в розовый или красный цвет, но лишенные типичного для *E. coli* металлического блеска; у лактозоотри-

цательных вариантов колонии бесцветные или сероватые с розовым оттенком, более темным в центре. На среде Плоскирева не сбраживающие лактозу штаммы образуют слегка опалесцирующие выпуклые колонии, окрашенные в тон среды (слегка розоватые); сбраживающие лактозу штаммы формируют колонии, имеющие более интенсивную розово-красную окраску с темным центром. На висмут-сульфитном агаре через 48 ч инкубации цитробактеры дают обильный рост, образуя светло-зеленые, коричневые или черные колонии без окрашивания участка среды под колонией. Их рост на этой среде более обильный, чем сальмонелл, и отличается неприятным запахом. На жидких средах дают гомогенное помутнение.

На среде МакКонки лактозоотрицательные штаммы образуют выпуклые бесцветные или бледно-розовые колонии с темным центром; лактозоположительные – красные колонии (рис. 15.11).

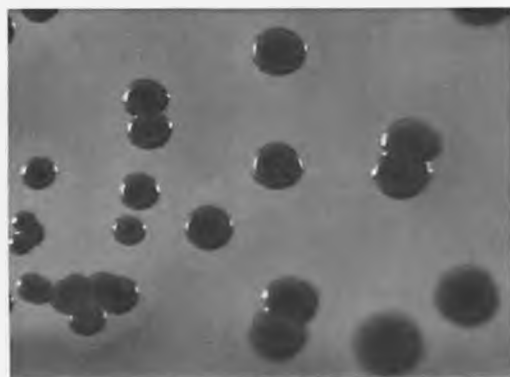


Рис. 15.11. Рост *Cit. freundii* на среде МакКонки (лактозонегативные штаммы)

Для клебсиелл оптимальная температура роста – 37–38 °С, крайние границы – 12–43 °С, рН среды $7,4 \pm 0,2$. Непременной особенностью клебсиелл считается пышный рост и образование на питательных средах больших, влажных колоний, частично сливающихся друг с другом, нередко очень слизистых, выпуклых. Вместе с тем они могут образовывать обычные, а также мелкие, неслизистые, суховатые колонии. Значительная часть клебсиелл растет на средах Эндо и Плоскирева с образованием колоний, напоминающих колонии, сбраживающих лактозу штаммов эшерихий, с металлическим блеском или без него. На этих средах не сбраживающие лактозу штаммы клебсиелл могут об-

разовывать колонии разного размера, слизистые и неслизистые, красные, розовые, белые, прозрачные и непрозрачные, бесцветные, бежевые или желтые (рис. 15.12). На селективно-дифференциальной среде (с инозитом) для выделения клебсиелл колонии этого микроорганизма крупные слизистые, бледно- или ярко-желтые, диаметром 4–5 мм.

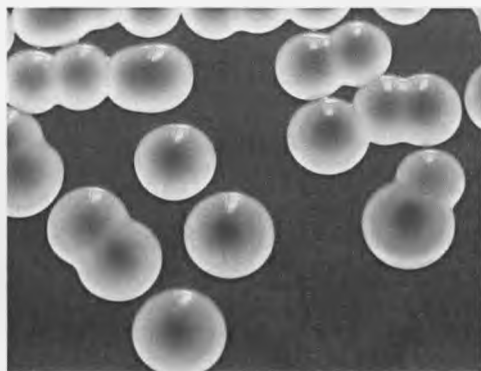


Рис. 15.12. Рост *Klebsiella pneumoniae* на среде Эндо

В жидких питательных средах клебсиеллы растут с образованием либо гомогенной мути либо осадка, пленки на поверхности или кольца на стенке пробирки.

Энтеробактерии хорошо растут на обычных плотных питательных средах и селективно-дифференциальных с образованием колоний обычного размера, слизистых и неслизистых, напоминающих колонии шперихий или клебсиелл (лактозоположительные варианты), малиновых или розовых, с металлическим блеском или без него; замедленно расщепляющие лактозу штаммы растут на лактозосодержащих дифференциальных средах подобно патогенным кишечным бактериям, образуя бесцветные колонии с розовым или бежевым оттенком на среде Эндо или с желтоватым на среде Плоскирева.

Morganella morganii на плотных питательных средах (МПА, агаре Хоггингера) в течение 18–24 ч образуются округлые с ровными краями, выпуклые, с гладкой блестящей поверхностью, серовато-белые колонии диаметром 1–3 мм. Феномен «роения» морганеллы не дают.

На средах Плоскирева и Эндо колонии лактозоотрицательных штаммов, имеющих S-форму, росинчатые, полупрозрачные, с голубоватым оттенком или голубовато-серого цвета, к 2–3 сут культивирования они приобретают серовато-белый цвет.

На висмут-сульфитном агаре колонии морганелл округлые, с ровным краем, гладкие, блестящие, более плоские, чем на МПА, имеют зеленовато-оливковый цвет. При многократных пересевах характерные S-формы колоний морганелл могут переходить в шероховатые R-формы из-за диссоциации культур.

В МПБ, бульоне Хоттингера, пептонной воде рост морганелл проявляется в виде равномерного помутнения среды с легко разбивающимся при встряхивании осадком.

Биохимические свойства. Служат основой дифференциации энтеробактерий. Бактерии рода *Citrobacter* растут в присутствии желчи, усваивают цитрато-аммонийные соли и растут на среде Симмонса, ферментируют глюкозу с образованием газа, лактозу в разные сроки (встречаются лактозоотрицательные штаммы), а также маннит, рамнозу, сорбит, арабинозу, ксилозу, мальтозу. Обычно не ферментируют инозит, не обладают лизиндекарбоксилазой, фенилаланиндезаминазой и желатиназой. Мочевину гидролизуют очень слабо и медленно или вообще не гидролизуют, восстанавливают нитраты. Большинство штаммов образует сероводород и не образует индол. Цитробактеры в основном вариабельны по отношению к сахарозе, салицину, дульциту, рафинозе и адониту. Положительные в реакции с метиловым красным и отрицательные в реакции Фогеса—Проскауэра.

Клебсиеллы ферментируют глюкозу с образованием кислоты и газа, а в зависимости от штамма — лактозу, сахарозу, маннит, салицин, адонит, инозит, глицерин, целлобиозу, нерастворимый крахмал. Они вариабельно ферментируют дульцит, не образуют индола (кроме *K. oxytoca*) и сероводорода, не имеют фенилаланиндезаминазы, орнитиндекарбоксилазы, аргининдегидролазы при наличии лизиндекарбоксилазы и уреазы, не разжижают желатин, не растут на среде Симмонса и не изменяют его цвет (не утилизируют цитратно-аммонийные соли), не расщепляют мочевину (кроме *K. rhinoscleromatis*), дают различную реакцию с метиловым красным и Фогеса—Проскауэра.

Энтеробактеры не образуют сероводород и индол, не имеют фенилаланиндезаминазы, утилизируют цитрат, слабоактивны при гидролизе мочевины, вариабельны в тестах с малонатом и аминокислотами, большинство штаммов замедленно разжижают желатин, отрицательны в реакции с метиловым красным, положительны в реакции Фогеса—Проскауэра; ферментируют глюкозу с образованием кислоты и газа, обычно — маннит, лактозу, сахарозу, встречаются штаммы, не ферментирующие последних два углевода или с замедленно положительной

реакцией; ферментируют рамнозу, ксилозу, мальтозу, сорбит, арабинозу, рафинозу, вариабельно – инозит, дульцит, салицин, адонит.

M. morganii ферментирует глюкозу, образует индол, дает положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную реакцию Фогеса–Проскауэра, расщепляет мочевины, является каталаза-положительным микроорганизмом, не ферментирует лактозу, мальтозу, сахарозу, маннит, не усваивает цитрато-аммонийные соли, не образует сероводород, не разжижает желатин, не образует лизиндекарбоксилазу и аргининдегидролазу, но синтезирует орнитиндекарбоксилазу, деаминарует фенилаланин и триптофан (что сближает их с бактериями родов *Proteus* и *Providencia*), выделяет уреазу, восстанавливает нитраты в нитриты. Растет на средах с KCN.

Антигенная структура. Клебсиеллы имеют O-, K-, H-антигены, а также адгезивные антигены. Отмечены перекрестные реакции (в реакции агглютинации) с сыворотками к другим энтеробактериям, что свидетельствует о существовании родства между энтеробактериями.

У бактерий рода *Citrobacter* выделяют O-, K- и H-антигены, характерные для большинства представителей семейства энтеробактерий. По антигенной структуре близки к сальмонеллам.

Для типирования клебсиелл, энтеро- и цитробактеров, морганелл биопромышленность выпускает поли-, O- и H-монорецепторные сыворотки.

Устойчивость. Во внешней среде клебсиеллы обладают высокой устойчивостью, в частности к действию низких температур, могут расти в условиях холодильника (при 4 °С). При нагревании до 55 °С погибают через 30 мин. Устойчивы к действию дезинфицирующих веществ и большинству широко применяемых в медицинской практике антибиотиков.

Морганеллы сравнительно устойчивы в окружающей среде, но несколько меньше, чем эшерихии. Они выдерживают нагревание до 60 °С в течение часа, при 100 °С погибают мгновенно. Могут длительно сохраняться в слабых дезинфицирующих растворах.

Патогенность. Энтеробактерии широко распространены в природе и организме животных, особенно в желудочно-кишечном тракте. Ассоциированная кишечная инфекция возникает в первые дни и недели жизни животных и проявляется чаще в виде энзоотической вспышки, развитию которой способствуют различные факторы, связанные с несоблюдением технологических и ветеринарно-санитарных требований воспроизводства стада, а также нарушением режимов содержания

и кормления молодняка. Заболевание обусловлено наличием эндо- и экзотоксинов.

Ассоциированная кишечная инфекция может протекать в кишечной (энтеритной) и септической формах. При кишечной форме возбудители болезни локализуются только в желудочно-кишечном тракте и брыжеечных лимфоузлах, регионарных пораженным участкам кишечника; при септической форме — в паренхиматозных органах, различных тканях, а также в кишечнике и брыжеечных лимфоузлах. Основными клиническими признаками болезни являются потеря аппетита, понос, переходящий в профузный, нарастающая слабость, депрессия, учащенное дыхание и сердцебиение, обезвоживание организма (при затяжном течении); нередко наблюдается поражение центральной нервной системы (возбуждение, судороги), иногда пневмония, артриты; температура тела в пределах нормы, в отдельных случаях повышена на 0,5–1 °С, в предагональном состоянии она снижается ниже нормы.

Патологоанатомические изменения у погибших животных имеют картину катарального или катарально-геморрагического гастроэнтерита. На слизистой желудка, тонкого отдела кишечника и слепой кишки могут встречаться язвы, нередко отмечаются множественные точечные, полосчатые и пятнистые кровоизлияния на слизистой желудка, толстого и тонкого отделов кишечника, под капсулой селезенки, эпи- и эндокарде (клапанах). Иногда отмечаются очаговая катаральная пневмония и отек легких, дистрофия печени. Регионарные брыжеечные лимфатические узлы, как правило, увеличены, отечны, на разрезе розового или красно-вишневого цвета; при вскрытии черепной коробки — гиперемия кровеносных сосудов и отек ткани головного мозга. Указанные изменения могут быть в отдельных или одновременно в нескольких органах.

Патогенез. Изучен слабо.

Лабораторная диагностика. Диагноз на ассоциированную кишечную инфекцию в хозяйствах устанавливают на основе совокупности эпизоотологических данных (возраст заболевших животных, массовость поражения, стационарность и др.), клинических признаков болезни, патологоанатомической картины и результатов бактериологического (при необходимости еще и вирусологического) исследования патологического материала от больных или погибших животных.

Материал для исследования — 2–4 свежих трупа погибших или убитых с диагностической целью больных животных (желательно не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами). В слу-

вместо невозможности доставки целого трупа посылают голову, трубчатую кость, сердце, перевязанное лигатурой вблизи разреза сосудов и аорты, селезенку, долю печени с желчным пузырем, брыжеечные узлы, регионарные воспаленному участку кишечника, а также пораженный участок тонкого отдела кишечника, перевязанный с двух концов лигатурой (в отдельной посуде). Указанный патологический материал исследуют в день его поступления в лабораторию. Для прижизненной бактериологической диагностики посылают фекалии больных диареей животных, не подвергавшихся лечению антибиотиками.

Патологический материал (исключая содержимое кишечника и фекалии) засевают в МПБ, скошенный на МПА и плотные дифференциально-диагностические среды в чашках: Эндо (или Левина) и Плоскирева. Содержимое тонкого отдела кишечника и фекалии засевают только на указанные плотные среды в чашках. Для выделения из фекалий сальмонелл неразведенные пробы фекалий засевают еще в одну из сред обогащения (селинитовый бульон, магниевую, Мюллера и др.) в соотношении 1:5.

Пробирки с посевами в МПБ, на МПА, Эндо, Плоскирева инкубируют при 37–38 °С в течение 18–24 ч. При наличии в МПБ помутнения среды культуру микроскопируют и в случае обнаружения грамотрицательных палочек пересевают на среду Эндо (Левина) и Плоскирева (это проводится при отсутствии роста на дифференциальных средах). При наличии колоний, подобных на рост эшерихий или сальмонелл, дальнейшую диагностику ведут согласно методическим рекомендациям по диагностике сальмонеллеза и колибактериоза.

При наличии на агаре Эндо (Левина) роящегося налета, характерного для протей, его пересевают на скошенный МПА (культуры из 2–3 внутренних органов, тканей или фекалий).

Следует учитывать, что у бактерий рода *Proteus* встречаются нероящиеся штаммы, образующие при росте на плотных питательных средах мелкие круглые колонии S-формы сероватого цвета. Важными признаками родовой идентификации таких штаммов является их способность дезаминировать фенилаланин и разжижать желатин.

После просмотра культур на дифференциальных средах проводят их пересев на МПБ и МПА (по 1–2 колонии с культур из 2–3 внутренних органов, тканей или фекалий, каждую колонию отдельно в пробирку). У выделенных культур исследуют ферментативные, патогенные и антигенные свойства, а также (при необходимости) определяют подвижность в полужидком МПА. Из ферментативных свойств изу-

чают ферментацию глюкозы, лактозы, сахарозы, маннита, мальтозы, а также мочевины, выделение сероводорода, аммиака, рост на агаре Симмонса, МПЖ, на среде с фенилаланином, при необходимости проводят и другие тесты.

Изучение ферментативных свойств культур энтеробактерий можно проводить также с помощью тест-системы для биохимической идентификации энтеробактерий. Родовую и видовую принадлежность культур устанавливают по показателям биохимической активности, морфологическим и культуральным свойствам.

Серологическую идентификацию культур энтеробактерий ведут в соответствии с действующими методическими рекомендациями в реакции агглютинации с типовыми агглютинирующими сыворотками.

Патогенные свойства определяют у культур бактерий, относящихся к родам *Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, а также к родам *Escherichia* и *Morganella*, не имеющих адгезивных антигенов и не типизируемых по О-антигену, в биопробе на белых мышах. Для определения патогенных свойств бактерий используют агаровые культуры указанных микроорганизмов, выделенные из двух внутренних органов и тканей погибших или фекалий больных животных. С каждой из двух культур одного вида бактерий готовят смывы стерильным физиологическим раствором, устанавливают взвесь бактерий в концентрации 1 млрд микробных клеток/см³ (10 единиц по оптическому стандарту мутности), после чего их смешивают в равной пропорции.

Взвесьми культур каждого вида бактерий заражают по три белые мыши массой 14–15 г внутрибрюшинно в дозе 0,5 млрд микробных клеток. Культуру признают патогенной в случае гибели двух и более мышей в течение трех суток после заражения и относят ее к возбудителю болезни.

Бактериологический диагноз на ассоциированную кишечную инфекцию молодняка сельскохозяйственных животных устанавливают на основании выделения из патологического материала культур, принадлежащих к двум и более родам энтеробактерий: *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, а также бактерий других родов и семейств — *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* в каждом из следующих случаев:

при выделении культур, относящихся к одному виду того или иного рода, из селезенки, печени, крови сердца, головного, костного мозга (не менее, чем из двух перечисленных органов и тканей) свежего трупа животного или убитого клинически больного животного без определе-

ния их патогенности для белых мышей и установления серогрупповой принадлежности;

при выделении из патологического материала культур, относящихся к указанным возбудителям на основании результатов серологической идентификации (*Escherichia*, *Salmonella*);

при выделении культур, относящихся к одному виду того или иного рода, обладающих патогенностью для белых мышей.

Общий срок бактериологического исследования патологического материала — до 7 сут. При необходимости определяют антибиотико-чувствительность каждого вида выделенной культуры возбудителя кишечной инфекции.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет изучен слабо. При выделении из патологического материала патогенных эшерихий, сальмонелл проводятся мероприятия согласно инструкциям по профилактике данных болезней. Должны соблюдаться зоогиgienические правила содержания и кормления сельскохозяйственных животных.

Глава 16 ВОЗБУДИТЕЛЬ РОЖИ СВИНЕЙ

Рожа свиней (*Erysipelas suum*) — инфекционная болезнь, характеризующаяся при остром течении септицемией и воспалительной эритемой кожи, а при хроническом — эндокардитом, артритам (рис. 16.1).

Впервые возбудителя рожи свиней открыли и описали Л. Пастер и Л. Тюилье в 1882 г.

Возбудителя относят к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Erysipelotrichia*, порядку *Erysipelotrichales*, семейству *Erysipelotrichaceae*, роду *Erysipelothrix*, виду *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Морфология. *Erysipelothrix rhusiopathiae* — неподвижная тонкая, прямая или слегка изогнутая палочка размером $0,2-0,3 \times 0,5-1,5$ мкм, расположена в препаратах одиночно, попарно или в виде небольших скоплений (рис. 16.2). Хорошо окрашивается обычными

анилиновыми красителями, грамположительна, спор и капсул не образует. В препаратах из пораженных клапанов сердца (при веррукозном эндокардите) обнаруживают удлиненные и нитевидные формы, при хроническом течении болезни в патологическом материале можно обнаружить бактерии в виде длинных переплетающихся нитей.



Рис. 16.1. Клиническое проявление рожи свиней

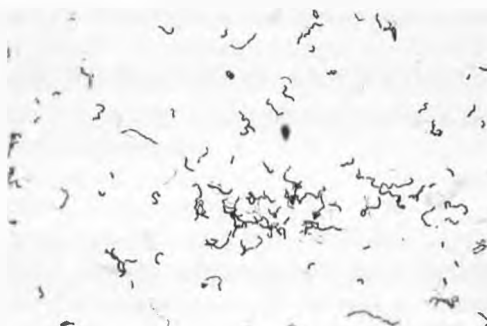


Рис. 16.2. *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Культуральные свойства. Рожистую палочку культивируют в МПБ, на МПА, в МПЖ, ПЖА, бульоне Хоттингера, на селективной среде Сент-Иваны (агаровая среда с 0,1 % кристаллвиолета и 1 % азида натрия). Бактерия растет в аэробных и анаэробных условиях с пониженным давлением O_2 и содержанием 5–10 % CO_2 (микроаэрофил). Оптимальная температура роста – 36–37 °С, рН среды 7,2–7,4, продолжительность культивирования – 24–48 ч.

В МПБ наблюдается нежное помутнение среды (опалесценция) без образования пристеночного кольца, пленки. При встряхивании

пробирки хорошо заметны муаровые волны и небольшой осадок, поднимающейся в виде облачка.

На МПА видны мелкие росинчатые колонии, просвечивающиеся, с трудом различимые невооруженным глазом (S-форма). Бактерии, выделенные при септицемии, образуют колонии в S-форме. Могут быть колонии с неровными краями и волокнистой поверхностью (переходная O-форма) и крупные с шероховатой поверхностью и отходящими от края корнеобразными отростками (R-форма). Колонии в O- и R-формах образуют бактерии, выделенные из патологического материала, принадлежащего животным с хроническим течением болезни. На кровяном агаре вокруг колоний образуется узкая зона α -гемолиза.

В столбике желатина при посеве уколом через 6–10 дней от центрального стержня отходят горизонтальные нежно ветвящиеся отростки, по виду напоминающие ершик для мытья пробирок.

Биохимические свойства. Выражены слабо. Рожистая палочка ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, лактозу, леулузу, галактозу, фруктозу, мальтозу, декстрин.

Возбудитель почти или совсем не разжижает желатин, молоко свертывает на 4–6-е сут только при подогревании, бактерии выделяют H_2S , не образуют индол, не редуцируют нитраты, каталазу не образуют, индикаторных сред не изменяют, не ферментируют сахарозу, маннит, салицин.

Антигенная структура. Бактерии рожи подразделяют на три серогруппы: А, В, N. Общим видовым антигеном является антиген N. Серовары различаются своими гаптенами. Штаммы серовара В имеют гемагглютинин и растворимый иммуногенный антиген, поэтому они пригодны для изготовления вакцин против рожи свиней.

Патогенность. К возбудителю восприимчивы свиньи в основном в возрасте от 3 мес. до 1 года. Болеют ягнята, куры, гуси, утки, индейки. На лабораторных животных к возбудителю чувствительны белые мыши, голуби, менее – кролики. Зарегистрированы случаи заболевания лошадей, крупного рогатого скота, овец, собак, северных оленей. Факторами патогенности у рожистых палочек являются экзо- и эндотоксины.

Бактерии патогенны и для человека (дерматиты, сепсис).

Патогенез. Заражение происходит алиментарно, через поврежденную кожу, укусы кровососущих насекомых. Патогенность возбудителя в основном обусловлена эндотоксином.

Бактерии проникают в кровь, внутренние органы, вызывают воспалительные и дистрофические процессы.

При неблагоприятном течении болезни наблюдается диссеминация возбудителя лимфогенным и гематогенным путями, развивается сепсис, подавляется фагоцитоз, наступает функциональное расстройство сердечно-сосудистой системы и гибель животного.

Устойчивость. В оболочке рожистой палочки содержится повышенное количество восколипидных веществ, что обуславливает ее резистентность. Бактерия не теряет своей жизнеспособности в почве и трупах до 10 мес., в фекалиях, воде — до 2–3 мес. Жарение и тушение не стерилизует мясо от рожистой палочки. Бактерия неустойчива к антибиотикам и обычным дезинфектантам.

Лабораторная диагностика. Включает микроскопию, бактериологический, биологический и серологический методы исследований, которые позволяют установить достоверный диагноз.

Материалом для исследования служат трупы мелких животных, сердце (при хроническом течении — обязательно), печень, селезенка, почки, трубчатая кость.

Из патологического материала делают препараты-мазки и отпечатки, при подозрении на хроническое течение болезни обязательно готовят препараты из пораженных клапанов сердца. Часть препаратов окрашивают по Граму, а часть — обрабатывают рожистой флюоресцирующей сывороткой в соответствии с рекомендациями по ее применению и подвергают их световой, люминесцентной микроскопии. Положительный результат люминесцентной микроскопии дает право на постановку окончательного диагноза.

Высевы из патологического материала делают в МПБ или бульон Хоттингера и на МПА. Посевы инкубируют в термостате при 36–37 °С в течение 18–24 ч, а при отсутствии роста — еще сутки.

Выделенную культуру идентифицируют по морфологии, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам, а также в реакции агглютинации (на стекле с суточной культурой) с позитивной сывороткой (в разведении 1:50), для чего чистую культуру высевают в пробирки с МПБ, МПА, полужидким агаром и на среды Гиса с глюкозой, лактозой, сахарозой и маннитом.

Подвижность культуры определяют высевом в полужидкий агар. Учет проводят через 18–24 ч инкубирования в термостате при 36–37 °С.

Культуру, не обладающую подвижностью, выделяющую сероводород, не продуцирующую каталазу, разлагающую с образованием кислоты без газа глюкозу, лактозу и не разлагающую сахарозу, маннит,

дающую положительную реакцию агглютинации с позитивной сывороткой, относят к возбудителю рожи.

Биопробу ставят на белых мышах или голубях. Их заражают суспензией (1:10) или бульонной культурой: мышей — подкожно в дозе 0,1–0,2 мл, голубей — внутримышечно по 0,2–0,3 мл. Мыши и голуби погибают на 2–6-е сут. Павших мышей и голубей вскрывают и делают посевы из паренхиматозных органов и крови сердца. Возбудитель рожи свиней не патогенен для морских свинок.

Лабораторный диагноз считают установленным в одном из случаев:

обнаружение возбудителя в исходном материале или в смешанной культуре методом флюоресцирующих антител без выделения чистой культуры;

выделение из патологического материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя рожи;

гибель зараженных животных и выделении из органов возбудителя рожи, если даже из исходного материала культура не была выделена.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Переболевшие свиньи приобретают стойкий и длительный иммунитет. Поствакцинальный активный иммунитет сохраняется 4–6 мес., пассивный — до 2 нед.

Вакцинацию свиней против рожи аттенуированными культурами впервые предложил Л. Пастер (1883). В России живые вакцины против рожи свиней были получены П. И. Боровским (1897) и Д. Ф. Коневым (1904).

В современной практике используют:

- 1) депонированную вакцину;
- 2) вакцину из слабовирулентного румынского штамма ВР;
- 3) концентрированную гидроокисьалюминиевую формолвакцину;
- 4) сухую слабовирулентную вакцину из штамма ССВР.

Для пассивной профилактики и лечения применяют противорожистую гипериммунную сыворотку.

Листериоз (лат., англ. *Listeriosis*; синонимы – болезнь реки Тигра, «силосная» болезнь) – инфекционная болезнь животных и человека, характеризующаяся поражением центральной нервной системы, септицемией, абортами и маститами или протекающая в форме бессимптомного носительства.

Впервые возбудителя листериоза выделил в 1911 г. шведский ученый Г. Гюльферс от больных кроликов и назвал его *Bact. hepatis*. В 1927 г. возбудителя листериоза выделил от грызунов Ж. Пири и предложил назвать его в честь знаменитого биолога Д. Листера *Listeria monocytogenes*, так как введение возбудителя в организм подопытных животных вызывало моноцитоз.

Листерий относят к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Bacillales*, семейству *Listeriaceae*, роду *Listeria*.

Согласно Справочнику Берджи (2009. Т. 3) род *Listeria* насчитывал шесть видов: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*. Впоследствии в 2015 г. в данный род были включены еще 17 видов: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis*, *L. welshimeri*.

Возбудителем болезни является *L. monocytogenes*, реже – *L. ivanovii*. Остальные листерии широко распространены в природе: обнаруживаются в почве, грязи, сточных водах, растениях, в фекалиях животных и человека. Непатогенны для животных и человека. В последнее время установлено, что отдельные штаммы *L. innocua* способны вызывать случаи менингита и бактериемии у пожилых людей на фоне применения кортикостероидных препаратов.

Морфология. *L. monocytogenes* – полиморфная палочка, размером 0,5–2 мкм в длину, 0,3–0,5 мкм в ширину, иногда принимает форму кокков, вибрионов, ово-

идов, нитей. Установлены L-формы листерий. В препаратах бактерии расположены одиночно, попарно, в виде римской цифры V, полисадом по пять клеток, неопределенными скоплениями (рис. 17.1). Палочка грамположительная, может окрашиваться биполярно, в мазках из старых культур — грамтрицательная. Спор и капсул не образует. В молодых культурах, выращиваемых при 22 °С, бактерия подвижна, имеет от 1 до 4 жгутиков. В старых культурах подвижность утрачивается.



Рис. 17.1. *L. monocytogenes*, окраска по Граму

Культуральные свойства. Листерии — факультативные анаэробы, особенностью которых является широкий температурный диапазон роста: от 4 до 45 °С. В лабораториях культивируют при 37 °С и рН среды 7,2–7,4.

Для культивирования применяют обычный или печеночный агар и бульон с добавлением 1 % глюкозы и 2–3 % глицерина, а также кровяной агар и элективные среды (МПА с добавлением водно-глицеринового раствора калия теллурита (рис. 17.2) и др.).

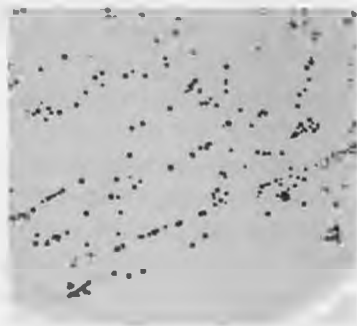


Рис. 17.2. *L. monocytogenes* на среде с калия теллурита (колонии черного цвета)

В МПБ в первые сутки роста наблюдают легкое помутнение, в последующем на 5–7-е сут образуется слизистый осадок, который при встряхивании пробирок поднимается в виде косички.

На МПА через 2–3 сут появляются нежные прозрачные росинчатые колонии, круглые, выпуклые, с голубоватым оттенком, диаметром 1–1,5 мм, затем колонии мутнеют. В случае отсутствия роста посевы инкубируют 3–4 сут и даже до 2 нед.

На кровяном агаре вокруг колоний образуется зона бета-гемолиза.

Биохимические свойства. Листерии разлагают с образованием кислоты (без газа) глюкозу, мальтозу, маннозу, рамнозу, салицин и трегалозу и не разлагают дульцит, инулин, раффинозу. Не образуют индола и H_2S , не разжижают желатин (рост по месту укола в виде узловой зернистой нити), не восстанавливают нитраты в нитриты, не свертывают молоко, дают положительную пробу на каталазу, обесцвечивают индикаторные среды (с лакмусом, нейтральротом в смеси с метиленовой синью).

Антигенная структура. Листерии имеют соматический и жгутиковый антигены. Подразделяются на 18 серовариантов. Различают три основных серовара, объединенных в две серогруппы. Серовары 1-й, 3-й и 4-й имеют подтипы a, b, c, d, e. Наиболее часто встречаются серовары 1/2c, 1/2a, 4a и 4b.

Патогенность. Спектр патогенности листерий широкий. Листериоз – зооантропонозная инфекция. К листериям восприимчивы человек, овцы, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, кролики, куры, гуси, утки, индейки, норки. Отмечены случаи заболевания собак, кошек, обезьян. Листерии выделены от рыб, искусственно культивируемых моллюсков, ракообразных и земноводных. Болеют животные всех возрастов, но особенно чувствительны молодые и беременные животные. Из лабораторных животных восприимчивы белые мыши, морские свинки, кролики.

Факторами патогенности у листерий являются нейро-, гемо- и эндотоксин.

Патогенез. Заражение происходит через слизистую носовой и ротовой полостей, конъюнктиву, пищеварительный тракт, поврежденную кожу. Из мест первичного проникновения листерии лимфогенным и гематогенными путями разносятся по всему организму. Если вирулентность возбудителя невысокая, листерии купируются иммунокомпетентными клетками тканей, лимфатических узлов, печени, селезенки, костного мозга. Интенсивность инфекционного процесса будет невы-

сокой с развитием листерионосительства. Если же вирулентность листерий высока, а резистентность организма низкая, возбудитель через гематоэнцефалический барьер или периневральным путем проникает в центральную нервную систему и вызывает развитие энцефаломиелита и менингита. Септическая форма встречается почти исключительно у молодняка. У беременных животных возбудитель проникает в плод, вызывает его гибель и аборт.

Устойчивость. Листерии устойчивы во внешней среде: в воде сохраняют жизнеспособность до 1 года, в почве — до 6 мес., в силосе и мясе — до 1 года. При температуре 4 °С могут даже размножаться. Гибель микроорганизмов происходит при температуре 55 °С в течение часа, при 58 °С — 30 мин, при 70 °С — через 20 мин, при 100 °С — в течение 5–10 мин. Обычные дезинфектанты, например 2,5%-й раствор формальдегида и 2,5%-й раствор NaOH, инактивируют возбудителя через 20 мин.

Лабораторная диагностика. Для исследования в лабораторию направляют трупы мелких животных или голову (головной мозг), паренхиматозные органы (часть печени, селезенку, почку, пораженные участки легких), абортирванный плод и его оболочку. Для прижизненной диагностики используют кровь или сыворотку крови, истечения из половых органов абортировавших самок, молоко из пораженных долей вымени при наличии маститов.

Бактериологическая диагностика включает микроскопическое исследование исходного материала, посевы на питательные среды, идентификацию выделенных культур по культурально-биохимическим и серологическим свойствам, а также постановку биопробы на лабораторных животных.

Мазки окрашивают по Граму, а также методами флюоресцирующих антител. Из органов и головного мозга делают обильные посевы на питательные среды, а также на кровяной агар и элективные среды. Часть материала рекомендуется сохранять в холодильнике в течение 30 дней (при 4 °С происходит размножение и накопление листерий) для проведения повторных исследований через каждые 10 дней при отрицательном результате первичного посева.

Посевы инкубируют в термостате при 37 °С с ежедневным промывом в первые 3–4 дня. Если роста нет, то наблюдают до 2 нед.

Выделенные культуры исследуют на подвижность, изучают ферментативные свойства на средах Гисса, ставят пробу на каталазу и дифференцируют от возбудителя рожи свиней (посев на индикатор-

ные среды). Ставят капельную реакцию агглютинации для определения серотипа с помощью поливалентных и типовых сывороток. Для типирования используются и бактериофаги.

Специфические свойства листерий проверяют также конъюнктивальной пробой на морских свинках или внутрикожной пробой на морских свинках или кроликах.

Конъюнктивальная проба — на конъюнктиву глаза морской свинке наносят 2 капли испытуемой бульонной культуры с последующим легким массажем век ватным тампоном. Вирулентные штаммы листерий на 2–4-е сут вызывают гнойный кератоконъюнктивит. Пробу ставят на двух морских свинках.

Дерманекротическая проба — морской свинке или кролику внутрикожно вводят 0,3–0,5 мл бульонной культуры. Через 24–48 ч возникает воспаление с последующим некрозом и образованием струпа.

Биологическое исследование проводят для получения чистых культур и определения их вирулентности. Используют 2–3 белые мыши, которых заражают подкожно (или внутрибрюшинно) суспензией из головного мозга или внутренних органов или культурой в дозе 0,3–0,5 мл. При положительной биопробе животные погибают через 2–6 сут после заражения. При вскрытии видны множественные некротические очажки в печени, селезенке, почках.

Серологические методы (реакция агглютинации, РНГА, РСК, ИФА) применяют для выяснения эпизоотической ситуации в хозяйствах, где диагноз на листериоз поставлен комплексным методом с выделением культуры.

Возбудитель листериоза подвижен, дает положительную пробу на каталазу, разлагает салицин, обесцвечивает индикаторные среды, дает положительную реакцию агглютинации со специфической сывороткой и положительную конъюнктивальную пробу на морских свинках.

Диагноз на листериоз считают установленным при:

получении положительного результата в РНФ (реакция нарастающего фага);

обнаружении листерий в патологическом материале иммунофлюоресцентным методом;

выделении культуры с признаками, характерными для возбудителя листериоза.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Переболевшие животные приобретают иммунитет слабой напряженности. Формируется в основном клеточный иммунитет.

Т лимфоциты синтезируют медиаторы, повышающие метаболическую и фагоцитарную активность макрофагов. В макрофагах листерии утрачивают способность к размножению.

Для специфической профилактики листериоза применяют сухую живую вакцину из штамма АУФ, которая предназначена для профилактической иммунизации крупного рогатого скота, овец, свиней и поросят.

Листерии чувствительны к антибиотикам тетрациклинового ряда, комбинации ампициллина с гентамицином.

Предлагаемые гипериммунные листериозные сыворотки, несмотря на высокий титр антител и выделенные из них гамма-глобулины, не обладают достаточно выраженными превентивными свойствами.

Глава 18. ВОЗБУДИТЕЛЬ ГЕМОФИЛЕЗНОГО ПОЛИСЕРОЗИТА СВИНЕЙ

Гемофилезный полисерозит свиней (синоним – болезнь Глессера) – инфекционная болезнь поросят-сосунков и отъемышей, характеризующаяся лихорадкой, серозно-фибринозным плевритом, перикардитом, перитонитом, полиартритом, менингоэнцефалитом, нарушением сердечной деятельности, координацией движений, затрудненным дыханием.

Впервые болезнь описана К. Глессером в 1910 г. В серозном экссудате грудной полости павших свиней он обнаружил микроорганизмы, которые по морфологии напоминали микобактерии туберкулеза, но выделить чистую культуру возбудителя болезни ему не удалось.

Чистую культуру возбудителя гемофилезного полисерозита выделили в 1922 г. С. Шермер и Р. Эрлих.

Возбудитель гемофилезного полисерозита относят к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Gamma proteobacteria*, порядку *Pasteurellales*, семейству *Pasteurellaceae*, роду *Haemophilus* (род включает 15 видов) и виду *Haemophilus* (син. *Glaesserella parasuis*).

Морфология. Возбудитель болезни *H. parasuis* – мелкие полиморфные палочки длиной 0,3–0,5 мкм, шириной 0,2–0,3 мкм или коккобактерии, грамотрицательные, неподвижные, спор не образуют, формируют капсулу. Диссоциированные культуры состоят из более крупных и грубых бактерий, лишенных капсулы.

Капсулу у возбудителя выявляют по методу Гинса. Для этого черную тушь разводят дистиллированной водой 1:3. В капле туши на стекле делают препарат-мазок, фиксируют спиртом 3–5 мин, затем наносят на 3–5 мин карболовый фуксин Циля, разведенный дистиллированной водой 1:3. Препарат-мазок промывают, высушивают и микроскопируют. В поле зрения микроскопа на темном поле будут видны красные бактерии, вокруг которых светлая зона – неокрашенная капсула.

В препаратах из патологического материала бактерии расположены в виде коротких цепочек, небольших скоплений, диплобактерий, одиночных клеток.

Культуральные свойства. Возбудитель гемофильного полисерозита является факультативным анаэробом. Температурный оптимум культивирования – 37–38 °С, оптимальное значение рН сред 7,2–7,6. Гемофильные бактерии в ходе эволюции утратили способность самостоятельно синтезировать некоторые коферменты, обеспечивающие процессы дыхания, окислительно-восстановительные процессы. В ходе паразитирования источником необходимых биологически активных веществ для гемофилов являются ткани макроорганизма. В лабораторных условиях для их культивирования нужны специальные питательные среды, содержащие ростовые факторы: гемин (фактор X), никотинамидадениндинуклеотид (НАД, фактор V), который иначе называют дифосфопиридиннуклеотидом (ДПН). Источником упомянутых факторов являются эритроциты крови, дрожжевой экстракт, продукты жизнедеятельности некоторых бактерий или чистые гемин и ДПН, выпускаемые биологической промышленностью, добавляемые в питательные среды из расчета 10–20 мкг/мл. Потребность в ростовых факторах – специфический признак гемофильных бактерий.

Для выращивания гемофилов предложено большое количество питательных сред. Наилучшими питательными средами являются «шоколадный» агар, агар и бульон Левинталя, сывороточно-дрожжевой агар.

В практике для выделения культур из патологического материала часто используют кровяной МПА с баккормилкой. Готовят его следующим образом: к 100 мл расплавленного и охлажденного до 45–50 °С стерильного 2%-го МПА прибавляют 5–10 % крови барана. Затем

агар в чашке подсушивают в термостате 30–40 мин, поместив крышкой вверх, после чего стерильным шпателем распределяют патологический материал или культуру по всей поверхности среды, затем снова подсушивают в термостате и бакпетлей делают посев по диаметру чашки бактериальной культуры негемолитического штамма эшерихий (*E. coli*), белого стафилококка или сенной палочки (*B. subtilis*).

Гемофильные бактерии в зоне 1–2 см от штриха дают видимый рост колоний, так как засеянные по штриху бактерии выделяют в агаровую среду ростовые факторы, стимулирующие рост гемофилов. Колонии *H. parasuis* мелкие (0,1–0,2 мм в диаметре), правильной круглой формы, с гладкой выпуклой блестящей поверхностью, слизистой консистенции (рис. 18.1).



Рис. 18.1. Рост *Haemophilus parasuis* на кровяном агаре с баккормилкой

Бактерии хорошо растут на «шоколадном» агаре. Для его приготовления к расплавленному 2%-му МПА добавляют 10 % стерильной дефибрированной крови барана, лошади или кролика. Агар годен к применению в течение 8–10 сут при условии хранения в темном месте при 5–8 °С.

Колонии бактерий на поверхности «шоколадного» агара выпуклые, блестящие, размером от 0,5 до 0,8 мм в диаметре.

В полужидком агаре с сывороткой и V-фактором бактерии растут по месту укола в виде серо-белого стержня.

Для культивирования возбудителя гемофилезного полисерозита используют в качестве жидкой питательной среды бульон Левинтала, который готовят на основе сердечно-мозгового бульона. В этом бульоне через 48–72 ч наблюдают помутнение среды с образованием неопытного слизистого осадка.

На поверхности сывороточно-дрожжевого агара образуются довольно крупные (0,5–0,9 мм), выпуклые, с ровными краями, слизистой консистенции колонии.

Биохимические свойства. Для *H. parasuis* характерны каталазная активность, редукция нитратов, отсутствие способности выделять индол, уреазу, гемолизин, оксидазу, свертывать и пептонизировать молоко. Возбудитель расщепляет глюкозу, сахарозу, мальтозу.

Антигенная структура. Впервые серологическую неоднородность *H. parasuis* доказал К. Бакос. По капсульному антигену различают пять серогрупп – А, В, С, D, N. Наиболее вирулентными являются бактерии серогрупп А и D. По соматическому антигену различают 15 сероваров. Самыми вирулентными и распространенными в Европе и Северной Америке являются серовары № 1, 2, 4, 5 и 7. Несколько реже встречаются серовары № 3, 12, 13 и 14.

Устойчивость. В почве, воде и других объектах внешней среды в зимнее время возбудитель может не терять своей жизнеспособности и вирулентности в течение 3 мес., а в летнее время – до 1,5 мес. В замороженной свинине бактерии сохраняются до 6 мес., в охлажденной – до 15 сут, а в солонине – до 30 дней. Высокая температура быстро разрушает гемофилов. Возбудитель быстро инактивируется обычными дезсредствами и чувствителен ко многим антибиотикам. В случае применения антибактериальных препаратов при лечении животных необходимо определять устойчивость выделенных бактерий по отношению к конкретному антибиотику.

Патогенность. Болезнь поражает в основном поросят через 10–15 дней после отъема от свиноматок. Известны случаи заболевания поросят-сосунов. На уровень заболеваемости большое влияние оказывают различные неблагоприятные факторы: преждевременный отъем поросят от свиноматок, перегруппировка, совместное содержание свиней разного возраста, переохлаждение, перегревание, неудовлетворительное кормление и т. д. Из лабораторных животных чувствительны к возбудителю болезни морские свинки.

Источником возбудителя болезни являются больные и переболевшие поросята, а также свиноматки – носители гемофильных бактерий. Патогенные бактерии обнаруживаются на слизистой оболочке носовой полости у 48–70 % клинически здоровых свиней. Заражение животных происходит главным образом аэрогенным путем, но не исключено проникновение возбудителя в организм с кормом, контаминированным бактериями. Факторы патогенности *H. parasuis* – экзо- и эндотоксины.

Увеличение количества очагов болезни наблюдают при распространении вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней.

Патогенез. Проникший через слизистые оболочки носоглотки возбудитель заносится кровью на серозные оболочки и, обладая выраженным тропизмом, интенсивно на них размножается, вызывая продуктивное воспаление с обильным выпотом серозного экссудата. Под влиянием находящихся в экссудате протеаз микроб разрушается, и из него высвобождаются эндотоксины, которые усугубляют патологические процессы в организме. В дальнейшем в экссудате появляются пленки фибрина и в случае выздоровления (рассасывание экссудата) у больных образуются фибриновые спайки эпикарда сердца с эпикардом околосердечной сумки, между петлями кишечника и между реберной и легочной плеврой. Накопление возбудителя в суставных сумках приводит к развитию хромоты.

Лабораторная диагностика. При диагностике гемофильного пеницилроза учитывают эпизоотологические данные, клинические признаки и результаты патолого-анатомического вскрытия. Решающее значение имеет лабораторное исследование патологического материала.

Для бактериологического исследования отбирают материал от 3–4 нелеченых вынужденно убитых или павших поросят, но не позднее 4–6 ч после гибели с характерными признаками острого течения болезни.

В стерильную колбу отбирают пробы экссудата из грудной полости и перикарда с соскобами фибрина с серозных оболочек, синовиальной жидкости пораженных суставов, кусочки легких, отобранные на границе пораженной и здоровой ткани, средостенные и бронхиальные лимфатические узлы, селезенку и сердце с кровью. Патологический материал должен быть взят и доставлен не позднее 12 ч с момента гибели или убоя животных при условии хранения его в охлажденном состоянии при 4–6 °С. Замораживание не допускается. Отобранный позднее материал непригоден к исследованию.

Лабораторная диагностика включает исследование исходных проб патологического материала, посевы на питательные среды с целью выделения культур возбудителя, идентификацию изолированных культур и постановку биопробы.

Из исследуемого материала делают мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и Гинсу для обнаружения капсул. Для выделения культуры возбудителя из патологического материала делают посев на кровяном МПА с баккормилкой. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 24 ч.

При получении чистой культуры ее пересевают для дальнейшей идентификации на «шоколадный» агар в чашках — для постановки биопробы; МПА и МПБ — для подтверждения зависимости гемофильных бактерий от ростовых факторов; агаровую среду с мочевиной — для определения уреазной активности; сывороточно-дрожжевой МПБ в пробирках — для посева на биохимический (цветной) ряд; полужидкий агар — на подвижность.

Культуры, которые не обладают гемолитическими свойствами и уреазной активностью, не растут на МПА и в МПБ. Культуры, дающие рост на «шоколадном» агаре и в сывороточно-дрожжевом МПБ, относят к *H. parasuis*.

Патогенность выделенной культуры *H. parasuis* определяют на трех морских свинках, которых заражают внутрибрюшинно, смывом с «шоколадного» агара, в дозе 2,5 мл с концентрацией 2 млрд микробных клеток /мл. Наблюдение за свинками ведут в течение 10 сут. При гибели даже одной свинки культуру признают патогенной.

Лабораторный диагноз считают установленным при выделении из патологического материала культуры *H. parasuis*, патогенной для морских свинок.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет изучен недостаточно. Для специфической профилактики болезни во многих странах, в том числе и в Беларуси, применяют инактивированные вакцины, а для лечения больных свиней — антибиотики и сульфаниламидные препараты.

Глава 19 ВОЗБУДИТЕЛЬ АКТИНОБАЦИЛЛЯРНОЙ ПЛЕВРОПНЕВМОНИИ СВИНЕЙ

Актинобациллярная (гемофилезная) плеввропневмония свиней — инфекционная контагиозная болезнь, характеризующаяся при остром течении геморрагическим воспалением легких и фибринозным плевритом, лихорадкой, септицемией, а при подостром и хроническом — очаговой гнойной некротизирующей пневмонией и фибринозным плевритом.

Впервые о гемофилезной плевропневмонии в 1961 г. сообщили П. Метью и П. Патиссон. Научное описание болезни дал в 1963 г. Х. Оландер. В хозяйствах Калифорнии он наблюдал септически протекающую болезнь свиней и из пораженных легких животных изолировал гемоглобинофильный микроорганизм, который был назван ученым *Haemophilus parahaemolyticus*.

Возбудителя актинобациллярной плевропневмонии относят к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Pasteurellales*, семейству *Pasterellaceae*, роду *Actinobacillus* (род представлен 19 видами), виду *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Морфология. *A. pleuropneumoniae* – палочки или коккобактерии длиной 0,4–0,5 мкм, шириной 0,3–0,4 мкм, грамтрицательные, неподвижные, образуют капсулу (выявляемую по методу Гинса), не формируют спор. Микробы проявляют широкий диапазон морфологической изменчивости. Значительный полиморфизм отмечают у 4–6-часовых культур, где можно обнаружить нитевидные, длинные и изогнутые палочки. При окраске препаратов, приготовленных из 18–24-часовых агаровых, 12–18-часовых бульонных культур, можно выявить при микроскопии биполярное окрашивание бактерий.

Культуральные свойства. Возбудитель актинобациллярной плевропневмонии является факультативным анаэробом. Температурный оптимум культивирования – 37–38 °С, оптимальное значение рН питательных сред 7,2–7,6. Бактерии на обычных средах не растут. В лабораторных условиях для их культивирования (как и для *Haemophilus parasuis*) нужны специальные питательные среды, содержащие ростовые факторы: гемин, никотинамидадениндинуклеотид (НАД, фактор V), который иначе называют дифосфопиридиннуклеотидом. Наилучшими питательными средами являются «шоколадный» агар, агар и бульон Левинталя, сывороточно-дрожжевой агар, кровяной МПА с бактеримилкой, бульон Хоттингера или простой бульон с ДПН.

На поверхности сывороточно-дрожжевого агара и агара Левинталя формируются крупные колонии (мукоидные – М-форма), достигающие в диаметре 1,5–2 мм и мелкие (S-форма) размером до 0,6 мм. Колонии S- и М-типа флюоресцируют в косопроходящем свете. На «шоколадном агаре» образуются колонии двух типов: крупные диаметром 1–1,8 мм и мелкие размером от 0,2 до 0,5 мм. Колонии на агаре круглые, правильной формы, выпуклые, серо-белого цвета, слизистые (рис. 19.1).



Рис. 19.1. Рост *Ac. pleuropneumoniae* на «шоколадном» агаре

На кровяном агаре с баккормилкой (рис. 19.2) – мелкие колонии (0,15–0,3 мм в диаметре) на расстоянии 0,3–1,5 см от засеянной кормилки. Колонии имеют ровные края, выпуклую поверхность, серо-белый цвет. По мере удаления от штриха баккормилки колонии уменьшаются в размере. При посеве на свежеприготовленный кровяной агар культур с признаками диссоциации или патологического материала с большим содержанием белка наблюдается рост не только вблизи баккормилки, но и по всей поверхности среды. Возбудитель актинобациллярной плевропневмонии обладает гемолитической активностью, поэтому колонии окружены светлой зоной гемолиза. Однако надо учитывать, что существуют негемолитические штаммы *Actinobacillus pleuropneumoniae*.



Рис. 19.2. Рост *Ac. pleuropneumoniae* на кровяном агаре с баккормилкой

В бульоне Хоттингера и МПБ с добавлением в среды ростового фактора актинобациллы вызывают равномерное помутнение сред и

образование на дне пробирки небольшого осадка, легко разбивающегося при встряхивании.

Необходимо иметь в виду, что культуры *Ac. pleuropneumoniae* при многократных посевах на искусственных питательных средах и длительном хранении диссоциируют. Такие культуры на плотных средах формируют колонии серо-белого цвета, полупрозрачные, с неровными краями, утратившие способность флюоресцировать, имеющие в косопроходящем свете серый цвет с красноватым оттенком. С течением времени такие колонии покрываются белым налетом и утрачивают прозрачность.

Биохимические свойства. Ферментацию углеводов изучают в жидких и полужидких средах, в которые добавляют 0,2 % сахаров и стерильные растворы ДПН и гемина из расчета 10 мкг/мл. Более воспроизводимые результаты удается получить с помощью микрометода: в малый объем питательной среды, содержащий углевод, но не имеющих ростовых факторов, вносят достаточно большое количество бактериальной массы изучаемой культуры. Обычно берут жидкую среду Писса в объеме 0,5 мл и вносят две бакпетли изучаемой культуры, выращенной на какой-либо плотной оптимальной питательной среде. Пробирки инкубируют при 37–38 °С, результаты учитывают через 4, 6 и 18 ч. Обязательно проводят параллельное инкубирование контрольных, незасеянных пробирок с углеводами.

Ac. pleuropneumoniae редуцирует нитраты, образует уреазу, не образует индол и сероводород, не утилизируют цитраты, ферментируют глюкозу, сахарозу, маннит, маннозу, декстрозу с образованием кислоты без газа.

Антигенная структура. По капсульному антигену установлено 15 серовариантов возбудителя болезни, которые не различаются по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам. Болезнь у свиней чаще всего вызывают 1-й и 2-й сероварианты. Специфичность возбудителя обуславливают антигены, локализующиеся в капсуле.

По типу продуцируемых токсинов, вирулентности и иммуногенности различают пять групп бактерий. Классификация штаммов возбудителя по типу токсинов имеет значение при расшифровке механизма патогенеза и их отборе для производства специфических препаратов.

Устойчивость. Возбудитель довольно устойчив к воздействию факторов внешней среды. В почве, воде, навозе, на бетонных и металлических конструкциях помещений он не теряет своей жизнеспособ-

ности в зимнее время более 3 мес., весной, осенью и летом до 50 дней. В замороженной свинине возбудитель выживает до 6 мес., в охлажденной — 15 сут, в соленой — до месяца.

Высокая температура действует на возбудителя губительно, хлорсодержащие препараты обеззараживают быстро и надежно дезинфицируемые объекты от бактерий.

Возбудитель чувствителен ко многим антибиотикам. Однако выбор наиболее эффективного антибиотика для лечения больных основан на предварительном определении чувствительности актинобациллюсов к конкретному препарату.

Патогенность. Актинобациллюсы продуцируют термолabileные и термостабильные цитотоксины, а также бета-гемолизин.

Восприимчивы свиньи всех возрастов и пород независимо от сезона года. Из лабораторных животных чувствительны морские свинки и белые мыши при внутрибрюшинном и интраназальном способах заражения.

Заражение животных происходит аэрогенно: микроорганизм попадает в органы дыхания, в том числе легкие, здоровых свиней в виде капельного и пылевого аэрозоля, поэтому заболевание плевропневмонией быстро распространяется среди свинополовья, содержащегося в помещениях с недостаточной вентиляцией и большой запыленностью.

При первичном заносе возбудителя сероварианта первой группы в хозяйстве заболевают свиньи всех возрастов, но особенно 2–6-месячного возраста. Заболеваемость в этом случае достигает почти 100 %, а летальность с учетом интенсивности лечения — до 70–80 %. В последующем болезнь охватывает молодняк 45–90-дневного и более старшего возраста, а также подсосных поросят.

Заболеваемость (в зависимости от того, к какой группе принадлежит возбудитель) может колебаться от 10–15 до 90–100 %, летальность — от 10 до 50 %.

Патогенез. Возбудитель, попадая в средние и мелкие бронхи с вдыхаемым воздухом, начинает размножаться и выделять токсины, обладающие гемолитическими и цитотоксическими свойствами. Цитотоксины подавляют функцию макрофагов легких, вызывают очаговый некроз легочных клеток, в результате чего в легких формируется первичный геморрагический некротизирующий очаг. При разрушении клеток освобождается большое количество дифосфолипидов (ростовой фактор для возбудителя) и интенсивность размножения бактерий усиливается. Развиваются септицемия и токсемия,

причем токсины сенсибилизируют легочные клетки. Размножившиеся в крови микроорганизмы и их токсины действуют на сенсибилизированную легочную ткань, в результате чего развиваются геморрагические и некротические поражения больших участков диафрагмальных долей легких. Токсикоз, сепсис и обширные поражения легких приводят в течение нескольких часов к гипоксии и смерти от эндотоксического шока и удушья. Животные, у которых произошло купирование первичного очага и не развилась септицемия, выживают, у них вырабатываются антитоксические и антибактериальные антитела, но они остаются бактерионосителями.

Лабораторная диагностика. Актинобациллярную плевропневмонию диагностирует на основании анализа эпизоотических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений, результатов лабораторного исследования.

Для бактериологического исследования отбирают материал от 1–4 нелеченых, вынужденно убитых или павших поросят, но не позднее 4–6 ч после гибели с характерными признаками острого течения болезни.

В лабораторию посылают кусочки пораженных легких, взятые на границе пораженной и здоровой ткани, средостенные и бронхиальные лимфоузлы, селезенку и сердце с кровью.

Патологический материал должен быть взят и доставлен не позднее 12 ч с момента гибели или убоя животных при условии хранения его в охлажденном состоянии при 4–6 °С, замораживание не допускается.

Отобранный позднее материал непригоден к исследованию.

Лабораторная диагностика включает исследование исходных проб патологического материала, посевы на питательные среды с целью выделения культур возбудителя, идентификацию изолированных культур и постановку биопробы.

Из присланного материала делают мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и по Гинсу для обнаружения капсул. Для выделения культуры возбудителя из патологического материала делают посев на кровяной МПА с баккормилкой. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 24 ч.

После получения чистой культуры ее пересевают для дальнейшей идентификации на «шоколадный» агар в чашках — для постановки биопробы; на МПА и в МПБ — для подтверждения зависимости актинобациллюсов от ростовых факторов; на агаровую среду с мочевиной — для определения уреазной активности; на сывороточно-дрож-

жевой МПБ в пробирках — для посева на биохимический (цветной) ряд; на полужидкий агар — на подвижность.

Культуры, обладающие гемолитическими свойствами и уреазной активностью, не растущие на МПА и МПБ, но дающие рост на «шоколадном» агаре и в сыровоточно-дрожжевом МПБ относят к *Ac. pleuropneumoniae*.

Патогенность выделенной культуры *Ac. pleuropneumoniae* определяют на трех белых мышах, которых заражают внутрибрюшинно, смывом с «шоколадного» агара в дозе 0,5 мл с концентрацией 1 млрд микробных клеток/мл. Наблюдение за животными ведут в течение 72 ч. При гибели двух и более лабораторных животных культуру признают патогенной.

Лабораторный диагноз считают установленным при выделении из патологического материала культуры *Ac. pleuropneumoniae*, патогенной для белых мышей.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. У переболевших свиней формируется иммунитет, предохраняющий их от повторного заболевания. Для специфической профилактики болезни применяют инактивированные вакцины.

Для лечения больных свиней рекомендуют использовать антибиотики, сульфаниламидные и нитрофурановые препараты. Специфических средств лечения не существует.

Глава 20 ВОЗБУДИТЕЛИ ПАСТЕРЕЛЛЕЗОВ

Пастереллез (синоним — геморрагическая септицемия) — инфекционная контагиозная болезнь, характеризующаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением легких, плевритом и отеками в различных областях тела, а при подостром и хроническом течении — гнойно-некротизирующей пневмонией, артритом, маститом, кератоконъюнктивитом, эндометритом, иногда энтеритом. К пастереллезу восприимчив и человек, проявляется в виде пищевых токсикоинфекций.

Болезнь известна давно, но впервые ее научное описание дал в 1877 г. Д. Ривольт. В 1878 г. Д. Боллингер описал пастереллез у крупного рогатого скота, в 1888 г. Ф. Леффлер — у свиней.

Впервые возбудителя холеры кур в чистой культуре выделил Л. Пастер в 1880 г., который опытным путем снизил вирулентность культур бактерий, сконструировал вакцину и осуществил вакцинацию птиц. В честь его заслуг возбудитель холеры кур в 1910 г. был назван пастереллой, а болезнь, вызываемая им, — пастереллезом.

Возбудителей пастереллезозов относят к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Pasteurellales*, семейству *Pasteurellaceae*, роду *Pasteurella* (род представлен девятью видами), роду *Mannheimia* (род представлен пятью видами).

Основное этиологическое значение в инфекционной патологии животных принадлежит двум видам: *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* (*Pasteurella haemolytica*). Вид *P. multocida* включает три подвида: *multocida subsp. gallicida*, *multocida subsp. multocida*, *multocida subsp. septica*.

P. multocida является возбудителем геморрагической септицемии животных, холеры птиц, а также легочных пастереллезозов, осложняющих респираторные инфекции вирусной и микоплазменной этиологии.

M. haemolytica вызывает у крупного рогатого скота и овец всех возрастов пневмонию, а также септицемию новорожденных ягнят.

Морфология. Пастереллы в препаратах для микроскопии, приготовленных из органов, тканей, крови, представляют собой мелкие овальной формы палочки. Они короткие, длина — 0,3–5,0 мкм, ширина — 0,15–1,2 мкм. Размер пастерелл — показатель довольно вариабельный. В препаратах-мазках из культур пастереллы более полиморфны, чем в препаратах, приготовленных из патологического материала. В препаратах из культур пастереллы могут иметь вид нитей, моно-, диплококков и даже стрептококков. Морфологически возбудители пастереллеза разных видов животных и птиц не различаются, но многие исследователи считают, что культуры, выделенные от крупного рогатого скота, отличаются однородностью и бактерии имеют слегка вытянутую форму. Микробы, изолированные от овец и свиней, — овальные, от птиц — округлые. Пастереллы, относящиеся к виду *P. multocida*, морфологически неотличимы от бактерий, принадлежащих к виду *M. haemolytica*.

Пастереллы грамотрицательные, неподвижные, спор не образуют. Вирулентные штаммы в организме животных (чаще птиц и свиней) и

в свежих культурах формируют слизистую капсулу. По Романовскому–Гимзе, Леффлеру, Новикову окрашиваются биполярно. Биполярность наблюдается при окраске метиленовым синим и карболфуксином (рис. 20.1).

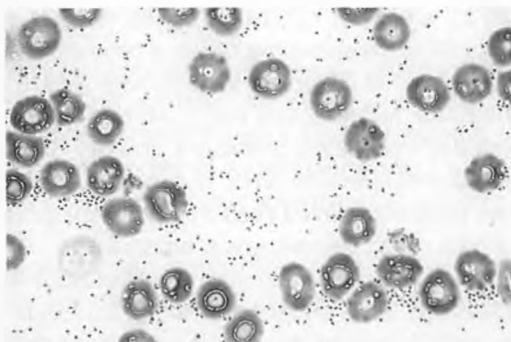


Рис. 20.1. *P. multocida* в патматериале, окраска по Романовскому–Гимзе

Культуральные свойства. Пастереллы – факультативные анаэробы. Оптимальная температура роста – 37–38 °С, рН среды 7,2–7,4. Для выделения и поддержания культур используют глюкозосывороточные МПА и МПБ (на обычных МПА и в МПБ растут, но не всегда удовлетворительно), бульон и агар Хоттингера.

В жидких средах впервые дни выращивания (24–48 ч) пастереллы дают легкое равномерное помутнение, в дальнейшем (на 4–5-й день) на дне пробирки образуется характерный слизистый осадок, поднимающийся при встряхивании пробирки в виде косички с просветлением бульона.

На плотных средах пастереллы растут в виде нежных, мелких серовато-белых колоний, диаметром 1–3 мм, слегка опалесцирующих в проходящем свете.

При многократных пересевах на питательных средах культуры диссоциируют, образуя три типа колоний: слизистые (М-форма), гладкие (S-форма) и шероховатые (R-форма). Слизистые колонии наиболее крупные, имеют серо-белый цвет, гладкие края и характерную влажную поверхность. Гладкие колонии бывают двух видов – радужные и нерадужные (серые), располагающиеся изолированно. Слизистые гладкие колонии дают обычно свежeweделенные штаммы. R-формы пастерелл образуют непрозрачные шероховатые с неровными краями колонии. S- и М-формы пастерелл имеют капсулы, а R-формы их не имеют.

На кровяном агаре пастереллы образуют слегка выпуклые, просвечивающиеся, влажные, блестящие колонии. На кровяном агаре с кровью крупного рогатого скота вокруг колоний *M. haemolytica* образуется зона β -гемолиза, на агаре с кровью кролика, барана гемолитические свойства обнаруживаются только после снятия колонии с поверхности питательной среды. При росте *P. multocida* на кровяном агаре гемолиз отсутствует.

Биохимические свойства. Ферментативная активность пастерелл выражена слабо и проявляется непостоянно.

P. multocida расщепляет с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу, маннозу, маннит, вырабатывает индол, дает положительную реакцию на каталазу и отрицательные реакции с метиловым красным и Фогеса—Проскауэра.

M. haemolytica отличается от *P. multocida* тем, что расщепляет лактозу, мальтозу, не вырабатывает индол.

Антигенная структура. Пастереллы имеют сложную антигенную структуру. Установлено, что пастереллы имеют неустойчивую к температуре капсулу и термостабильный соматический антиген. Капсула содержит растворимую антигенную субстанцию полисахаридной природы — К-антиген. По его составу штаммы *P. multocida* разделяют на пять серовариантов: А, В, D, Е и F. Доказано, что строгой видовой специфичности у штаммов пастерелл разных серологических вариантов не существует. Однако серовар А обычно выделяют от больной пастереллезом птицы. Серовар В вызывает острые вспышки пастереллеза у животных, а серовары А и D изолируют, как правило, от животных с заболеванием органов дыхания. Пастереллы серологического варианта Е в Беларуси не зарегистрированы, встречаются в Африке. Серовар F выделен от индеек.

Антигенные свойства *M. haemolytica* существенно отличаются от *P. multocida*. Выделяют биотипы А и Т. Биотип А вызывает пневмонию у крупного рогатого скота и овец, биотип Т — септицемию у новорожденных ягнят.

Патогенность. Пастереллы патогенны для всех видов домашних животных. Наиболее восприимчивы к пастереллезу свиньи, крупный рогатый скот, куры. Болеют олени, овцы, относительно устойчивы к возбудителям болезни лошади и плотоядные. Из лабораторных животных чувствительны к возбудителям болезни кролики, белые мыши, голуби. В последние годы установлена патогенность пастерелл и для человека.

Пастереллы обоих видов образуют истинные токсины и эндотоксины. Септическое течение пастереллеза, тяжелый характер патолого-анатомических изменений и быстрая гибель животных объясняются высокой токсичностью возбудителя этой болезни.

Патогенез. В организм животных пастереллы проникают обычно аэрогенным и алиментарным путями, реже через кожный покров. Попав в организм, они быстро размножаются, проникают в лимфу, кровь, вызывая септицемию и гибель животного. Генерализации инфекционного процесса способствует подавление пастереллами активности фагоцитов, образование токсических веществ, вызывающих повреждение капилляров. В результате этого возникают отеки в подкожной клетчатке и мышцах, развивается геморрагический диатез, нарушается кровообращение, наступает омертвление тканей.

Устойчивость. Пастереллы относительно малоустойчивы во внешней среде. В навозе, воде, почве выживают в течение 2–3 нед., в трупах — до 4 мес. В замороженном мясе могут сохраняться до 1 года. Под действием прямых солнечных лучей бактерии гибнут через 2–3 мин. Культуры микробов при температуре 70–90 °С погибают в течение 5–10 мин.

Для дезинфекции эффективными являются обычные дезрастворы: 1%-й раствор хлорной извести, 3–5%-е растворы карболовой кислоты, 5%-й раствор формальдегида и др.

Лабораторная диагностика. Включает микроскопию мазков, выделение чистых культур бактерий, их идентификацию, постановку биопробы.

Для посмертной бактериологической диагностики пастереллеза в лабораторию направляют 2–3 трупа мелких животных, от крупных животных — сердце с перевязанными сосудами, части селезенки, печени, почек, экссудат из грудной полости и трубчатую кость. При поражении легких берут их кусочки (5 × 5 см) на границе нормального и измененного участков, миндалины, бронхиальные, средостенные и заглочные лимфоузлы.

Для диагностики пастереллеза птиц в лабораторию, кроме свежих трупов, направляют 5–6 живых птиц с явными признаками болезни. Больную птицу убивают в лаборатории и делают высевы из костного мозга, сердца, печени и селезенки.

Материал берут от павших (не позднее 3–5 ч после гибели) или убитых животных, не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами. Из каждой пробы присланного материала делают пре-

параты для микроскопии, окрашивают по Леффлеру или Романовскому—Гимзе, микроскопируют. В положительном случае в поле зрения микроскопа пастереллы выглядят как овоидные или короткие палочки с закругленными концами и заметной биполярностью, вокруг которых может быть видна прозрачная капсула.

Посевы из патологического материала делают на МПА и в МПБ с добавлением 10 % нормальной сыворотки крови лошади и 1 % глюкозы или бульон и агар Хоттингера. Посевы инкубируют в термостате при 37 °С 24—48 ч.

У выделенных культур изучают морфологические, тинкториальные и ферментативные свойства. В мазках из культур при окраске по Граму пастереллы имеют вид грамотрицательных овоидов или коккобактерий, расположенных одиночно или попарно.

Идентификацию культур проводят по ферментативным свойствам. Суточную агаровую культуру высевают на среды Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннозой, маннитом, мальтозой, кровяной МПА.

Биопробу проводят с целью выделения культуры возбудителя из исследуемого материала и определения патогенности выделенных культур пастерелл.

С целью выделения пастерелл из исследуемого материала готовят суспензию (1:10) и вводят подкожно в объеме 0,2 мл белым мышам. При данном способе заражения удастся выявить наличие вирулентных штаммов *P. multocida*. За животными наблюдают в течение недели.

Для проверки патогенных свойств выделенных культур *P. multocida* суточной бульонной культурой заражают в дозе 0,2 мл подкожно белых мышей массой 16—18 г. Вирулентные штаммы (обычно серовар В) вызывают гибель животных в течение 24—72 ч, культуры сероваров А и D — в пределах 7 сут. Патогенность культур, выделенных от птицы, проверяют на мышках или цыплятах. В последнем случае используют 90—120-дневных цыплят, которым культуру пастерелл в дозе 0,1 мл вводят внутримышечно.

Культуры *M. haemolytica* вызывают гибель белых мышей только при внутрибрюшинном заражении.

Диагноз на пастереллез считают установленным в одном из следующих случаев:

при выделении из патологического материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя пастереллеза, и установлении ее патогенности на лабораторных животных.

при гибели хотя бы одного лабораторного животного из двух зараженных исходным материалом и выделении из его органов культуры со свойствами, характерными для возбудителя пастереллеза, если даже в посевах из исходного материала культуры возбудителя не выделено.

Срок исследования – до 10 сут.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. У переболевших животных формируется нестерильный иммунитет.

Для активной профилактики пастереллеза у животных используют эмульгированные и гидроокисьалюминевые вакцины.

Для пассивной профилактики болезни и лечения больных животных применяют гипериммунную противопастереллезную сыворотку.

Глава 21 ВОЗБУДИТЕЛЬ БОРДЕТЕЛЛЕЗА СВИНЕЙ

Бордетеллез (синонимы – бордетеллезная инфекция, бронхосептикоз, непрогрессивный атрофический ринит) – инфекционная болезнь, характеризующаяся развитием катарально-гнойного ринита, катарально-гнойной пневмонии, сопровождающаяся чиханьем, сухим кашлем, незначительной атрофией носовых раковин, отставанием в росте и развитии.

Впервые бордетелл (возбудитель коклюша – *Bordetella pertussis*) выделили у человека и описали в 1906 г. бельгийский ученый Ж. Борде и французский – О. Жангу. *Bordetella bronchiseptica* впервые описана Н. Ферри в 1910 г. Первоначально этот микроорганизм был назван *Bacillus bronchicanis*, поскольку впервые был выделен от собак, страдающих кашлем. В 1912 г. аналогичный вид микроорганизмов выделен из дыхательных путей морских свинок, обзьян и людей, вследствие чего бактерия получила название *Bacillus bronchisepticus*. Родовая принадлежность палочки бронхосептикоза с момента ее выделения много раз пересматривалась. В

бордетелл изменяются и зависят от фазы роста микроорганизмов, состава среды культивирования, количества пассажей и т. д.

Патогенность. К *Bor. bronchiseptica* наиболее восприимчивы свиньи, собаки, кошки, дикие плотоядные и морские свинки. Наиболее часто бордетеллезом заражаются 4–5-дневные поросята, у которых болезнь проявляется пневмонией и ринитом, при инфицировании до 4-недельного возраста чаще развивается пневмония. Значительно реже бордетеллезная пневмония обнаруживается у свиней в 4–8-месячном возрасте, еще реже в возрасте 1–2 лет. У человека *Bor. bronchiseptica* вызывает заболевания верхних дыхательных путей. Из лабораторных животных чувствительны кролики, морские свинки и белые мыши.

Источником возбудителя являются больные, выделяющие бактерий при чиханье и кашле, с носовыми истечениями. Особую опасность представляют взрослые животные.

Эпизоотологической особенностью бордетеллеза является медленное на 2–3-й год распространение болезни после завоза свиней из неблагополучных хозяйств, хроническое течение, стационарность на протяжении многих лет.

Патогенез. Попад в дыхательные пути, *Bor. bronchiseptica* прикрепляется к реснитчатым клеткам респираторного тракта, где в процессе своей жизнедеятельности вырабатывает токсины, нарушающие местные защитные механизмы. Последние подавляют активность ресничек мерцательного эпителия и фагоцитоз. Постоянное раздражение рецепторов дыхательных путей обуславливает кашель. Патологический процесс, развивающийся в слизистой оболочке и более глубоких тканях, вызывается термолabileм эндотоксином. Вначале наступает атрофия ресничек слизистой оболочки носовой раковины, затем гиперплазия эпителиальных клеток. По мере аспирации бордетелл в нижележащие органы дыхательной системы развивается катарально-пневмоническая пневмония. На более поздней стадии болезни начинает разрываться, а затем истончаться костная структура носовых раковин.

Устойчивость. В условиях животноводческих помещений бордетеллы сохраняют жизнеспособность 16 дней, в замороженном состоянии – свыше 120 дней, в лиофилизированном – многие годы. Губительно действуют на них прямые солнечные лучи, температура 90 °C и выше.

Обычные дезинфицирующие вещества – 2–3%-й раствор натрия гидроксида, 1%-й раствор формальдегида, 20%-я взвесь свежегашеной

известни, 3%-й раствор фенола и др. — инактивируют бордетелл в течение нескольких часов.

Лабораторная диагностика. Для прижизненной бактериологической диагностики в лабораторию направляют носовую слизь, посмертно — пораженные участки легких на границе со здоровыми, бронхиальные лимфатические узлы, кусочки печени, селезенки, головной мозг, сердце с кровью.

Из поступившего материала готовят мазки, окрашивают по Граму. Бордетеллы выглядят как мелкие грамотрицательные коккобактерии, длиной 0,5—2,0 мкм, шириной — около 0,5 мкм. Часто окрашиваются биполярно, расположены в мазках одиночно, реже короткими цепочками.

Из патологического материала проводят посевы на питательные среды МПБ, МПА, казеиново-угольный агар, кровяной агар.

Идентификацию выделенных культур проводят по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам. В положительных случаях уже через 24 ч на поверхности агара появляются почти прозрачные, блестящие колонии величиной с булавочную головку. Через 48 ч они приобретают серо-белый цвет. В жидких средах бордетеллы растут, вызывая равномерное помутнение среды с последующим образованием осадка и пристеночного кольца, на кровяном агаре — золотистые колонии с зоной β -гемолиза.

Биохимические свойства изучают путем посева выделенной чистой культуры на среды Гисса, определяют уреазную, оксидазную и каталазную активность, способность усваивать цитрато-аммонийные соли. Для *Bor. bronchiseptica* характерно полное отсутствие активности к сахарам и многоатомным спиртам, продуцирование уреазы, оксидазы, каталазы, усвоение цитрато-аммонийных солей.

Для определения патогенности выделенных культур ставят биопробу на трех белых мышах, которых заражают внутрибрюшинно смывом суточной агаровой культуры в дозе 0,5 мл с концентрацией 1 млрд м.к./мл. Наблюдение за животными ведут в течение 5 дней. Биопробу считают положительной при гибели не менее двух из трех зараженных лабораторных животных и выделении от них исходной культуры.

Для серологической диагностики бордетеллеза используется РА.

Диагноз на бордетеллез считается установленным при выделении из патологического материала культуры бактерии со свойствами, характерными для возбудителя бордетеллеза, патогенной для лабораторных животных.

Обнаружение антител к антигену *Bor. bronchiseptica* в сыворотке крови больных поросят в титре 1:40 и выше является ретроспективным диагнозом на бордетеллез.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Переболевшие животные приобретают иммунитет слабой напряженности. Для активной специфической профилактики болезни используют вакцину против бордетеллеза и пастереллеза свиней, а также вакцины против атрофического ринита. Для пассивной специфической профилактики и лечения больных животных применяют гипериммунную сыворотку против пневмонии свиней, содержащую антитела к *Bor. bronchiseptica* и *P. multocida* (типов А, В, D).

Против бордетелл достаточно высокоэффективны препараты тетрациклинового ряда (окситетрациклин, хлортетрациклин, доксициклин), фторхинолоны и цефалоспорины.

Глава 22 ПСЕВДОМОНАДЫ

22.1. Общая характеристика псевдомонад

Псевдомонады (от гр. *pseudo* — ложный, *monas* — единица) — большая группа микроорганизмов, широко распространенных во внешней среде, особенно в почве и водоемах теплых регионов.

Псевдомонады часто обитают в организме животных и человека.

Псевдомонад относят к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Gamma**proteobacteria*, порядку *Pseudomonadales*, семейству *Pseudomonadaceae*, роду *Pseudomonas*.

Род представлен 53 видами. Многие виды семейства *Pseudomonadoceae* играют в природе роль «мусорщиков», существуют почвенные бактерии, способные усваивать азот воздуха. Псевдомонад относят к условно-патогенным микробам, которые вызывают болезни у животных и человека при наличии предрасполагающих факторов. Болезнь чаще возникает и тяжелее протекает при сниже-

нии естественной резистентности организма в результате антисанитарных условий содержания, недостаточного кормления и некачественными кормами.

22.2. Возбудители псевдомоноза животных

Псевдомоноз – инфекционная болезнь молодняка животных (телят, поросят, ягнят, цыплят), характеризующаяся пневмонией, артритами, диареей, сепсисом.

У норок, лисиц, песцов болезнь протекает в септической форме с геморрагическим воспалением легких.

Псевдомонады вызывают гибель эмбрионов кур, контаминируют сперму быков, баранов, хряков, в результате снижается оплодотворяемость, наблюдаются гибель эмбрионов, аборт, вагиниты, эндометриты, маститы, заболевания мочеполовых органов.

Возбудителем псевдомоноза животных является *P. aeruginosa* – синегнойная палочка, которая открыта в 1862 г. А Люкке, выделена и более подробно описана в 1872 г. Дж. Шретером, К. Гессаром в 1882 г. Реже заболевание обуславливается *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. stutzeri*, *Ps. mendocina*, *Ps. alcaligenes*, *Ps. pseudoalcaligenes*.

Псевдомоноз может часто протекать как смешанная болезнь с колибактериозом, микоплазмозом, стафилококкозом и вирусными инфекциями.

Морфология. *Ps. aeruginosa* – полиморфная, прямая или слегка изогнутая палочка с закругленными концами 0,5–0,7 ширины, 1–3 мкм длины, грамотрицательная, подвижная (монотрих или лофотрих, рис. 22.1, 22.2).

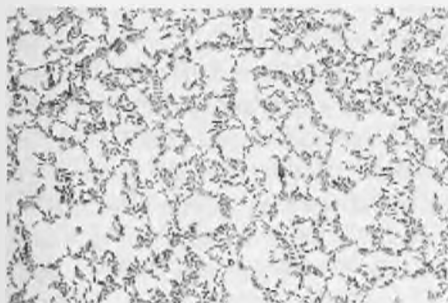


Рис. 22.1. *Ps. aeruginosa*
(мазок из культуры, окраска по Граму)



Рис. 22.2. *Ps. aeruginosa* (лофотрих)

Возбудитель не образует спор, не формирует истинной капсулы, но может продуцировать экзогенную слизь, которая выполняет роль капсулы. В препаратах из культур бактерии расположены одиночно, парами или короткими цепочками.

Культуральные свойства. Псевдомонады хорошо растут на обычных питательных средах, еще лучше при добавлении 1–2 % глюкозы, лактозы, рН сред 7,2–7,4, температурный оптимум – 37–38 °С. Продолжительность выращивания – 24–48 ч. Синегнойная палочка – строгий аэроб, но может расти при анаэробных условиях в присутствии глюкозы и нитратов.

Возбудитель вызывает помутнение МПБ с образованием характерной нежной серовато-серебристой пленки на его поверхности и серовато-белого осадка на дне пробирки. Выделяются мукоидные штаммы, образующие в питательной среде повышенное количество слизи.

На МПА возбудитель формирует округлые выпуклые колонии, в диаметре 2–5 мм, но с изрезанными краями. Колонии имеют серо-белый цвет, кратерообразное углубление в центре, центр более темный, чем периферия.

При росте на средах выделяется триметиламин, что придает культуре запах жасмина, или земляничного мыла, или карамели, при дальнейшем росте по мере старения культуры издают аммиачный запах.

Большинство штаммов синтезируют водорастворимый феназиновый пигмент пиоцианин (рис. 22.3), окрашивающий среду в сине-зеленый цвет; флюоресцеин (пиовердин) – в желто-зеленый; пиорубин – в красно-вишневый; пиомеланин – в темно-коричневый цвет. Эти пигменты обладают антибактериальной активностью в отношении некоторых грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также патогенных грибов. Выработка меланина клетками синегнойной палочки способствует предохранению от неблагоприятного изменения концентрации кислорода в атмосфере и летального действия УФ-лучей. Встречаются атипичные беспигментные или слабопигментированные штаммы, что значительно затрудняет ее идентификацию.

Биохимические свойства. В биохимическом отношении синегнойная палочка малоактивна. Она ферментирует в аэробных условиях с образованием кислоты без газа глюкозу, галактозу, арабинозу, ксилозу, непостоянно лактозу, свертывает и пептонизирует молоко, при этом оно приобретает желто-зеленый цвет, разжижает желатин в виде воронки, а затем послойно. На глюкозо-кровяном агаре вызывает гемолиз эритроцитов. Обладает каталазной, липазной, оксидазной, ар-

гининдегидролазной и фосфатазной активностью. Восстанавливает нитраты в нитриты с восстановлением последних до газообразного азота. Сероводород продуцирует слабо, индола не образует.

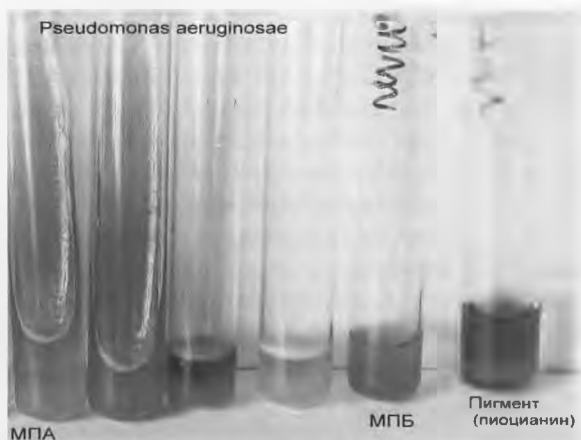


Рис. 22.3. *Ps. aeruginosa* на МПА, в МПБ и образование пигмента пиоцианина

Антигенная структура. У синегнойной палочки различают О- и Н-антигены. По О-антигену известно 12 серогрупп. Кроме жгутиковых (Н) антигенов у синегнойной палочки на поверхности клеток найдены антигены пилей (фимбрий). Этот микроорганизм продуцирует ряд внеклеточных продуктов, обладающих выраженными антигенными свойствами: экзотоксин А, протеазу, эластазу, внеклеточную слизь.

Устойчивость. Синегнойную палочку обнаруживают в почве, воде, в различных объектах внешней среды, в организме человека, рыб, пчел. В водопроводной, речной, озерной воде хорошо размножается и сохраняется до 1 года, в комбикормах – до 1,5 лет.

Синегнойная палочка обладает более высокой устойчивостью к антибиотикам и другим химическим терапевтическим препаратам, чем другие грамотрицательные бактерии. Это является характерной и важной особенностью данного вида и создает существенные трудности при лечении вызываемых им инфекций.

В то же время синегнойная палочка чувствительна к высушиванию, действию хлорсодержащих дезинфицирующих препаратов (2–3%-й раствор хлорной извести, 0,3%-й раствор хлоргексина уничтожают синегнойную палочку в течение 30 мин), легко инактивируется под воздействием высокой температуры (при кипячении, автоклавирова-

нии и др.). Культуры чувствительны к бруламицину, карбенициллину, полимиксину, диоксидину, гентамицину, стрептомицину.

Патогенность. Патогенность обусловлена экзотоксином А, эластазой, эндотоксинами.

Экзотоксин А поражает сердце, легкие, печень, селезенку, почки. Токсичность его равна 2,5 мкг на 1 кг массы животного (белых мышей). Эластаза вызывает некроз кожи, гидролиз и расщепление иммуноглобулина А, разрушает лизоцим дыхательных путей. Эндотоксины вызывают нарушение функции кишечника. Бактерии обладают хорошо выраженными адгезивными свойствами, образуют микроколонии на клетках и тканях организма. Продуцируют экзогенную слизь, которая выполняет функцию капсулы.

Псевдомонады могут продуцировать экзотоксины и ферменты: нейраминидазу, протеазу, коллагеназу, гемотоксин, лейкоцидин, гистотоксины, энтеротоксин.

Псевдомонады патогенны для многих видов сельскохозяйственных животных, рыб, насекомых, лабораторных животных — морских свинок, белых мышей, кроликов. Болеет и человек. У здоровых людей синегнойную палочку обнаруживают на коже паховых и подмышечных областей и ушных раковин (до 2 % лиц), слизистой носа (до 3 % лиц), глотки (до 7 % лиц), в желудочно-кишечном тракте — от 3 до 24 % случаев, т. е. палочка может входить в состав нормальной микрофлоры человека.

У человека вызывает гнойно-воспалительные процессы: осложнения послеоперационных ран, эндокардиты, остеомиелиты, пневмонии, менингиты, абсцессы мозга, пневмонии, эндокардиты, энтериты, артриты, воспаление мочевыводящих путей.

Патогенез. Изучен слабо.

Лабораторная диагностика. Материалом для исследования служат трупы мелких животных, замершие эмбрионы, от крупных животных — кусочки паренхиматозных органов, при вагинитах — выделения из половых путей, при маститах — секрет из пораженных долей вымени, от быков и хряков — сперма, препуциальная слизь. Можно исследовать корма и воду.

Исследование на псевдомонад включает микроскопию мазков из патологического материала, посевы на питательные среды, заражение лабораторных животных и определение серогрупповой принадлежности возбудителя.

Исследуемый материал микроскопируют (по Граму) и одновременно засевают на простые и селективные среды: МПБ, МПА, бульон Хоттингера, агар Эндо, 5%-й кровяной агар, ЦПХ-агар (N-цетилпири-

дин хлорид в составе), среду накопления с малахитовым зеленым и др. Селективные питательные среды используют в виду того, что первичный материал часто бывает загрязнен посторонней микробиотой.

Примерно 75 % выделенных культур можно идентифицировать на 2-й день по морфологии колоний, наличию роста на селективных средах и образованию сине-зеленого пигмента, являющегося уникальным признаком культур синегнойной палочки.

Обнаружение пиоцианина — к суточной бульонной культуре добавляют 4–5 капель хлороформа, энергично встряхивают пробирку и дают отстояться. Если осадок на дне пробирки окрашивается в синий цвет, то считают, что культура продуцирует пиоцианин. Этот пигмент могут образовывать и другие микробы, но он растворяется только в воде, а в хлороформе не растворяется.

Необходимо иметь в виду, что встречаются и культуры, образующие беспигментные колонии. Их идентифицируют по культуральным и биохимическим свойствам.

Беспигментные колонии (с каждой чашки не менее трех колоний, одинаковых по виду) отбирают и суспендируют в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида, а затем отсевают на среды: Кинга, на Хью–Лейвсена или Гисса с глюкозой и последующей инкубацией в аэробных и анаэробных условиях, на среды с желатином, с аргинином (инкубация в аэробных и анаэробных условиях), нитратный и нитритный бульоны, ацетамидный агар и на любую обычно принятую питательную среду с целью выявления способности роста при 42 и 5 °С (для дифференциации культур *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*).

Отношение микроорганизмов к роду *Pseudomonas* определяется по их росту на среде с N-цетилпиридином хлоридом, образованием цитохромоксидазы и аргининдегидролазы, окислению глюкозы в аэробных и анаэробных условиях. Принадлежность микроорганизмов рода *Pseudomonas* к виду *Ps. aeruginosa* определяется по их способности к образованию пигмента пиоцианина, росту при 42 °С и отсутствию роста при 5 °С, гидролизу ацетамида, восстановлению нитратов в нитриты с последующим преобразованием до газообразного азота.

Идентифицированные культуры проверяют на патогенность путем введения суточной бульонной культуры в дозе 0,2–0,3 мл (100–300 млн микробных клеток) подкожно 2–3-м белым мышам массой 18–20 грамм. Гибель мышей наступает через 1–3 сут. Срок наблюдения за зараженными животными до 5 сут. Из внутренних органов павших животных делают высевы на МПА и в МПБ.

При необходимости проводят серотипирование выделенных штаммов синегнойной палочки методом агглютинации на стекле с использованием О-агглютинирующих псевдомонозных сывороток.

Лабораторный диагноз считают установленным при выделении из исследуемого материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя псевдомоноза и патогенной для белых мышей.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет изучен плохо. Специфические средства профилактики и лечения не разработаны. Для лечения применяют антибиотики.

Для вакцинации норок предложена поливалентная формолвакцина.

Для вакцинации людей применяют ассоциированную вакцину, включающую антигены против синегнойной палочки, протей, стафилококка. Специфическим средством лечения людей является иммуноглобулин.

Глава 23. ВОЗБУДИТЕЛЬ САПА ЛОШАДЕЙ

Сан – инфекционная болезнь в основном непарнокопытных (лошади, ослы, мулы, лошаки и др.), характеризующаяся образованием специфических сапных узелков в лимфатических узлах, легких и других паренхиматозных органах, а также на слизистых оболочках носа и кожи, склонных к некрозу с образованием язв.

Для человека эта болезнь нехарактерна, однако рассматривается как опасная для его жизни с очень высокой летальностью без лечения антибиотиками (95 %). Очень редко болезнь может иметь место среди других видов млекопитающих, в частности кошачьих. Изначально сан имел повсеместное распространение, однако к середине XX в. был ликвидирован во многих странах. В благополучных странах случаи заражения сапом возможны в основном среди работников режимных лабораторий, где хранятся штаммы возбудителя.

Случай заражения сапом имел место в США в марте 2000 г. у одного микробиолога в Медицинском исследовательском институте инфекционных болезней армии США (USAMRIID). Как оказалось, работник лаборатории с хронической формой диабета, проводивший опыты с этим микроорганизмом и не всегда пользовавшийся защитными перчатками, заболел прогрессирующей, недиагностируемой, трудно излечимой болезнью. И только после выделения возбудителя сапа из биопсийного материала абсцесса печени был поставлен окончательный диагноз, изменен курс лечения, и работник окончательно выздоровел после 6 мес. болезни.

Ввиду высокой опасности инфекции возбудитель рассматривается как объект биотерроризма. Во время двух мировых войн он использовался очень ограниченно для создания биологического оружия. В частности, в 1915 г. кайзеровская Германия предпринимала попытки инфицировать лошадей в США – в то время еще нейтральной страны, предназначенных для отправки воюющим странам Антанты. Аналогично ими инфицировался фуражный корм в Норвегии, Румынии и Аргентине, поставляемый союзным странам. Во время Второй мировой войны японская секретная группа Отряд 731 проводила опыты по заражению людей сапом и возможному массовому инфицированию людей заразной водой. Позже отдельные секретные исследовательские программы в бывшем СССР были направлены на определение возможности применения возбудителя сапа в военных целях.

Первые сведения о сапе как о заразной болезни обнаружены в трудах Аристотеля (IV в. до н. э.). Возбудитель сапа был открыт в 1882 г. Ф. Леффлером и А. Шютцем. Они же получили чистую культуру бактерий.

Х. И. Гельман и О. И. Кальнинг в 1891 г. изготовили маллеин для аллергической диагностики сапа. При проведении опытов эти исследователи заразились возбудителем болезни и умерли.

На современном этапе сап регистрируется в отдельных районах Средней Азии, Африки и Южной Америки. С 1998 по 2007 г. отдельные случаи отмечались в Бразилии, Турции, некоторых странах СНГ, Эфиопии, Ирана, Ирака, ОАЭ и Монголии. Истинное распространение возбудителя среди поголовья лошадей очень трудно выявить из-за перекрестных серологических реакций с *Burkholderia pseudomallei* – возбудителем мелиоидоза. Как установлено, именно от этого микроорганизма возбудитель сапа произошел, сохранив при этом 99 % генетической идентичности среди консервативных генов и потеряв ту их часть, ко-

торая ответственна за сапротрофный образ жизни. Таким образом, возбудитель сапа не сохраняется в почве в отличие от своего предка *B. pseudomallei*. Считается, что в прошлом возбудитель сапа произошел от *B. pseudomallei* после попадания последнего в организм лошадей. Более того, постоянный генетический анализ возбудителя сапа выявил его постоянную адаптацию в сторону внутриклеточного паразитирования.

Возбудителя сапа относят к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Betaproteobacteria*, порядку *Burkholderiales*, семейству *Burkholderiaceae*, роду *Burkholderia*, виду *Burkholderia mallei* (син. *Pseudomonas mallei*).

Морфология. Возбудитель сапа — *Burkholderia mallei* — мелкая, неподвижная, грамтрицательная, не образующая спор и капсул палочковидная бактерия шириной 0,3–0,8 мкм, длиной — 1–5 мкм. При окраске по Романовскому—Гимзе и синью Леффлера обнаруживают зернистость цитоплазмы и биполярное окрашивание клеток. В препаратах из культур наблюдается полиморфность бактерий, встречаются не только палочки, но и коккоподобные и нитевидные формы.

Культуральные свойства. Возбудитель сапа — аэроб или факультативный анаэроб. Бактерии культивируют на обычных средах с добавлением 2–4 % глицерина. Оптимальное значение pH сред 6,8–7,0, температурный оптимум культивирования — 37–38 °С. Видимый рост бактерий появляется на 1–3-й сут, иногда позже.

В МПБ при росте и размножении бактерий наблюдают помутнение среды с образованием серо-белого осадка, который при встряхивании пробирки поднимается в виде штопора. Отдельные штаммы на поверхности бульона могут образовывать пленку.

На плотной среде возбудитель сапа формирует гладкие полупрозрачные колонии серо-белого цвета с перламутровым оттенком, которые с течением времени сливаются в слизистый налет на поверхности агара.

Довольно характерный рост возбудителя получают на глицериновом картофеле. На этой среде через 2–3 сут появляются мелкие полупрозрачные колонии, которые затем сливаются, образуя слизистый «медовый» налет. В первые 3-е сут роста цвет налета янтарно-желтый, а затем к 6–8-му дню меняется до буро-коричневого и красноватого.

Биохимические свойства. Возбудитель сапа на 6–8-й день свертывает молоко, разжижает желатин, сбраживает глюкозу и лактозу с образованием кислоты без газа.

Антигенная структура. Возбудители сапа имеют O-антиген, который обладает аллергенными и антигенными свойствами, индуцирует образование антител, гиперчувствительность замедленного типа.

Устойчивость. Возбудитель сапа малоустойчив во внешней среде. В воде, почве, гниющих субстратах он погибает в течение 14–30 дней. Солнечный свет губит бактерии за 24 ч. Высушивание инактивирует возбудителя через 10–15 сут, нагревание до 80 °С – за 30 мин, кипячение – моментально. Дезинфицирующие средства в общепринятых концентрациях губят сапных бактерий в течение нескольких минут.

Патогенность. К сапу восприимчивы лошади, ослы, мулы, лошаки. Могут болеть хищники из семейства кошачьих: львы, тигры, пантеры, рыси и др. Известны случаи заболевания бурых и белых медведей, верблюдов. К сапу восприимчив и человек. В литературе описаны случаи смерти людей от болезни.

Из лабораторных животных наиболее восприимчивы к возбудителю сапа золотистые хомячки, морские свинки, в меньшей мере – кролики и мыши.

Факторами патогенности являются экзо- и эндотоксины.

Патогенез. Бактерии проникают в макроорганизм через слизистые оболочки носоглотки, респираторного и пищеварительного трактов. Заражение возможно через кожу, при случке, ранениях. С места проникновения микробы по лимфососудам попадают в лимфоузлы, затем в кровеносные сосуды и разносятся с кровью по всему организму. Сапные узелки чаще всего образуются и локализуются в легких, носовой полости и на коже. Они могут формироваться в подслизистой ткани трахеи, гортани, носовой перегородке и возникать по ходу лимфатических сосудов. На месте узелков могут возникать язвы неправильной формы, различных размеров. В случае генерализации инфекции наблюдают повышение температуры тела, кашель, учащение дыхания, истечения из носовой полости. При остром течении болезни животные погибают в течение 1–3 мес. Длительность хронического течения – от нескольких месяцев до 7–8 лет.

Лабораторная диагностика. Основной метод лабораторной диагностики сапа – серологический, другие методы исследования (микроскопический, бактериологический, биологический и гистологический) применяются по мере необходимости.

Для серологического исследования используют сыворотку крови; для микроскопического, бактериологического и биологического – кровь, гнойное отделяемое язв, носовые выделения, пунктат лимфатических узлов, гной из абсцессов, от убитых животных – пораженные участки органов и тканей – легких, печени, селезенки, лимфатических узлов, носовой перегородки, трахеи, бронхов и др., а при отсутствии патологических изменений – легкие с регионарными лимфатическими

узлами, подчелюстные и заглочные лимфатические узлы; для гистологического исследования — кусочки перечисленных органов и тканей.

При благополучии по заболеванию лошадей сапом исследование материала следует начинать с постановки биопробы, так как при отсутствии патологоанатомических изменений микроскопическое и бактериологическое исследование малорезультативны.

Биологическое исследование проводят на 2—3 золотистых хомячках или морских свинках, лучше самцах. Гнойное отделяемое из язв, носовые выделения, гной из абсцессов, пунктат из лимфатических узлов, кровь, кусочки органов тщательно растирают в стерильной ступке с небольшим количеством физиологического раствора в равномерную взвесь. Полученную суспензию (1:10) вводят подкожно в области шеи золотистым хомячкам в дозе 0,5—1,0 мл, морским свинкам — 3—5 мл. Материалом, взятым стерильно (пунктат из лимфатических узлов или не вскрывшихся абсцессов), животных можно заражать внутрибрюшинно в тех же дозах. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 15 дней.

При наличии в исследуемом материале возбудителя сапа через 3—4 дня на месте подкожного введения материала образуется язва с уплотненными краями; зараженные животные малоподвижны, у них развиваются ринит, конъюнктивит, орхит.

Гибель хомячков наступает через 5—7 дней, морских свинок — через 8—15 дней. У морских свинок болезнь может перейти в хроническую форму.

Животных с клиническими признаками болезни усыпляют эфиром, вскрывают, а затем из сердца, селезенки, печени, семенников делают посев на питательные среды. Аналогично поступают с павшими животными.

Микроскопическое исследование сводится к приготовлению препаратов из патологического материала, их окрашиванию и микроскопии. Целью бактериологического исследования является выделение чистой культуры из исследуемого материала и ее идентификация.

Серологическому исследованию подвергают сыворотку крови, которую используют для постановки РСК, реакции агглютинации, в некоторых странах с этой целью используется роз-бенгал проба. В последнее время для диагностики сапа предложен иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Сущность гистологического метода заключается в обнаружении характерных признаков сапных узелков в гистопрепаратах, окрашенных гематоксилин-эозином.

Кроме перечисленных лабораторных методов для диагностики сапа используют аллергический метод, осуществляемый с помощью маллеина. Препарат представляет собой стерильный фильтрат бульонной культуры возбудителя сапа, инактивированной нагреванием. Маллеин наносят на конъюнктиву глаза дважды с интервалом 5–6 дней. Положительная реакция характеризуется воспалением конъюнктивы, выделением гнойного секрета, который истекает в виде шнура из внутреннего угла глаза.

Лабораторный диагноз считают установленным в случае выделения: из патологического материала культуры со свойствами, типичными для возбудителя сапа;

хотя бы из одного зараженного лабораторного животного культуры, характерной для возбудителя сапа, даже если эта культура из первичного патологического материала изолирована не была.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет при сапе нестерильный, инфекционный, слабовыраженный и обеспечивается за счет клеточных факторов защиты. Средства активной и пассивной профилактики болезни не предложены. Лечение больных сапом животных не проводят, их уничтожают.

Глава 24 ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУЛЯРЕМИИ

Туляремия – инфекционная болезнь животных, характеризующаяся лихорадкой, поражением лимфоузлов (лимфаденитами), воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей и кишечника, параличами у молодняка, общей интоксикацией.

Болезнь впервые была установлена у грызунов в 1908 г. в США. Возбудителя болезни выделили Дж. МакКой и Ч. Чепин в 1911 г. от больных сусликов в округе Туляре (Калифорния). Большой вклад в изучение этой болезни внес Э. Френсис. В честь его заслуг возбудителя назвали *Francisella tularensis*.

В последнее время отмечается некоторый подъем в количестве регистрируемых случаев. В частности,

в 1997–1998 гг. болезнь впервые была зарегистрирована в Испании в виде двух вспышек: одна была связана с зайцами, а другая – с речными раками, когда было поражено более 500 человек. В 2000 г. эпидемия у вынужденно перемещенных в связи с вооруженным конфликтом жителей в Косово была обусловлена значительным увеличением популяцией диких грызунов и туляреминой эпизоотией среди них. В 2002 г. в США неожиданная вспышка возникла среди содержащихся в неволе диких собак прерий, часть из которых была экспортирована в Чехию. В тот же год один случай туляремии впервые за все время изучения был диагностирован в Южном полушарии, а именно в Австралии, вызванный подвидом *novicida* возбудителя.

Туляремия распространена только в Северном полушарии за исключением одного случая в Австралии. Инфекция имеет неравномерное распространение в мире, в Европе наибольшее количество случаев регистрируется в Швеции и Финляндии, в отельных регионах Российской Федерации, Казахстане и Туркменистане. В бывшем СССР туляремия имела широкое распространение во время войны и сразу по ее окончании. В частности, во время зимы 1941/42 года 67 тыс. случаев инфекции были отмечены в Ростове-на-Дону и прилегающих районах. После 50-х гг. количество случаев туляремии среди людей пошло на убыль, что было связано с ростом урбанизации в бывшем СССР и уменьшения пропорции сельских жителей. Кроме того, снижению заболеваемости способствовала программа вакцинации в Российской Федерации.

Возбудитель туляремии рассматривается как потенциальный агент биотерроризма из-за опасности болезни для человека и низкой инфицирующей дозы: всего 10 микробных клеток при инъекционном пути введения и 25 микробных клеток при аэрозольном введении. В частности, отмечались случаи туляремии у людей после скашивания травы газонокосилкой, образующей аэрозоль мелких частиц с возбудителем, на участке, где были обнаружены инфицированные трупы кроликов. Тем не менее возможность передачи от человека к человеку не установлена, а все случаи вспышек инфекции у людей связаны в результате тесного контакта человека с внешней средой (природным резервуаром или ареалом их обитания).

Возбудителя туляремии относят к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Thiotrichales*, семейству *Francisellaceae*, роду *Francisella* (род насчитывает два вида), виду *Francisella tularensis*.

Внутри вида *Francisella tularensis* различают четыре подвида: *Francisella tularensis subsp. tularensis*, *Francisella tularensis subsp. holarctica*, *Francisella tularensis subsp. mediasiatica*, *Francisella tularensis subsp. novicida*. Второй вид *Francisella philomiragia*.

Хотя все они вызывают типичные случаи туляремии, каждый из подвидов имеет ассоциацию с определенным видом животных и отличается по тяжести вызываемой им болезни. В частности, *Fr. tularensis subsp. tularensis*, ранее известный как тип А, распространен только в Северной Америке — это наиболее патогенный подвид. *Fr. tularensis subsp. holarctica*, ранее известный как тип В, менее вирулентен, однако распространен по всему Северному полушарию. Остальные два подвида (*Fr. tularensis subsp. mediasiatica* и *Fr. tularensis subsp. novicida*) отмечались только в отдельных географических регионах, редко обнаруживаются среди людей и вызывают преимущественно легкие формы болезни.

Морфология. Возбудитель болезни *Fr. tularensis* — мелкая полиморфная палочка размером $0,3-0,7 \times 0,2-0,4$ мкм. В организме животных бактерии представляют собой тонкие нежные палочки или же могут быть коккоподобными. В культурах бактерии бывают овоидной и нитчатой формы, возбудитель туляремии грамотрицателен, неподвижен, спор не образует, формирует нежную капсулу, способен проходить через бактериальные фильтры (клетки размером $0,15$ мкм и меньше) (рис. 24.1). При выращивании в питательных средах продуцирует слизь, которую можно обнаружить в приготовленных препаратах-мазках. В препаратах из органов павших животных и окрашенных по Романовскому—Гимзе возбудитель приобретает сиреневый цвет. В отличие от пастерелл он не способен окрашиваться биполярно.

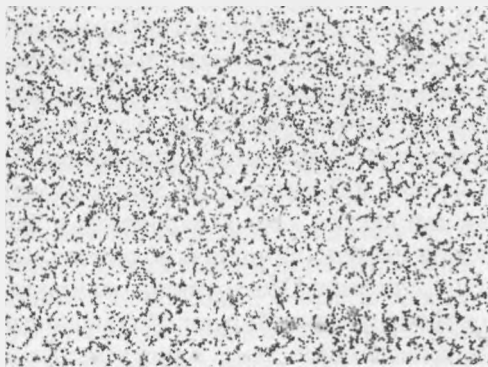


Рис. 24.1. *Francisella tularensis*, окраска по Граму

Культуральные свойства. Возбудители туляремии являются строгими аэробами. Они обладают окислительным метаболизмом. На обычных питательных средах не растут. Температурный оптимум культивирования — 36–37 °С, оптимальное значение рН сред 7,0–7,2. Микроорганизмы очень прихотливы к питательным средам, для роста и развития нуждаются в аминокислотах, пантотеновой кислоте, ионах магния, растут в средах с кровью, лецитином, цистином. Видимый рост бактерий появляется через 3–7 сут. Для культивирования используют желточную среду МакКоя, Френсиса, Дрожевкиной. Среда МакКоя состоит на 60 % из желтка куриных яиц и на 40 % из физиологического раствора. Ее расфасовывают в пробирки и прогревают при 80 °С в течение часа, в результате чего среда свертывается. Среда Френсиса имеет следующий состав: 2,5 % МПА, 0,1 % цистина, 1 % глюкозы и 5–10 % дефибринированной кроличьей крови. Среда Дрожевкиной представляет собой смесь 10 % куриного желтка и 90 % физиологического раствора, к которой добавлен агар с глюкозой, цистин и другие компоненты.

На поверхности агаровых сред вирулентные микробы образуют колонии в S-форме, авирулентные — в R-форме. На среде МакКоя колонии нежные, блестящие, выпуклые, бесцветные, мелкие (0,5–1 мм). На среде Френсиса возбудитель формирует круглые, выпуклые, блестящие колонии с голубоватым оттенком от 1 до 2 мм в диаметре.

В жидких питательных средах наблюдают скудный, поверхностный рост бактерий.

Возбудителя туляремии можно культивировать в организме морских свинок и кроликов, в 14-дневных куриных эмбрионах.

Биохимические свойства. Биохимическая активность возбудителя слабо выражена. Бактерии ферментируют глюкозу, мальтозу с образованием кислоты без газа, разлагают белки с выделением H_2S , выделяют каталазу, глутаминазу, аспарагиназу, цитруллинуреидазу, редуцируют тионин, метиленовый голубой, малахитовый зеленый.

Антигенная структура. Вирулентные штаммы возбудителя имеют два антигена: Vi-антиген и O-антиген. Vi-антиген локализован на поверхности микробной клетки, содержит липиды и белки, обеспечивает вирулентность и иммуногенность возбудителя. O-антиген представляет собой гликопротеид. Оба антигена обладают аллергенными и антигенными свойствами, индуцируют образование антител, гиперчувствительность замедленного типа. Авирулентные штаммы имеют только O-антиген. Доказано, что O-антиген возбудителя туляремии

имеет общие субстанции с антигенами бруцелл, что может приводить к перекрестным реакциям при серологическом исследовании культур.

Устойчивость. Возбудитель туляремии устойчив к факторам внешней среды. Например, в воде при 13–15 °С может сохраняться в течение 3 мес., в почве – 6–9 мес., в органах павших животных – до 40 сут. Возбудитель весьма чувствителен к воздействию физических и химических факторов. Прямые солнечные лучи губят возбудителя за 30 мин, при кипячении бактерии погибают моментально. Эффективными дезинфектантами являются растворы лизола, креолина, фенола и др. Микроб чувствителен к стрептомицину, тетрациклину, канамицину и др.

Патогенность. К туляремии восприимчивы 125 видов позвоночных и 101 вид беспозвоночных животных. В природных условиях болеют зайцы, дикие кролики, мыши, хомяки, водяные крысы, ондатры, бобры, барсуки. Из сельскохозяйственных животных наиболее чувствительны к возбудителю болезни ягнята и поросята в возрасте до 2–4 мес. Могут болеть лошади, ослы, крупный рогатый скот. Из домашних птиц наиболее восприимчивы куры, особенно цыплята. Индейки, утки и гуси устойчивы к заражению. Мало восприимчивы к возбудителю собаки и кошки. Из лабораторных животных наиболее чувствительны к возбудителю туляремии белые мыши и морские свинки.

В природных условиях возбудитель туляремии также передается с помощью членистоногих, в Беларуси – чаще комарами и клещами. Проводимые в период 1960–1964 гг. исследования установили инфицированность клещей *Ixodes ricinus* на уровне 0,01 %. Вероятно, членистоногие являются только механическими переносчиками, так как возбудитель не обнаруживается в их слюнных железах.

Болеет туляремией и человек, у которого болезнь протекает с поражением лимфатических узлов, воспалением кожи, легких, желудочно-кишечного тракта (рис. 24.2). Болезнь проявляется выраженной интоксикацией, лихорадкой, септициемией. В большинстве случаев заражения людей наблюдаются в степной зоне в местах обитания полевков и домашних мышей либо при передаче возбудителя охотникам от диких кроликов и зайцев. Таким образом, случаи эпидемии у человека – единичные или массовые – практически всегда совпадают с повышением уровня инфицированности диких животных, в первую очередь грызунов, контаминирующих объекты внешней среды фекалиями, содержащими возбудитель.



Рис. 24.2. Гнойный лимфаденит при туляремии человека

К факторам патогенности относят капсулу, ферменты (аспарагиназу, гиалуронидазу, дезаминазу и др.) и эндотоксин.

Патогенез. Заражение животных может происходить алиментарным, аэрогенным и трансмиссивным путями. Бактерии могут проникать в организм даже через неповрежденный кожный покров. Возможна внутриутробная передача возбудителя. Попав в организм животного, возбудитель размножается в месте внедрения, затем по лимфососудам заносится в регионарные лимфоузлы и вызывает их воспаление. Из пораженных лимфоузлов микробы с током крови разносятся по всему организму, оседают в различных органах, вызывая их воспаление. В очагах скопления бактерий образуются специфические туляремийные гранулемы, т. е. первичные бубоны. Гибель животных наступает от развития сепсиса и токсикоза.

Лабораторная диагностика. Подозрение на туляремию возникает при массовом падеже грызунов, заболеваниях сельскохозяйственных и домашних животных, а также людей. Диагноз ставят на основании анализа эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных с учетом результатов бактериологических, серологических и аллергических исследований.

Для исследования в лабораторию направляют трупы грызунов и мелких животных, от трупов крупных животных – кусочки печени, почек, селезенки, пораженные лимфоузлы, сердце, от подозреваемых в заболевании животных – сыворотку крови.

Препараты из органов животных окрашивают по Романовскому–Гимзе и при обнаружении бактерий сиреневого цвета результат расценивают как подозрение на наличие в патологическом материале возбудителя туляремии.

Посев делают на специальные и универсальные среды, свежeweделенные культуры идентифицируют по культурально-морфологическим, биохимическим и антигенным свойствам.

Ценным диагностическим тестом при диагностике туляремии является биологическая проба. Она позволяет изолировать бактерии из любого патологического материала. Для постановки биопробы используют белых мышей, реже – морских свинок. Суспензию из органов вводят мышам подкожно или внутрибрюшинно в дозе 0,5 мл. Белые мыши погибают в течение 4–5 сут.

Серологическое исследование проводят путем постановки серологических реакций: агглютинации, преципитации, нормализации и РНГА. Наибольшее диагностическое значение имеет реакция агглютинации, которую ставят пробирочным и кровякапельным методами. Диагностическими титрами считают при туляремии овец – 1:25, крупного рогатого скота и свиней – 1:100.

Аллергический метод диагностики осуществляют с помощью аллергена под названием тулярин. Препарат вводят внутрикожно, реакцию учитывают через 24 и 48 ч.

Диагноз считают установленным по результатам лабораторных исследований при:

выделении из патологического материала чистой культуры *Fr. tularensis*;

положительной биопробе и последующем выделении из органов лабораторных животных культуры с характерными для возбудителя туляремии свойствами;

обнаружении в сыворотке крови животных в реакции агглютинации специфических антител в титре 1:25 для мелкого рогатого скота и 1:100 для крупного рогатого скота.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. У переболевших животных формируется напряженный иммунитет. Специфических средств профилактики болезни у животных не предложено. Для вакцинации людей применяют живую вакцину против туляремии на основе аттенуированного в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалея штамма *Fr. tularensis subs. holarctica* (Москва, Российская Федерация), которая остается единственным в мире биопрепаратом для профилактики туляремии у человека. Специфических препаратов для лечения больных не разработано. Для лечения животных применяют антибиотики, сульфаниламидные и нитрофурановые препараты.

Сибирская язва (синонимы – горящие угли, огневик, священный огонь) – остропротекающая инфекционная болезнь, характеризующаяся явлениями септицемии, тяжелой интоксикацией, образованием разного размера карбункулов, на месте которых при их вскрытии образуются язвы с кровянистыми выделениями черного цвета.

Большой вклад в изучение сибирской язвы внес русский врач С. С. Андриевский (1760–1818), впервые доказавший опытным путем тождественность сибирской язвы у людей и животных. Он дал название болезни сибирская язва по месту наибольшего распространения и изучения.

Впервые бацилл сибирской язвы микроскопически обнаружил Ф. Поллендер в Германии в 1849 г. Французские исследователи П.-Ф. О. Райер и К.-Дж. Девейн в 1850 г. обнаружили возбудителя сибирской язвы в крови погибших овец, больных сибирской язвой.

Р. Кох в 1876 г. получил чистую культуру и дал название возбудителю, доказал, что возбудитель болезни может формировать споры. Независимо от него чистую культуру возбудителя получил также Л. Пастер. Он же приготовил первую вакцину для иммунизации животных против сибирской язвы. В 1888 г. А. Серафини у сибиреязвенных бацилл обнаружил капсулу. В 1911 г. А. Асколи предложил реакцию преципитации для исследования продуктов животного происхождения на контаминацию *B. anthracis*.

Возбудителя относят к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Bacillales*, семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*, виду *B. anthracis*.

В роду *Bacillus* насчитывается 95 видов. Сюда относятся близкие к бацилле сибирской язвы почвенные сапротрофы: *B. cereus* (восковидная), *B. mesentericus* (картофельная), *B. megaterium* (капустная), *B. mycoides* (корневидная), *B. subtilis* (сенная).

При определенных условиях (снижение резистентности организма, неудовлетворительное кормление и содержание животных и другие факторы) данные сапрофиты могут вызвать пищевые токсикозы,

септические процессы, пневмонии, осложнения после хирургических вмешательств. Наиболее в этом отношении активна *B. cereus*, синтезирующая активный фермент патогенности лецитиназу, летальный токсин и др.

Морфология. *B. anthracis* – крупная грамположительная палочка шириной 1–1,5 мкм, длиной 3–10 мкм. Образует споры и капсулы, неподвижна (рис. 25.1, 25.2). Споры овальной, округлой формы (длина – 1,2–1,5 мкм, ширина – 0,8–1,0 мкм), расположены центрально или субтерминально. При температуре ниже 12 °С и выше 42 °С, а также в живом организме или нескрытом трупe споры не образуются. При нарушении целостности трупа и доступе кислорода начинается спорообразование, поэтому трупы животных, погибших от сибирской язвы, не вскрывают.



Рис. 25.1. *Bacillus anthracis* с капсулами



Рис. 25.2. *Bacillus anthracis* в культуре

В препаратах бактерии расположены одиночно, попарно, короткими (3–4 клетки) или длинными цепочками (в препаратах-мазках из культуры). Цепочка из 3–5 палочек может напоминать бамбуковую трость.

Иногда форма бацилл нехарактерна (чаще при выделении от свиней): бациллы имеют вид коротких, толстых или изогнутых зернистых палочек со вздутием посередине или на конце.

В молодых и старых культурах возбудитель может окрашиваться грамотрицательно.

Культуральные свойства. *B. anthracis* по способу дыхания относится к факультативным анаэробам, хорошо растет на универсальных средах (МПБ, МПА, МПЖ, картофеле, молоке). Температурный оптимум – 35–38 °С. При температуре ниже 12 °С и выше 45 °С бациллы сибирской язвы не растут. Оптимальное значение рН сред 7,2–7,6.

В МПБ через 18–24 ч на дне пробирки образуется рыхлый белый осадок, напоминающий комочек ваты. Надосадочная жидкость остается прозрачной, при встряхивании бульон не мутнеет, осадок разбивается на мелкие хлопья. На поверхности МПА через 24–48 ч образуются серо-белые, матовые, плоские, шероховатые, неправильной формы волокнистые колонии, достигающие в диаметре 3–5 мм, с неровным краем и отростками (рис. 25.3), которые при малом увеличении микроскопа напоминают локоны (R-форма). Колонии эти похожи на снежинки. Иногда их сравнивают с головой медузы или кометой. Встречаются и атипичные формы с менее выраженной шероховатостью и без отростков.

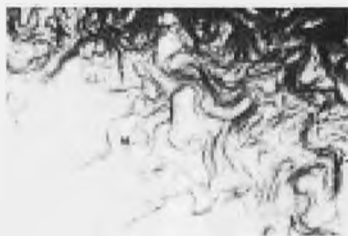


Рис. 25.3. *Bacillus anthracis*, край колонии, завитки, напоминающие медузу

Если к МПА добавить 0,5 и 0,05 ЕД/мл пенициллина, то при росте бациллы примут форму шаров, расположенных в виде цепочки (в препаратах — мазках из культуры), что напоминает ожерелье из жемчуга. Этот феномен используют с диагностической целью.

При посеве уколом в столбик желатина на 2–5-е сут появляется желтовато-белый стержень, от которого под прямым углом радиально отходят нежные боковые отростки. Рост напоминает елочку, перевернутую верхушкой вниз. Постепенно верхний слой желатина начинает разжижаться, принимая сначала форму воронки, затем мешочка.

Сибирезвенная бацилла хорошо размножается в 8–12-суточных куриных эмбрионах, которые гибнут на 2–4-е сут с момента заражения.

Биохимические свойства. Возбудитель сибирской язвы ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, фруктозу. Утилизирует цитраты, образует ацетилметилкарбинол (реакция Фогеса–Проскауэра положительная), выделяет аммиак, синтезирует лецитиназу. Редуцирует метиленовый синий и

восстанавливает нитраты в нитриты. Некоторые штаммы образуют сероводород.

Антигенная структура. В состав антигенов *B. anthracis* входят неиммуногенный соматический полисахаридный комплекс и капсульный глутаминполипептид. Полисахаридный антиген не создает иммунитета у животных и не определяет агрессивных функций микроорганизма.

Бацилла антракса образует сложный экзотоксин, состоящий из трех компонентов: эдематогенный фактор (ЕФ), протективный антиген (РА) и летальный фактор (LF) или факторы I, II, III. Эдематогенный фактор вызывает местную воспалительную реакцию — отек и разрушение тканей. Протективный антиген — носитель защитных свойств, обладает выраженным иммуногенным действием. Летальный фактор в смеси с протективным вызывает гибель крыс, белых мышей и морских свинок. Каждый из трех факторов обладает выраженной антигенной функцией.

Устойчивость. Вегетативная форма возбудителя малоустойчива, а споровая форма исключительно устойчива во внешней среде в отношении физических и химических факторов.

Вегетативные клетки при нагревании до 50–55 °С гибнут в течение 1 ч, при 60 °С — через 15 мин, при 75 °С — через 1 мин, при кипячении — мгновенно. В нескрытом трупe вегетативная клетка микроба разрушается в течение 2–4 дней в результате действия протеолитических ферментов и отсутствия кислорода. Вегетативная клетка высокочувствительна к антибиотикам и дезсредствам. Спирт, эфир, 2%-й раствор формальдегида, 5%-й фенол, 5–10%-й хлорамин, свежий 5%-й раствор хлорной извести, водорода пероксид разрушают вегетативные клетки в течение 5 мин.

Споровые формы возбудителя сибирской язвы исключительно устойчивы, могут сохранять свою жизнеспособность до 500 лет. Сухой жар при температуре 120–140 °С убивает споры через 2–3 ч, автоклавирование при 120 °С — за 5–10 мин, кипячение — через 1 ч. Дезсредства губительно влияют на споры, но для этого необходима длительная экспозиция. Так, 3%-й раствор водорода пероксида убивает споры через 1 ч, 4%-й раствор калия перманганата — через 15 мин, 10%-й раствор натрия гидроксида — через 2 ч.

Патогенность. К возбудителю сибирской язвы восприимчивы все виды млекопитающих. Чаще болеют овцы, крупный рогатый скот, лошади, козы, буйволы, верблюды и северные олени, могут заразиться

ослы и мулы. Свиньи менее чувствительны. Среди диких животных восприимчивы все травоядные. Известны случаи заболевания кошек, собак, волков, лисиц, песцов, среди птиц — уток и страусов. Из лабораторных животных чувствительны белые мыши, морские свинки, кролики.

Патогенность возбудителя обеспечивается следующими факторами: экзотоксинами, эндотоксинами, капсульным полипептидом, адгезивностью.

Патогенез. Возбудитель проникает в организм чаще всего алиментарным путем. Он обладает выраженной инвазивностью и может проникать через кожный покров, органы дыхания. Патоген проникает в лимфатическую систему, в кровь, разносится по всему организму, фиксируясь в элементах лимфоидно-макрофагальной системы, вызывает септицемию. В организме сибиреязвенная бактерия выделяет экзотоксин, синтезирует капсульный полипептид. Капсульное вещество ингибирует опсонизацию, экзотоксин поражает центральную нервную систему, вызывает отеки, обуславливает гипергликемию. В крови снижается содержание кислорода до уровня, несовместимого с жизнью, наступает гибель животного.

Лабораторная диагностика. Сибирская язва у животных диагностируется на основании учета эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений (в случае вскрытия трупов), лабораторного исследования.

Решающее значение при постановке диагноза на сибирскую язву имеет лабораторная диагностика, которая осуществляется микроскопическим, бактериологическим, биологическим и серологическим методами исследования.

В лабораторию направляют ухо от трупа животного, перевязанное у основания (ухо отрезают с той стороны, на которой лежит труп), или кровь из надреза уха в виде толстого мазка на двух предметных стеклах. Чтобы исключить попадание возбудителя во внешнюю среду, место разреза прижигают шпателем. От трупов свиней для лабораторного исследования отправляют заглоченные лимфатические узлы и участки отечной соединительной ткани. Если подозрение на сибирскую язву возникло в ходе вскрытия, его прекращают и на исследование направляют часть селезенки. Нативный материал помещают в чистую посуду (пробирки, банки). Высушенные мазки кладут в чашки Петри, которые оборачивают плотной бумагой. На упаковке делают надпись «Мазок не фиксирован!». Посуду с материалом помещают во влагонепро-

нищаемую тару, обвязывают, пломбируют или опечатывают, делают надпись «Верх. Осторожно!» и с сопроводительными документами нарочным направляют в лабораторию.

В лаборатории готовят мазки, для фиксации которых используют ацетон или этиловый спирт, окрашивают по Граму и на капсулу по Ребигеру, Михину или Романовскому—Гимзе. При наличии люминесцирующих сывороток используют метод флюоресцирующих антител. В окрашенных мазках из трупного материала возбудитель сибирской язвы обнаруживают в виде крупных, грамположительных, палочковидных бактерий, расположенных одиночно, парами, короткими цепочками. Концы палочек, обращенные друг к другу, резко обрублены, свободные концы закруглены, клетки окружены капсулой. В мазках-отпечатках из органов павших животных (несвежий материал, доставка без охлаждения) можно наблюдать вегетативные клетки без признаков капсулообразования и на стадии физиологического распада. В отдельных случаях, особенно в мазках из материала, полученного от свиней, форма клеток может быть нетипичной: короткие, толстые, изогнутые или зернистые палочки со вздутием в центре или на концевых частях бактерий. По результатам микроскопического исследования дают предварительный ответ.

Высевы из патологического материала делают в МПБ и на МПА или в бульоне и на агаре Хоттингера. В день поступления материала, одновременно с микроскопией и посевами на питательные среды с целью выделения возбудителя сибирской язвы, в обязательном порядке проводят биологическую пробу на лабораторных животных.

Исследуемый патологический материал, суспендированный в небольшом объеме физиологического раствора, вводят двум белым мышам в дозе 0,1—0,2 мл подкожно в заднюю часть спины или двум морским свинкам в дозе 0,5—1 мл подкожно в область живота. Гибель зараженных животных наступает через 1—3 сут, иногда позже. Наблюдение за подопытными животными ведут 10 дней. Павших животных вскрывают, делают мазки и посевы из крови сердца, селезенки, печени, инфильтрата на месте инъекции исследуемого материала.

Полученные культуры микроскопируют, изучают культуральные свойства. При наличии характерных морфологических и культуральных свойств и капсул в мазках из исходного материала дальнейшее изучение культуры не проводят.

В случае получения нечетких результатов по одному из свойств, не ожидаясь результатов биопробы, определяют чувствительность куль-

туры к пенициллину (тест «жемчужное ожерелье»), сибирезвенному бактериофагу, подвижность, гемолитические свойства, лецитиназную активность и образование фосфатазы.

Тест «жемчужного ожерелья» основан на подавлении пенициллин-ом синтеза клеточной стенки у сибирезвенных бацилл с образованием сферопластов. Для определения чувствительности к пенициллину 3–6-часовые культуры высевают в чашки Петри с МПА, содержащим 0,5 и 0,05 ЕД пенициллина в 1 мл среды, инкубируют в термостате в течение 3 ч при 37–38 °С и проводят микроскопию. Клетки *B. anthracis* приобретают шаровидную форму – «жемчужное ожерелье». Чувствительность испытуемой культуры к бактериофагу определяют либо чашечным методом, либо методом «стекающей капли» в пробирках со скошенным агаром, с использованием сибирезвенных бактериофагов «Гамма», «К», Fah-ВНИИВВиМ и R/D-Ph-6.

В ходе лабораторного исследования возбудителя сибирской язвы его необходимо дифференцировать от почвенных сапротрофов, принадлежащих к роду *Bacillus*. *B. anthracis* неподвижен, не обладает гемолитическими свойствами, большинство штаммов не образуют лецитиназу, фосфатазу.

При поступлении загнившего материала, исследовании кожевенного и мехового сырья, серологической идентификации выделенных культур применяют реакцию преципитации по Асколи (разработана итальянским ученым А. Асколи в 1910 г. для обнаружения термостабильного сибирезвенного антигена в различных субстратах). Реакция ставится в уленгутовских пробирках методом наслаивания или подслаивания так, чтобы не перемешать компоненты и сохранить четко выраженную границу между ними. Реакция считается положительной, если на границе между компонентами в течение 2–15 мин появляется тонкое беловатое кольцо преципитации, которое при покачивании пробирки хорошо видно.

Диагноз на сибирскую язву считается установленным в одном из следующих случаев, если:

из исходного материала выделена культура со свойствами, характерными для возбудителя сибирской язвы, и выявлена гибель хотя бы одного лабораторного животного из двух зараженных исходным материалом или полученная культура с последующим выделением ее из органов павшего животного;

в посевах из исходного материала отсутствует рост культуры, но отмечена гибель хотя бы одного лабораторного животного из двух за-

раженных и выделена из его органов культура со свойствами, характерными для возбудителя сибирской язвы;

получены положительные результаты методом флюоресцирующих антител и обнаружены капсульные бациллы в мазках из исходного материала;

установлена положительная реакция преципитации с загнившим материалом;

получена положительная реакция преципитации у свиней и выявлена характерная клиническая картина и патологоанатомические изменения даже при отсутствии роста культуры в высевах из исходного материала и отрицательном результате биопробы.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. В результате естественного перенесения животными сибирской язвой у них создается стойкий продолжительный иммунитет.

Для специфической профилактики сибирской язвы животных используют вакцину против сибирской язвы животных из штамма 55-ВНИИВВиМ, которая представляет собой взвесь живых спор сибиреязвенной бескапсульной авирулентной культуры штамма 55-ВНИИВВиМ в стабилизирующей среде.

Для пассивной иммунизации и лечения больных используют гипериммунную сыворотку.

Глава 26 ПАТОГЕННЫЕ АНАЭРОБЫ

26.1. Общая характеристика анаэробов

К числу микроорганизмов, обладающих способностью вызывать тяжело протекающие инфекционные или интоксикационные процессы у животных и человека, относится группа патогенных анаэробов. Это преимущественно клостридии, но к ним относят также неспоровых фузобактерий (возбудителей некробактериоза).

Согласно Справочнику Берджи (2009. Т. 3) все клостридии (168 видов) объединены в род *Clostridium*, отно-

сящийся к семейству *Clostridiaceae*, порядку *Clostridiales*, классу *Clostridia*, типу *Firmicutes*, домену *Bacteria*. Родовое название *Clostridium* дано на основании сходства споровых форм микроорганизмов с веретеном (от гр. *closter* – веретено), которое они приобретают в результате раздувания бактериальных клеток крупными спорами, расположенными в центре или ближе к одному концу.

Вместе с тем в последние годы клостридии были серьезно реклассифицированы, в частности:

а) вид *Clostridium difficile* был отнесен к роду *Peptoclostridium* семейства *Peptostreptococcaceae* и ему присвоено наименование *Peptoclostridium difficile* (эквивалентное имя (*Clostridium*) *difficile*). В этот род были перенесены виды: *Cl. hiranonis*, *Cl. litorale*, *Cl. manganotii*, *Cl. paradoxum*, *Cl. sticklandii* и *Cl. thermoalcaliphilum*;

б) вид *Cl. histolyticum* – *Hatheway* семейства *Clostridiaceae* и ему присвоено наименование *Hatheway* *histolytica*, в том числе виды *Cl. limosum* и *Cl. proteolyticum* с изменением наименования на *Hatheway* *limosa* и *Hatheway* *proteolytica* соответственно;

в) виды *Cl. aerotolerans*, *Cl. aldenense*, *Cl. algidixylanolyticum*, *Cl. aminophilum*, *Cl. amygdalinum*, *Cl. asparagiforme*, *Cl. bolteae*, *Cl. celerecrescens*, *Cl. citroniae*, *Cl. clostridioforme*, *Cl. fimetarium*, *Cl. glycyrrhizinilyticum*, *Cl. herbivorans*, *Cl. hylemonae*, *Cl. indolis*, *Cl. lavalense*, *Cl. methoxybenzovorans*, *Cl. oroticum*, *Cl. phytofermentans*, *Cl. polysaccharolyticum*, *Cl. populeti*, *Cl. saccharolyticum*, *Cl. scindens*, *Cl. sphenoides*, *Cl. symbiosum*, *Cl. xylanolyticum* – в род *Lachnoclostridium* семейства *Lachnospiraceae*;

г) вид *Clostridium ramosum* был реклассифицирован в качестве предложенного вида *Erysipelatoclostridium ramosum* (NCBI Tавonomy, 2016). По результатам геномного анализа предлагается также подвергнуть реклассификации других представителей клостридий, в частности *Clostridium bifermentans* перевести в другой род с видовым названием *Paraclostridium bifermentans*; для видов *Clostridium sordellii* и *Clostridium ghonii* предложен новый таксон *Paeniclostridium* с соответствующими видовыми названиями *Paeniclostridium sordellii* и *Paeniclostridium ghonii*;

с 2017 г. к роду *Clostridium* относится 140 видов, в их числе *Cl. amylolyticum*, *Cl. aminovorans*, *Cl. botulinum*, *Cl. fallax*, *Cl. haemolyticum*, *Cl. chauvoei*, *Cl. novyi*, *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. sordelli*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tetani*, *Cl. butyricum*, *Cl. putrefaciens*, *Cl. ruminantium* и др.

Клостридии обладают рядом общих характеристик. По морфологическим признакам представители рода клостридий представляют собой палочки обычно крупных размеров, не образующие капсул

(искл. *Cl. perfringens*). Отдельные виды при определенных условиях образуют короткие цепочки, иногда и длинные нити. Все они образуют споры, имеющие овальную или сферическую форму и расположенные внутри бактериальной клетки. Экспоненциально растущие клетки окрашиваются по Граму положительно, при переходе в стационарную фазу они становятся грамотрицательными. Большинство видов подвижные. Движение осуществляется с помощью перитрихально расположенных жгутиков. Растут на специальных питательных средах, в состав которых входят компоненты, обеспечивающие энергетический метаболизм в анаэробных условиях: среды Китта–Тароцци, Вильсона–Блера, Цейслера и др.

Характерной особенностью клостридий является анаэробный тип энергетических процессов. Многие виды – строгие анаэробы, некоторые могут расти в присутствии воздуха при атмосферном давлении. Одни виды сахаролитические, другие – протеолитические, третьи – обладают обоими этими свойствами: сбраживают сахара, многоатомные спирты, аминокислоты, пурины и другие органические соединения. Клостридии восстанавливают сульфиты. Характерным для них является отсутствие каталазы – фермента, катализирующего разложение водорода пероксид.

В процессе эволюционного развития и дифференциации видов клостридии приспособились к существованию в самых различных условиях. Они являются нормальными обитателями почвы. Их различные виды существуют в морских и пресноводных отложениях, в пищеварительном тракте различных представителей фауны, особенно позвоночных. Принимают участие в разложении органических веществ растительного и животного происхождения. Некоторые являются фиксаторами атмосферного азота. Отдельные виды находят применение в микробиологической промышленности как продуценты для получения химических веществ (ацетона, бутанола), ферментов и т. д.

Среди клостридий есть и возбудители болезней человека и животных, всего 12 видов. Главными отличительными признаками патогенных клостридий являются особенности питания и способность продуцировать высокоактивные токсины, которым принадлежит ведущая роль в патогенезе вызываемых ими болезней, объединенных под общим названием клостридиозы. Они являются возбудителями анаэробной энтеротоксемии, столбняка, ботулизма, злокачественного отека (газовой гангрены), эмфизематозного карбункула, браздота и некро-

тического гепатита овец, анаэробной дизентерии ягнят, остеомиелита буйволов, бактериальной гемоглобинурии крупного рогатого скота, некротического энтерита и токсикоинфекции людей.

Каждая из этих болезней имеет свои особенности и вызывается определенным видом или типом возбудителя и их ассоциациями.

26.2. Возбудитель анаэробной энтеротоксемии сельскохозяйственных животных и дизентерии ягнят

Анаэробная энтеротоксемия – острая инфекционная болезнь сельскохозяйственных животных, главным образом молодняка, возникающая в результате всасывания токсинов возбудителя в кровь и характеризующаяся токсемией, расстройством желудочно-кишечного тракта, поражением почек, нервной системы и высокой летальностью.

Анаэробная дизентерия ягнят – аналогичная болезнь новорожденных ягнят, обусловленная токсинами *Cl. perfringens* типа В.

Микроорганизм, получивший по современной номенклатуре название *Cl. perfringens*, впервые выделили из трупов людей и ран больных газовой гангреной и описали под разными названиями в 1892 г. В. Вельх и Г. Нуттель в Америке, в 1893 г. Е Френкель в Германии, А. Войлон и А. Цибер во Франции и др. Видовое название дано от латинского глагола *perfringo* – разрывающий, прорывающий, что указывает на его активные биохимические и патогенные свойства. До 20-х гг. XX в. этот микроорганизм считался возбудителем только газовой гангрены. В последующем подобные микроорганизмы были выделены и описаны при дизентерии ягнят – *Lamb. Dysentery bacillus* (Т. Даллинг, 1926); при болезни *Struck* у овец в Англии – *Bac. paludis* (А. Д. МакЕвен, 1930); при энтеротоксемии у овец в Австралии – *Bac. ovitoxicus* (Х. В. Беннетт, 1932).

Вид *Cl. perfringens* представлен шестью типами: А, В, С, D, Е, F, разделенными на основании образования ими четырех основных летальных токсинов – α , β , ϵ (эпсилон) и ι (йота).

Возбудителя относят к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Clostridia*, порядку *Clostridiales*, семейству *Clostridiaceae*, роду *Clostridium*, виду *Cl. perfringens*.

Морфология. *Cl. perfringens* – неподвижная палочка с обрубленными или слегка закругленными концами размером $0,6-1,5 \times 4-8$ мкм. Под воздействием различных факторов (антибиотиков, изменения

состава среды, химических веществ и др.) бактерии могут принимать кокковидные или нитевидные формы длиной до 100–145 мкм. Клостридии грамположительны в молодых культурах и грамотрицательны в старых. В организме животных и средах, содержащих нативный белок, образуют капсулы. При неблагоприятных условиях во внешней среде, а также при длительном выращивании на безуглеводных, щелочных, богатых белками средах образуют крупные овальные споры, расположенные субтерминально (рис. 26.1, 26.2).



Рис. 26.1. *Cl. perfringens*, окраска по Граму

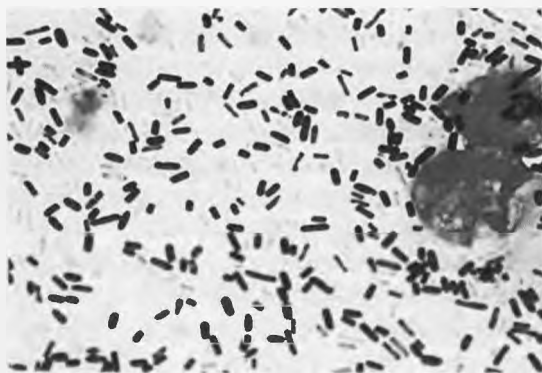


Рис. 26.2. *Cl. perfringens* (вегетативные клетки со спорами), окраска по Граму

Культуральные свойства. *Cl. perfringens* – нестрогий анаэроб, негребователен к питательным средам. Хорошо растет в среде Китта–Тароцци, на глюкозокровяном агаре Цейслера, мозговой и других средах. Температурный оптимум роста – 37 °С, оптимальное значение рН

сред 7,2–7,4. В среде Китта–Тароцци через 4–6 ч дает бурный рост, который сопровождается ее помутнением и газообразованием. На 2–6-е сут рост прекращается, среда просветляется, микробы оседают на дно пробирки.

На агаре Цейсслера бактерии образуют крупные, сочные колонии, окруженные одной или двумя светлыми зонами гемолиза. При доступе воздуха колонии приобретают зеленоватый оттенок, что является характерным для *Cl. perfringens*. Колонии могут быть в S-, R-, O- и M-формах. Культуры бактерий издают запах масляной кислоты. Могут встречаться отдельные штаммы, не дающие изменения цвета колоний при воздействии воздуха.

Биохимические свойства. *Cl. perfringens* обладает активными сахаролитическими свойствами. Более 90 % штаммов сбраживают с образованием кислоты и газа глюкозу, сахарозу, лактозу, галактозу, фруктозу, инозит, мальтозу, крахмал. Не встречаются штаммы, способные сбраживать маннит и дульцит. Протеолитические свойства выражены слабо. Свернутую сыворотку и вареные кусочки мяса разжижают медленно (на 2–7-й день). Желатин разжижают все штаммы. Большинство штаммов способны гидролизовать казеин. Характерной особенностью является способность бактерий свертывать лакмусовое молоко с образованием сгустка кирпичного цвета и полным просветлением молочной сыворотки.

Антигенная структура. Возбудитель продуцирует сложный токсин, состоящий из многих (не менее 15) факторов патогенности: α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, η -, θ -, ι -, κ -, λ -, μ - и ν -токсин и др. Токсины вырабатываются разными штаммами в различных сочетаниях, при этом ϵ - и ι -токсины вырабатываются в виде неактивных протоксинов, которые превращаются в активные токсины после воздействия протеолитических ферментов или же собственных протеаз.

Токсины альфа, бета, эпсилон, йота обладают выраженными летальными и некротическими свойствами, играющими основную роль в этиологии болезней, вызываемых *Cl. perfringens*, и их называют главными летальными токсинами. На обнаружении этих основных токсинов в реакции нейтрализации с типоспецифическими антитоксическими сыворотками основана идентификация типов *Cl. perfringens*. Другие, так называемые второстепенные растворимые антигены служат дополнительным средством уточнения внутритиповых вариантов. На основании антигенного состава токсических факторов различают шесть сероваров: А, В, С, D, E, F. В последние годы установлено, что

отдельные штаммы *Cl. perfringens* типов А, С и D способны синтезировать и энтеротоксин.

Бактерии, вырабатывающие токсин типа В, являются возбудителями анаэробной дизентерии ягнят. Анаэробную энтеротоксемию у гелят, поросят, лошадей, пушных зверей, птиц могут вызывать бактерии, продуцирующие токсин типов А, В, С, D, Е. Бактерии, продуцирующие токсин типа Е, у животных в хозяйствах Беларуси не зарегистрированы.

Устойчивость. Вегетативные формы бактерий малоустойчивы к действию солнечных лучей, высокой температуры, кислот, щелочей, антибиотиков, разных дезинфицирующих веществ. Например, 10%-й раствор натрия гидроксида, 5%-й раствор формалина, 1%-й раствор хлорной извести инактивируют микробы в течение 15–20 мин. Напротив, споры *Cl. perfringens* сохраняются во внешней среде годами. Существуют данные о том, что споры различных штаммов серовара А этого вида микроба выдерживают температуру 100 °С в течение 1–3 ч.

Патогенность. Анаэробной энтеротоксемией болеют преимущественно овцы и козы. Отмечаются случаи заболевания крупного рогатого скота, свиней, лошадей, верблюдов, пушных зверей, птиц и других видов животных, особенно молодняка. Из лабораторных животных восприимчивы к болезни кролики, морские свинки, голуби, белые мыши.

Факторами патогенности являются экзо- и эндотоксины, капсула.

Патогенез. Возбудитель болезни попадает в организм алиментарным путем. Энтеротоксемия может возникать как эндогенная инфекция в результате усиления токсигенности бактерий, обитающих в желудочно-кишечном тракте. Клостридии продуцируют токсины, которые вызывают воспаление слизистой оболочки тонкого и толстого отделов кишечника, некротические изменения, язвы, нарушают секреторную и моторную функции кишечника. Токсины всасываются в кровь, вызывают множественные кровоизлияния в органах и тканях, разрушают паренхиму почек и печени, вызывают интоксикацию, от которой животные гибнут.

Аналогично развивается и анаэробная дизентерия ягнят.

Лабораторная диагностика. Патологическим материалом служат паренхиматозные органы, брыжеечные лимфоузлы, тонкий отдел кишечника с содержимым, трубчатая кость, перитонеальная жидкость. При анаэробной дизентерии ягнят в лабораторию направляют труп полностью.

Для постановки диагноза на болезнь необходимы обнаружение токсинов в содержимом тонкого отдела кишечника или выделение чистой токсикогенной культуры и ее типизация.

Токсин выделяют из тонкого отдела кишечника и перитонеальной жидкости. Содержимое кишечника разводят 1:1 физраствором, экстрагируют при комнатной температуре 1 ч, фильтруют, центрифугируют 20–30 мин при частоте вращения 5000 мин^{-1} . Перитонеальную жидкость фильтруют без указанной предварительной обработки. Полученные фильтраты вводят внутривенно или внутривентально по $0,5 \text{ см}^3$ белым мышам массой 16–18 г или внутривенно кроликам (массой 1,5–2,0 кг) в дозе 1–1,5 см^3 . Контрольным животным вводят прокипяченный центрифугат и фильтрат в тех же дозах. Гибель животных от токсина наступает через 4–6 ч. Наблюдение за животными ведут в течение суток.

Чистую культуру и ее типизацию осуществляют общепринятыми в микробиологии методами. Тип токсина определяют в реакции нейтрализации с типовыми антитоксическими сыворотками. Для учета результатов реакции нейтрализации обычно используют белых мышей массой 16–18 г, которым внутривенно или внутривентально в объеме 0,5 мл вводят исследуемую культуру. Срок наблюдения за зараженными животными – 24 ч.

При подозрении на наличие типов D и E культуру подвергают активированию путем добавления 0,25 % панкреатина или 0,05 % трипсина при pH 8,0–8,2, для чего ее подщелачивают 10%-м раствором натрия гидроксида и выдерживают при 37–38 °C в течение 2 ч.

Лабораторный диагноз считается установленным при получении одного из следующих результатов:

при обнаружении токсина в кишечнике и определении его типа в реакции нейтрализации;

при выделении из содержимого кишечника культуры с характерными свойствами, продуцирующей токсин, тип которого установлен в реакции нейтрализации.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. У переболевших животных формируется антитоксический иммунитет. Антибактериальный иммунитет имеет второстепенное значение.

Для вакцинации овец используют гидроокисьюалюминиевую вакцину, а также поливалентный анатоксин против клостридиозов овец. В свиноводстве используется бивалентная вакцина против анаэробной энтеротоксемии и колибактериоза свиней.

Для пассивной профилактики и лечения применяют сыворотку против дизентерии ягнят и бивалентную антитоксическую сыворотку против анаэробной дизентерии ягнят и анаэробной энтеротоксемии овец.

26.3. Возбудители злокачественного отека

Злокачественный отек (газовая гангрена, раневой газовый отек) — острая, спорадически возникающая раневая неконтагиозная токсико-инфекционная болезнь животных и человека, характеризующаяся быстро распространяющимся воспалительным отеком тканей, их разрушением, образованием газов, общей интоксикацией организма, сепсисом. Возникает болезнь обычно после родов, абортот, ранений, травм, кастраций.

Основными возбудителями болезни являются *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. novyi (oedematiens)*, *Hathewayia histolytica* (син. *Cl. histolyticum*), реже — другие представители патогенных клостридий, т. е. злокачественный отек — полимикробная инфекция. Болезнь может вызывать каждый из упомянутых возбудителей, а также их ассоциации. При злокачественном отеке часто обнаруживают анаэробную бактерию *Cl. sporogenes*, *Cl. sordellii*, стрептококки, стафилококки, протей и другие микроорганизмы, которые самостоятельно болезнь не вызывают, но, обладая выраженными протеолитическими свойствами, способствуют обеспечению более благоприятных условий для активного размножения возбудителей.

Возбудителей злокачественного отека относят к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Clostridia*, порядку *Clostridiales*, семейству *Clostridiaceae*, роду *Clostridium*.

Биологические свойства возбудителей

1. *Cl. septicum*. Морфология. *Cl. septicum* — полиморфная палочка с закругленными концами длиной 3,1–14,1 мкм и шириной 1,1–1,6 мкм, подвижная, капсул не образует, формирует споры, расположенные центрально или терминально. Споры образуются в культурах и трупах. В молодых культурах бактерии грамположительны, в старых — грамотрицательны (рис. 26.3).

Cl. septicum впервые был выделен и описан Л. Пастером и Ж. Жубертом (1877) из трупа коровы, павшей от «септицемии», злокачествен-

ного отека. Видовое название получил от гр. *septicum* — септический, вызывающий гниение по характерному признаку, который отмечается у пораженных им животных.

На питательных средах, богатых белком, и в экссудате брюшной полости, особенно на поверхности печени, прилегающей к диафрагме, образуют длинные нити и цепочки из неоднородных члеников, что имеет значение при его идентификации от *Cl. chauvoei*.

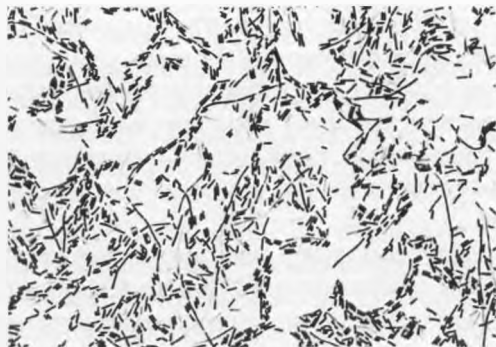


Рис. 26.3. *Cl. septicum*

Культуральные свойства. *Cl. septicum* — строгий анаэроб. Оптимальная температура роста — 37 °С, рН сред 7,6. В среде Китта–Тароцци через 16–24 ч наступает помутнение среды, сопровождающееся газообразованием. Через 48 ч среда просветляется, на дне пробирки образуется осадок. В агаре столбиком наблюдают образование колоний диаметром 1–2 мм, от которых радиально отходят отростки в виде перепутанных нитей. На агаре Цейсслера вырастают колонии с неровными, бахромчатыми краями, окруженные узкой зоной гемолиза. Иногда растет в виде слабозаметного вуалевидного налета.

Биохимические свойства. *Cl. septicum* ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, мальтозу, фруктозу, маннозу, не разлагает дульцит, глицерин, сахарозу и маннит, не образует индол.

Молоко свертывается медленно (через 3–5 дней), пептонизации сгустка казеина нет. Свернутую сыворотку не изменяет, на мозговой среде почернения не дает.

Токсинообразование. *Cl. septicum* продуцирует экзотоксин, состоящий из четырех компонентов: α (альфа), β (бета), γ (гамма), δ (дельта). Основным является α-токсин. Он отличается от лецитиназы *Cl. perfringens* и обладает летальным, гемолитическими и некротически-

ми свойствами: β - и δ -токсины являются гемолизинами, действующими на эритроциты; γ -токсин представляет собой фермент гиалуронидазу. В культуральных фильтратах этого микроба кроме указанных токсических компонентов обнаружены еще фибринолизин и коллагеназа, которые способствуют развитию деструктивных процессов в тканях.

В питательных средах *Cl. septicum* продуцирует токсин меньшей активности, чем *Cl. perfringens* и *Cl. novyi*.

Антигенная структура *Cl. septicum* имеет в своем составе O- и H-антигены. По H-антигену выявлено шесть сероваров (А, В, С, D, Е, F), обладающих летальным, гемолитическим и некротическим действиями.

Устойчивость. Вегетативные формы микроба неустойчивы к факторам внешней среды, особенно чувствительны к кислороду. Споры могут сохраняться годами и даже вегетировать в почве. Споровые формы устойчивы к дезинфицирующим веществам. Для их уничтожения во внешней среде используют 10%-й горячий раствор серно-карболовой смеси, 5%-й горячий раствор натрия оксида или 5%-й раствор формальдегида путем двукратного нанесения с интервалом 1 ч.

Патогенность. Микроб патогенен для всех видов животных. Из лабораторных животных наиболее чувствительны к нему морские свинки. В зависимости от вирулентности культуры и ее дозы они погибают в течение 12–24 ч. При подкожном заражении свинок развиваются характерные патологоанатомические изменения в виде разлитого отека красноватого цвета с пузырьками газа.

2. *Cl. novyi* (син. *oedematiens*). **Морфология.** *Cl. novyi* – прямые или слегка изогнутые палочки с закругленными концами, длиной 4–22 мкм и шириной 1–2 мкм (рис. 26.4). Палочки могут образовывать короткие цепочки. Бактерии грамположительные, слабоподвижные, образуют споры, расположенные субтерминально, капсул не формируют.

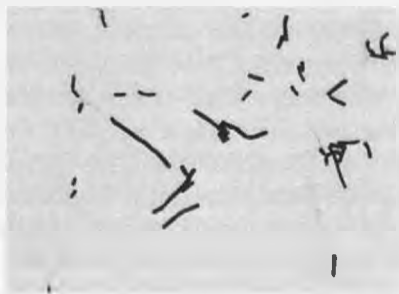


Рис. 26.4. *Cl. novyi*

Cl. novyi впервые был выделен американским бактериологом Нови в 1891 г. из трупов морских свинок, которым был введен нестерильный молочный протеин.

Культуральные свойства. *Cl. novyi* — строгий анаэроб. Температурный оптимум — 37–38 °С, оптимальное значение рН сред 7,2–7,4. По сравнению с другими патогенными клостридиями данный вид дает более замедленный рост на питательных средах. В жидких средах бактерии вызывают их равномерное помутнение с последующим осветлением и выпадением хлопьевидного осадка. На агаре Цейсслера через 2–3 сут формируются круглые или неправильной формы полупрозрачные колонии сероватого цвета, диаметром 3–8 мм, с неровными краями, иногда зернистой поверхностью. Они имеют тенденцию к ползучему росту и образованию дочерних колоний. Колонии типа А и В на кровяном агаре окружены прозрачной зоной гемолиза.

Биохимические свойства. Бактерии способны ферментировать глюкозу, инозит, мальтозу, маннозу, рибозу, а также целлюлозу, фруктозу, глицерин, раффинозу, сахарозу, в зависимости от сероварианта. Протеолитические свойства выражены слабо. Мозговая среда не чернеет. Молоко свертывается медленно с выпадением мелких хлопьев, пептонизация не наступает.

Токсинообразование. *Cl. novyi* в организме и при росте на элективных питательных средах синтезирует и выделяет очень активный и сложный токсин, состоящий из восьми компонентов, определяющих патогенность и обладающие летальными, некротическими, гемолитическими свойствами и способностью вызывать отек.

Антигенная структура. Различают три типа *Cl. novyi* — А, В, С. Из них тип А — один из возбудителей злокачественного отека, тип В — некротического гепатита овец, тип С — остеомиелита буйволов.

Устойчивость. Vegetативные формы клостридий малоустойчивы, а споровые — высокоустойчивы во внешней среде. В почве сохраняются десятилетиями, переносят кипячение в течение 1–2 ч, являются устойчивыми к действию дезинфицирующих веществ.

Патогенность. Вирулентность типа А и В *Cl. novyi* очень высокая для всех видов животных. Подкожное или внутримышечное введение культур в дозе 0,1–0,5 мл вызывает гибель морских свинок через 12–36 ч. При вскрытии павших свинок отмечают стекловидно-студенистый отек подкожной клетчатки и пораженных участков тела слабожелтого или розоватого цвета с пузырьками газа. При внутримышечном заражении отежные участки обычно имеют розоватый цвет. Тип С

непатогенен для лабораторных животных и не играет роли в этиологии злокачественного отека животных и газовой гангрены людей.

3. *Hathewayia histolytica* (син. *Cl. histolyticum*). **Морфология.** *Hathewayia histolytica* представляет собой прямые палочки длиной 3–5 мкм, шириной 0,2–0,5 мкм, с закругленными концами, хорошо окрашивающийся спирто-водными растворами анилиновых красок, грамположителен, образует споры, расположенные центрально или субтерминально. В организме спор не формирует, капсулу не образует, в свежих культурах подвижен.

Hathewayia histolytica впервые был выделен в 1916 г. М. Вейнбергом и П. Сегеном из ран людей, больных газовой гангреной. Название получил от греческого «растворяющий ткани» за сильно выраженные протеолитические свойства.

Культуральные свойства. *Hathewayia histolytica* — факультативный анаэроб. В аэробных условиях может давать слабый рост. Возбудитель хорошо растет при температуре 37–38 °С и оптимальном значении рН питательных сред (7,2–7,4).

При росте в среде Китта–Тароцци вызывает ее помутнение и образование осадка. Рост микробов не сопровождается газообразованием.

На агаре с кровью через 24–48 ч после посева бактерии формируют колонии диаметром 0,5–2 мм, неправильной округлой формы, выпуклые, с ровными краями, от прозрачного до мутного оттенков, что зависит от степени споруляции, окруженные узкой зоной гемолиза.

Биохимические свойства. Биохимической особенностью возбудителя является его высокая протеолитическая активность. Кусочки нативных мышц, помещенные в жидкую питательную среду с растущей культурой, подвергаются быстрому протеолизу. Необходимо отметить, что этот микроорганизм не ферментирует ни один из сахаров.

Токсинообразование. *Hathewayia histolytica* образует сложный токсин из пяти компонентов: альфа, бета, гамма, дельта, эпсилон.

Антигенная структура. Антигенное строение возбудителя представлено О- и Н-антигенами.

Устойчивость. Споры возбудителя высокоустойчивы и могут оставаться во внешней среде жизнеспособными в течение нескольких лет. В отличие от них, вегетативные клетки малоустойчивы по отношению к факторам внешней среды.

Патогенность. Степень диссоциации определяет патогенность *Hathewayia histolytica*. Патогенными являются только штаммы в гладкой

форме. При внутримышечном введении 0,5 мл суточной бульонной культуры морские свинки погибают через несколько часов или суток с развитием типичной картины, характеризующейся расплавлением всех мягких тканей вокруг места инъекции.

4. *Cl. sordellii*. Морфология. Полиморфные палочки с закругленными концами размером 1,1–1,6 × 3,1–4,5 мкм. Бактерии расположены изолированно, часто отмечается образование небольших цепочек из 3–4 члеников. Подвижные, перитрих, активно подвижен в молодых культурах. Капсулу не синтезирует. По Граму окрашивается положительно. Образует овальные, центральные или субтерминальные споры.

Cl. sordellii был выделен А. Сорделли в 1922 г. в Аргентине из гангренозного аппендикса и впоследствии назван в честь первооткрывателя.

Культуральные свойства. Факультативный анаэроб, растет при температуре 37–38 °С и оптимальном значении рН питательных сред (7,2–7,4). На среде Китта–Тароцци в течение 24 ч вызывает интенсивное помутнение и выделение газа, в старых культурах часто появляется слизь в виде нитей, культуры издают неприятный гнилостный запах.

На агаре с кровью через 24–48 ч образует слабовыпуклые или плоские колонии небольших размеров (1–2 мм в диаметре) с шероховатой поверхностью и неровными краями, с узкой зоной гемолиза.

Биохимические свойства. Микроб обладает сильными протеолитическими свойствами. Молоко медленно пептонизируется, яичный белок, желатин и свернутая сыворотка разжижаются, мозговая среда не чернеет. Вырабатывает индол, сероводород. Проявляет выраженную уреазную активность. Ферментирует глюкозу, мальтозу, фруктозу и не расщепляет лактозу, маннит и сахарозу.

Токсинообразование. Вирулентные штаммы *Cl. sordellii* вырабатывают высокоактивный термолабильный летальный некротический токсин, вызывающий желатинозный отек (разрушается при температуре 60 °С). Этот токсин напоминает α-токсин *Cl. novyi*, но нейтрализуется специфической антисывороткой антисорделли. Кроме того, он продуцирует лецитиназу, гиалуронидазу, желатиназу и коллагеназу.

Антигенная структура. Антигенное строение возбудителя представлено О- и Н-антигенами.

Устойчивость. Споры *Cl. sordellii* устойчивы к факторам внешней среды, вегетативные клетки — малоустойчивы.

Патогенность. *Cl. sordellii* обладает выраженной патогенностью для лабораторных животных. При введении 0,5–1,0 мл культуры в мышцу

морской свинки или кролика они погибают в течение 24 ч с патолого-анатомической картиной, сходной с таковой при введении *Cl. novyi*. На месте инъекции культуры развивается желатинозный отек с пузырьками газа без расслаивания и некроза мышц.

Лабораторная диагностика. Злокачественный отек диагностируют с помощью микроскопии препаратов из патологического материала, проводят посевов на питательные среды, выделяют чистые культуры и осуществляют их идентификацию и постановку биопробы.

Материалом для исследования являются кусочки паренхиматозных органов, мышц, тканевой и раневой экссудат.

Мазки окрашивают по Граму и Муромцеву. При микроскопии препаратов-отпечатков и препаратов-мазков отмечают форму микробов, их расположение, наличие спор.

Свежий материал пастеровской пипеткой засевают на среду Китта–Тароцци, а также в МПБ и на МПА. С жидкой питательной среды для выделения чистой культуры делают дробные посевы на чашки с глюкозо-кровяным агаром. Посевы инкубируют в анаэробных условиях 24–48 ч при температуре 37–38 °С. Обращают внимание на характер роста микробов в жидких средах и на поверхности плотных питательных сред.

При постановке биопробы используют две морские свинки, которым вводят суспензию из патологического материала или выделенную культуру подкожно в области брюшных мышц в дозе 0,5–1 см³. При наличии в исследуемом материале возбудителей болезни морские свинки погибают в течение 16–48 ч. При вскрытии у павших животных обнаруживают характерные изменения для того или иного возбудителя.

Лабораторный диагноз считают окончательно установленным в случае:

выделения из патологического материала культуры со свойствами, характерными для одного из возбудителей болезни, гибели одной морской свинки и выделении из ее органов культуры, типичной для одного из возбудителей злокачественного отека;

при гибели одной морской свинки и выделении из ее органов культуры, характерной для одного из возбудителей болезни, если даже из исходного патологического материала культура изолирована не была.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет преимущественно антитоксический. В связи со спорадичностью, полимикробностью этиологии и быстрым течением болезни активная профилактика злокачественного отека не нашла

практического применения. При угрозе инфицирования травматических повреждений рекомендуются пассивная иммунопрофилактика поливалентной антитоксической сывороткой, а также хирургическая обработка ран, применение антибиотиков и симптоматических средств.

26.4. Возбудитель браздота овец

Браздот овец – острая инфекционная болезнь овец, характеризующаяся образованием отечных инфильтратов в подкожной клетчатке, геморрагическим воспалением слизистой оболочки сычуга и двенадцатиперстной кишки, усиленным газообразованием в желудочно-кишечном тракте, особенно в желудке.

Болезнь распространена во всех странах с развитым овцеводством. Описаны случаи заболевания коз и свиней.

Вначале браздот овец принимали за сибирскую язву. В 1875 г. Ф. Курубье дал подробное описание этой болезни и усомнился в ее идентичности с сибирской язвой. В 1888 г. Е. Нильсон (Норвегия) научно обосновал отличие браздота от сибирской язвы и выделил возбудителя.

Возбудителем болезни является *Cl. septicum*. Другие анаэробные микроорганизмы, выделяемые из трупов овец, павших с признаками браздота, в этиологии болезни самостоятельной роли не играют. В литературе есть сведения о том, что *Cl. novyi* также является возбудителем браздота. Установлено, что этот микроорганизм является возбудителем некротического гепатита овец, который в последние годы рассматривается как отдельная болезнь.

Патогенность. В естественных условиях болеют овцы независимо от пола и возраста. Чаще болеют животные в возрасте до двух лет. Болезнь может возникать в любое время года, чаще весной и осенью. Браздот поражает самых упитанных, малоподвижных овец. При вспышке браздота заболевают 30–35 % овец. Летальность достигает 90–100 %.

Фактором патогенности является экзотоксин сложного состава, содержащий четыре компонента: α -, β -, γ -, δ -токсины. Кроме экзотоксина, факторами патогенности являются фибринолизин и коллагеназа.

Микроб патогенен для всех лабораторных животных, при постановке биопробы в основном используют морских свинок.

Патогенез. Возбудитель браздота является постоянным обитателем желудочно-кишечного тракта. Проникая в стенки сычуга и 12-перстной кишки, возбудитель быстро размножается и выделяет сильный токсин, который вызывает отравление организма.

Лабораторная диагностика. Возбудитель браздота с помощью микроскопии, бактериологического исследования и биопробы.

Патологическим материалом при лабораторной диагностике служат инфильтрат подкожной клетчатки, паренхиматозные органы, лимфоузлы, трубчатая кость, участок 12-перстной кишки с содержимым, экссудат брюшной и грудной полостей. Материал необходимо брать сразу же после гибели животных, так как у овец происходит быстрое размножение анаэробных микроорганизмов в кишечнике и их проникновение в органы и ткани.

При микроскопии препаратов со слизистой сычуга обнаруживают большое количество грамположительных палочек.

Бактериологическое исследование проводят путем посева патологического материала на питательные среды с последующим выделением чистой культуры, изучением характера ее роста и идентификацией.

Биопробу ставят на морских свинках, которых заражают подкожно или внутримышечно в дозе 0,5–1,0 мл суспензией из пораженных органов, тканей, экссудатом из брюшной полости. Морские свинки погибают в течение 16–20 ч от токсинемии. С поверхности печени погибших морских свинок делают препараты-отпечатки, в которых обнаруживают возбудителя в виде длинных нитей, что отличает его от возбудителя шумящего карбункула (при карбункуле в препаратах-отпечатках единичные парные кокки).

Диагноз на браздот считают установленным при:

выделении из исходного материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя данной болезни, и гибели хотя бы одной из двух зараженных полученной культурой морских свинок с типичной для данного возбудителя патологической картиной и выделением из ее органов культуры возбудителя;

гибели хотя бы одной морской свинки из двух, зараженных исходным материалом, при наличии у нее типичной для данного возбудителя патологоанатомической картины и выделения из ее органов культуры возбудителя, если даже в посевах из исходного материала культуры возбудитель не выделен.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. С целью профилактики браздота овец вакцинируют полива-

лентной гидроокисьалюминиевой концентрированной вакциной против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят, а также применяют полианатоксин против клостридиоза овец.

26.5. Возбудитель эмфизематозного карбункула

Эмфизематозный карбункул — инфекционная острая неконтагиозная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся крепитирующими отеками мышечной ткани, лихорадкой, хромотой и быстрой гибелью животных. Зарегистрированы случаи заболевания буйволов, овец и коз.

Возбудитель болезни изучен и описан американским бактериологом Й. Фезером в 1865 г. Название дано в честь французского бактериолога Шаво, доказавшего инфекционную природу эмфизематозного карбункула.

Возбудителя относят к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Clostridia*, порядку *Clostridiales*, семейству *Clostridiaceae*, роду *Clostridium*, виду *Cl. chauvoei*.

Морфология. Возбудитель *Cl. chauvoei* — грамположительная палочка, прямая или слегка изогнутая, с закругленными концами, капсул не образует, подвижна (перитрих), ширина — 0,5–0,8 мкм, длина — 2–8 мкм. В препаратах из тканей палочки расположены одиночно, парами, редко по 3–4 (рис. 26.5). Образует крупные споры, которые шире вегетативной клетки, расположены центрально или субтерминально (палочка со спорой имеет форму лимона, веретена, груши, шара).



Рис. 26.5. *Clostridium chauvoei*

Вегетативные клетки хорошо окрашиваются водно-спиртовыми растворами анилиновых красок. Бактерии могут окрашиваться биполярно, в цитоплазме часто обнаруживают зернистость. Микробы из молодых культур окрашиваются грамположительно, старых — грамотрицательно.

Культуральные свойства. *Cl. chauvoei* — строгий анаэроб. Температурный оптимум культивирования — 36–38 °С. Оптимальное значение рН сред 7,2–7,6. Для культивирования применяют специальные среды: Китта–Тароцци, агар Цейсслера, мозговую, бульон Мартена, сывороточный агар.

В среде Китта–Тароцци наблюдают пышный рост с газообразованием, значительным помутнением среды, на 2–3-и сут среда проясняется. На дно пробирки выпадает рыхлый белый осадок. Аналогичный рост наблюдается в бульоне Мартена. Старые культуры издают запах прогорклого масла.

Чашки Петри с глюкозо-кровяным агаром помещают в анаэро-стат. На глюкозо-кровяном агаре Цейсслера микроорганизм растет в виде круглых нежных колоний с синевато-фиолетовым оттенком, напоминающим перламутровую пуговицу, или похожих на виноградный лист, которые окружены узкой зоной гемолиза (рис. 26.6). При росте в мозговой среде почернения не наступает.

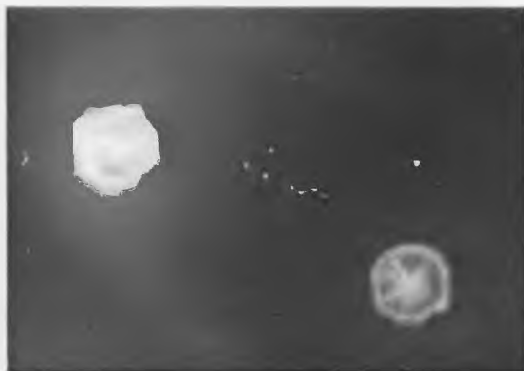


Рис. 26.6. Рост *Clostridium chauvoei* на кровяном агаре

Биохимические свойства. Возбудитель эмкара обладает хорошо выраженной биохимической активностью.

Он разжижает МПЖ на 2–6-е сут; свернутую сыворотку и яичный белок не разжижает; коагулирует молоко 3–6-е сут роста, его сгусток

имеет вид мягкой губчатой массы, пептонизации сгустка не наступает. Индол не образует, большинство штаммов продуцируют незначительное количество сероводорода, нитраты в нитриты не редуцирует. Ферментирует с выделением кислоты и газа глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, галактозу, левулезу. Не разлагает маннит, салицин, глицерин, дульцит, инулин. Ферментацию сахарозы и несбраживание салицина считают характерным для *Cl. chauvoei* в отличие от *Cl. septicum*.

Токсинообразование. Образует очень слабый токсин. В его составе обнаружены гемотоксический и некротизирующий компоненты.

Антигенная структура. Антигенное строение возбудителя представлено О- и Н-антигенами. Кроме того, дифференцирован споровый S-антиген, общий с *Cl. septicum*, что приводит к перекрестной агглютинации у этих двух клостридий.

Устойчивость. Вегетативная форма малоустойчива к воздействию факторов внешней среды. Споры могут сохраняться на дне водоемов до 10 лет, в почве – 20–25 лет, выдерживают кипячение более 10 мин. Прямые солнечные лучи убивают их через 24 ч.

Патогенность. Человек не болеет эмкаротом. Преимущественно болеют крупный рогатый скот, овцы, редко – козы, буйволы, олени, лоси, зубры, еще реже – свиньи. Лошади и ослы, собаки и кошки невосприимчивы к болезни.

Наиболее восприимчив молодняк в возрасте от 3 мес. до 4 лет. Животные старше четырех лет резистентны за счет иммунизирующей субинфекции, телята до 3-месячного возраста – благодаря колостральному иммунитету. Более чувствительны упитанные животные с хорошо развитой мышечной тканью, которая содержит много гликогена, необходимого для размножения микроба.

Из лабораторных животных восприимчивы морские свинки, гибнут через 16–48 ч с момента заражения.

Факторы патогенности – экзотоксин, дезоксирибонуклеаза, гиалуронидаза, гемолизин.

Патогенез. Заражение животных происходит через пищеварительный тракт. Возбудитель может проникнуть в организм через ранки на поверхности тела. Не исключена возможность заражения через органы дыхания.

Токсин подавляет фагоцитоз, нарушает целостность сосудов, что ведет к отеку, некрозу тканей. Продукты распада тканей, токсины являются причиной лихорадки, нарушения сердечной деятельности, расстройства дыхания.

Лабораторная диагностика. Патологическим материалом для исследования служат кусочки пораженных мышц, экссудат из крепитирующего отека. В случае вскрытия трупа берут кусочки печени, кровь из сердца (вскрытие недопустимо, почвенная инфекция). При жизни можно брать содержимое отека с помощью иглы и шприца.

Лабораторная диагностика включает микроскопию, посевы на питательные среды, заражение лабораторных животных.

При микроскопии обнаруживают полиморфные грамположительные, зернисто окрашенные палочки.

Патологический материал обычно сильно обсеменен различными микроорганизмами, поэтому применяют методы подавления сопутствующей микрофлоры:

- 1) высушивают в термостате – вегетативные клетки гибнут, споры живы;
- 2) прогревают при 80 °С – 15 мин;
- 3) высевают на среды с добавлением фенола, кристаллвиолета или глицерина натрия.

Патологический материал высевают на среду Китта–Тароцци и нагар Цейслера, а также в МПБ и на МПА для исключения аэробной микрофлоры.

Одновременно с посевами заражают две морские свинки, которым вводят суспензию растертых кусочков пораженных мышц или другой материал в дозе 0,5–1 мл подкожно или внутримышечно. Их гибель наступает через 24–96 ч с характерной патологоанатомической картиной. При выживании зараженных патологическим материалом животных биопробу ставят повторно с использованием очищенных культур.

При необходимости дифференцировать эмкар от злокачественного отека суспензией или культурой заражают кролика массой 2,0–2,5 кг подкожно в область спины в дозе 1–1,5 мл. От возбудителя эмкара кролик не погибает.

Лабораторный диагноз считают установленным при:

выделении из патологического материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя эмкара, и гибели хотя бы одной морской свинки с типичной патологической картиной и выделением из ее органов культуры;

гибели одной морской свинки и выделении из ее органов культуры, даже если в исходном материале возбудитель не был обнаружен.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Переболевшие животные приобретают длительный активный иммунитет.

Для профилактики эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец применяются концентрированная гидроокисьалюминиевая вакцина, живая концентрированная вакцина из штамма 2/14, ассоциированная живая (жидкая) вакцина против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула.

Гипериммунизацией молодняка крупного рогатого скота и жеребят готовят специфическую иммунную сыворотку, обладающую профилактическим и терапевтическим действием.

26.6. Возбудитель ботулизма

Ботулизм – неконтагиозная болезнь многих видов животных характеризующаяся токсинемией, параличом языка, мускулатуры глотки, нарушением жевательных и глотательных движений, расслаблением мускулатуры тела, поражением центральной нервной системы, парезами двигательной мускулатуры.

Возбудитель *Cl. botulinum* выделен голландским исследователем Э. ван Эрменгеном в 1896 г. Название болезни связано с отравлениями у людей, употреблявших кровяную колбасу (лат. *botulus* – колбаса). Исследователь выделил бактерии из ветчины, а также из селезенки человека, погибшего от ботулизма. Ботулизм – результат использования для животных недоброкачественного корма, содержащего токсин возбудителя болезни, который локализовался и размножился в кормах, загрязненных почвой.

Возбудителя относят к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Clostridia*, порядку *Clostridiales*, семейству *Clostridiaceae*, роду *Clostridium*, виду *Cl. botulinum*.

Морфология. *Cl. botulinum* – палочка с закругленными концами шириной 0,3–1,9 и длиной 3,4–9,4 мкм, подвижная, капсул не образует, формирует споры, которая расположена субтерминально, бактерия со спорой напоминает теннисную ракетку (рис. 26.7). Возбудитель образует споры в организме, почве, кормах, питательных средах. Молодые клетки окрашиваются по Граму положительно. При старении они теряют это свойство и в культурах 4–5-дневного роста окрашиваются грамотрицательно.



Рис. 26.7. *Clostridium botulinum*

Культуральные свойства. Возбудитель – строгий анаэроб. Оптимальное значение pH сред 7,4–7,7, температурный оптимум для сероваров А, В, С, D – 35 °С, Е и F – 28–30 °С. Культивируют бактерии на средах Китта–Тароцци, глюкозо-кровяном агаре Цейсслера. В среде Китта–Тароцци растет, вызывая ее помутнение, культура издает запах прогорклого масла, на дне образуется осадок, среда просветляется. На глюкозо-кровяном агаре возбудитель образует колонии округлой или неправильной формы, 1–8 мм в диаметре, с ровными или слегка изрезанными краями, прозрачные или серовато-белые, гладкие или шероховатые, окруженные прозрачной зоной гемолиза. В столбике сахарного агара колонии имеют вид пушинок или зерен чечевицы.

Биохимические свойства. *Cl. botulinum* ферментирует фруктозу, глюкозу и некоторые другие углеводы в зависимости от типа и штамма, однако сахаролитические свойства всех типов очень вариабельны и не служат основой для определения видовой принадлежности и типизации.

Бактерии сероваров А и В обладают высокой протеолитической активностью: они полностью переваривают кусочки печени и мышц в жидких средах; протеолитические свойства у серовара А выражены слабее и минимальны у сероваров С, В и Е. Возбудитель разжижает МПЖ, пептонизирует молоко, изменяет мозговую среду: она чернеет, выделяет сероводород.

Токсинообразование. В анаэробных условиях в организме животных, субстратах растительного и животного происхождения, а также на специальных питательных средах *Cl. botulinum* синтезирует чрезвычайно активный экзотоксин, относящийся к группе нейротоксинов. По антигенному составу экзотоксина установлено семь типов *Cl. botulinum*: А, В, С, D, Е, F, G. Однако микроорганизм *Cl. botulinum*, проду-

цирующий токсин типа G, реклассифицирован в новый вид *Cl. argentinense*. Самый сильный токсин вырабатывает тип А. Этот токсин по своей силе превосходит все известные природные яды: 10 мг кристаллического токсина способны отравить население всего земного шара (С. Мартынов, 1969). Токсины *Cl. botulinum* состоят из нескольких токсических факторов: нейротоксина, гемолизина, гемолизина-гемоагглютинина, липазы и протеазы.

Антигенная структура. Все семь сероваров экзотоксина обладают иммунологической специфичностью, выявляемой в реакции нейтрализации. Возбудитель ботулизма имеет также жгутиковый Н-антиген и соматический О-антиген.

Устойчивость. Вегетативные клетки малоустойчивы, споры устойчивы. В высушенном состоянии могут оставаться жизнеспособными десятилетиями. Споры хорошо переносят низкие температуры и не погибают при минус 190 °С. Желудочный сок и пищеварительные ферменты их не разрушают. Надежным способом обезвреживания спор является автоклавирование не менее 30 мин при 120 °С.

Устойчивы споры и к различным бактерицидным веществам. В 5%-м феноле они сохраняются одни сутки, 10%-й раствор соляной кислоты убивает их при комнатной температуре через 1 ч, 40%-й формалин в двойном разведении — через 24 ч, в этиловом спирте и в среде, содержащей 14 % поваренной соли, они могут сохранять жизнеспособность 2 мес.

Ботулинистический токсин в жидких средах разрушается при кипячении через 15–20 мин, в твердых субстратах — через 2 ч. Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин) не разрушают токсины сероваров А, В, С, D, F, но усиливают активность токсина серовара Е. В кислой среде при рН 3,5–6,8 устойчивость токсинов больше, чем в щелочной, при рН 7,8 они значительно снижают свои токсические свойства, рН выше 8,5 их инактивирует.

В зерне токсин может сохраняться месяцами; солнечный свет и высушивание его ослабляют, но полностью не обезвреживают зерно в течение 93 дней. Зерно, обработанное 1%-м раствором натрия гидроксида, теряет токсические свойства через 3–6 ч.

Патогенность. Чувствительны к ботулиническому токсину лошади, крупный рогатый скот, овцы, козы. Значительно устойчивы в естественных условиях свиньи, не болеют собаки, кошки, волки, койоты и другие хищники, серые крысы. Очень чувствительны норки, восприимчивы птицы: куры, индейки, утки, гуси, чайки, голуби.

Восприимчив к ботулизму и человек, в качестве этиологических факторов заболевания являются клостридии сероваров А, В и Е.

Из лабораторных животных чувствительны к токсину белые мыши, морские свинки, кролики, голуби. Основным фактором патогенности — экзотоксин.

Возбудитель ботулизма *Cl. botulinum* является наиболее известным пищевым патогеном. Увеличению количества случаев отравления ботулиническим токсином способствуют плохая термическая обработка консервированной пищи и ее хранение при несоответствующих регламенту температурных режимах. Однако, как оказалось, *Cl. botulinum* не единственный микроорганизм, способный вызывать ботулизм. В фекалиях больных ботулизмом людей обнаружены и затем из них выделены другие организмы, продуцирующие ботулотоксин В, — *Cl. barati*, *Cl. butyricum*. Этот токсин требует большого количества антитоксина для его нейтрализации или смеси антитоксинов В и F. Атипичные вспышки ботулизма описаны в Италии, Китае и Индии, у детей и взрослых людей в виде кишечного ботулизма. Эти данные, по мнению ученых, позволяют предположить, что происходит глобальное распространение ботулинических тоx-генов в популяциях близкородственных микроорганизмов, сопровождающееся появлением новых серотипов токсинов.

Патогенез. Токсин в организм попадает с кормом, проникает в кровь, из крови — в органы, поражает нервные элементы. Ботулинический токсин обладает нейротропностью. Действуя на нейроны спинальных моторных центров и продолговатого мозга, вызывает развитие паралитического синдрома; поражение же периферических моторных нервно-мышечных волокон сопровождается нарушением передачи возбуждения с нерва на мышцу. В больших дозах токсин угнетает тканевое дыхание головного мозга, а также является сосудистым ядом.

Лабораторная диагностика. Основана на бактериологическом, серологическом и биологическом методах исследований.

Для исследования в лабораторию направляют пробы подозрительных кормов (силос, зерно, комбикорма, мясные и рыбные отходы), а также содержимое желудка, кусочки печени павших (не позднее чем через 2 ч после гибели) и кровь от больных животных.

Доставленный материал исследуют одновременно на наличие ботулинических токсинов и возбудителя (проверка токсигенности культуры), кровь — только на наличие ботулинических токсинов (ввиду быстрого разрушения токсина исследование проводят непосредственно в хозяйстве).

Микроскопия первичного материала диагностического значения не имеет.

Пробы корма, содержимое желудка, кусочки печени массой 25–30 г тщательно растирают в ступке со стерильным песком и заливают равным или двойным объемом физиологического раствора. Полученную гомогенную взвесь оставляют на 2 ч при комнатной температуре для экстрагирования. Две трети взвеси используют для обнаружения токсина и одну треть — для выделения возбудителя.

Для обнаружения ботулинического токсина экстракты проб корма и исследуемого материала фильтруют через вату или центрифугируют 30 мин при частоте вращения 3000 мин⁻¹, делят на две части. Одну часть прогревают в кипящей водяной бане в течение 20–30 мин. Каждым фильтратом (кипяченым и некипяченым) исследуемого материала заражают внутривенно или внутрибрюшинно двух белых мышей массой 16–18 г в дозе 0,5–0,8 мл. При наличии ботулинического токсина животные, зараженные некипяченым фильтратом, погибают на 2–5-е сут с характерной клиникой ботулизма (шаткая походка, учащенное дыхание, расслабление скелетной мускулатуры, западение брюшной стенки — «осиная талия»). Животные, которым вводили кипяченый фильтрат, остаются здоровыми.

В случае если токсин не обнаружен в исходном материале, проводят выделение культуры возбудителя, делая посевы на среду Китта–Тароцци, бульон Хоттингера, агар Цейслера. Затем культуральную жидкость (из МППБ) проверяют на токсигенность.

При обнаружении в исследуемом материале токсина ставят реакцию нейтрализации с типовыми ботулиническими сыворотками. Так как в исследуемом материале могут находиться два типа токсинов или более, реакцию нейтрализации выполняют по следующей схеме: сыворотки типов А, В, С, D, Е в объеме 0,2 мл смешивают в одной пробирке и добавляют в нее 1 мл исследуемой взвеси. Смесь выдерживают в течение 45 мин при комнатной температуре или 30 мин при 35–37 °С. Затем по 0,8 мл вводят внутрибрюшинно двум белым мышам массой 16–18 г. Одновременно двум другим животным вводят исследуемый материал в той же дозе в смеси с равным количеством физиологического раствора (контроль). При наличии ботулинического токсина белые мыши, которым исследуемый материал вводили в смеси с сыворотками, остаются живыми, а контрольные — погибают на 2–4-е сут. При отсутствии необходимости определения типовой принадлежности токсина полученные результаты являются основанием для постановки диагноза.

Для определения типовой принадлежности ботулинического токсина реакцию нейтрализации ставят по следующей схеме: исследуемый материал по 2,4 мл разливают в шесть пробирок, в пять из которых добавляют по 0,6 мл типовых сывороток: в первую – тип А, во вторую – тип В, в третью – тип С, в четвертую – тип D, в пятую – тип Е, а в шестую – такой же объем физиологического раствора. Пробирки со смесью выдерживают, как и в первом случае, а затем содержимое каждой из пробирок вводят внутривенно или внутрибрюшинно двум белым мышам в дозе 0,8–1,0 мл. Результаты реакции нейтрализации учитывают в течение 4 дней.

Животные, которым исследуемый материал вводился в смеси с гомологичной сывороткой, остаются живыми, а остальные погибают с клиническими признаками ботулизма. При обнаружении в материале ботулинического токсина дальнейшую работу по выделению культуры не проводят.

Лабораторный диагноз на ботулизм считают установленным при: обнаружении ботулинического токсина в исследуемом материале (без выделения культуры);

выделении из исходного материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя ботулизма с последующим определением биологическим методом ее токсичности.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. При ботулизме иммунитет антитоксический. Переболевшие животные и человек иммунитета не приобретают. Для специфической профилактики используют анатоксины, преципитированные квасцами или сорбированные на растворе алюминия гидроксида (анатоксин против ботулизма норок). Медицинская промышленность выпускает антитоксическую сыворотку.

26.7. Возбудитель столбняка

Столбняк – остропротекающая, неконтагиозная раневая токсико-инфекционная болезнь млекопитающих животных, птиц и человека, характеризующаяся повышенной рефлекторной возбудимостью, судорожными тоническими и клоническими сокращениями мышц под влиянием экзотоксина возбудителя, образующегося в месте его проникновения.

Описание болезни у человека дал Гиппократ в IV в. до н.э. Впервые возбудителя столбняка открыл в 1883 г. Н. Д. Монастырский. В

1884 г. А. Николайер обстоятельно описал возбудителя столбняка и экспериментально воспроизвел болезнь у мелких животных. В 1890 г. Б. Фабер обнаружил столбнячный токсин. Э. Беринг и Л. Кнорр в 1896 г. получили антитоксическую сыворотку, а Г. Рамон в 1923 г. приготовил анатоксин.

Возбудителя относят к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Clostridia*, порядку *Clostridiales*, семейству *Clostridiaceae*, роду *Clostridium*, виду *Cl. tetani*.

Морфология. Возбудитель столбняка – грамположительная прямая палочка с закругленными концами, перитрих (может иметь до 10 жгутиков и более), капсулу не образует, формирует споры, которая расположена на конце микробной клетки, что придает возбудителю вид барабанной палочки (рис. 26.8). Ширина споры в 2–3 раза превышает таковую бактерии. Длина столбнячной палочки может достигать 3–12 мкм, ширина – 0,3–1,0 мкм. Споры формируются в организме и в культурах через 2–3 сут после посева патологического материала. Палочки со спорами неподвижны. В препаратах из жидких сред можно наблюдать бактерии в виде длинных изогнутых нитей. Культуры в жидких средах на 4–6-е сут роста почти не содержат вегетативных клеток и состоят в основном из спор из-за лизиса бактерий. В старых культурах часть бактерий грамотрицательная.



Рис. 26.8. *Clostridium tetani*

Культуральные свойства. Клостридии столбняка культивируют на среде Китта–Тароцци, агаре Цейслера, глюкозо-кровяном агаре, в желатине и других средах для выращивания анаэробов. Температурный оптимум культивирования – 36–38 °С, оптимальное значение рН сред 7,4–7,6, возбудитель столбняка – строгий анаэроб.

В среде Китта–Тароцци видимый рост появляется через 24–36 ч, среда равномерно мутнеет, наблюдается газообразование. Через 5–7 сут выпадает осадок и наступает просветление среды, культура имеет запах жженого рога.

На агаре Цейслера на 2–4-й день роста возбудитель столбняка формирует круглые, диаметром 4–6 мм, плоские прозрачные или слегка сероватые с матовой поверхностью колонии с неровными, ветвящимися краями, окруженные слабой зоной гемолиза.

В высоком столбике агара через 1–2 сут вырастают колонии, похожие на чечевичное зерно, иногда диск или пушинку с плотным центром.

Биохимические свойства. Возбудитель столбняка малоактивен в биохимическом отношении. Он не сбраживает моносахариды и многоатомные спирты. *Cl. tetani* обладает слабыми протеолитическими свойствами, способен вызывать медленную ферментацию протеинов и пептидов до аминокислот. В столбике желатина через 5–12 сут появляется рост бактерий, напоминающий елочку, и происходит медленное разжижение среды.

Токсинообразование. Возбудитель столбняка вырабатывает сильный токсин, который состоит из двух компонентов: тетаноспазмина и тетаногемолизина. Тетаноспазмин является главным летальным фактором, который действует на нервную систему животных и человека и вызывает тоническое сокращение поперечнополосатых мышц, характерное для столбняка. Биологическое действие тетаногемолизина заключается в разрушении эритроцитов крови. Тетаногемолизин не только разрушает эритроциты, но и препятствует фагоцитозу, обладает кардиотоксическим и летальным действием.

Антигенная структура. Возбудитель столбняка обладает О- и Н-антигенами. Соматический О-антиген является термостабильным и определяет групповую специфичность. Жгутиковый Н-антиген термолабилен и обеспечивает типовую специфичность микроба. По структуре Н-антигена различают 10 сероваров возбудителя столбняка, обозначаемых цифрами I, II, III и т. д. В природе чаще всего обнаруживают серовары I и II.

Устойчивость. Вегетативные клетки возбудителя малоустойчивы к воздействию различных факторов внешней среды. Напротив, споры *Cl. tetani* устойчивы во внешней среде и могут сохраняться в почве, высохшем кале, на различных предметах в течение 10–11 лет. При кипячении погибают только через 40–50 мин, нагревание при 115 °С

в сухом состоянии разрушает их через 20 мин. Споры совершенно нечувствительны к низким температурам. Они довольно устойчивы по отношению ко многим дезинфектантам. Например, 5%-й раствор фенола инактивирует их через 8–10 ч, 1%-й раствор сулемы – через 10 ч, 1%-й раствор формалина – за 6 ч.

Патогенность. К столбняку восприимчивы все виды млекопитающих животных, в большей степени лошади, затем овцы, козы, крупный рогатый скот, свиньи. Реже болеют собаки, кошки и другие плотоядные. Птицы относительно устойчивы к болезни, а холодно-кровные вообще не чувствительны к возбудителю столбняка (лягушки, змеи, черепахи, крокодилы). Столбняк является опасной болезнью и для человека.

Из лабораторных животных восприимчивы к столбнячной палочке белые мыши, морские свинки, кролики. Инкубационный период у белых мышей продолжается до 36 ч, у морских свинок – до 48 ч, у кроликов – до 3–4 дней. Болезнь у них развивается по типу общего или восходящего (*tetanus ascendens*) столбняка. Особенно характерно клиническая картина проявляется у белых мышей. У них отмечается ригидность хвоста и инокулированной конечности. Конечность вытянута, ограничена в подвижности, туловище искривлено в сторону инокулированной лапки, постепенно процесс захватывает вторую половину тела, положенная на спину мышшь не может самостоятельно перевернуться. Погибающие животные принимают характерную позу с искривлением тела и вытянутыми лапками. Их гибель наступает в течение от 12 ч до 5 сут.

Патогенез. Возбудитель столбняка размножается в поврежденной, отмирающей ткани. Без раневой травмы бактерии не вызывают развития болезни. Инфекция возникает при уколах, разрезах, кастрации, патологических родах, после травм различного происхождения.

Проникнув в травмированные ткани, споры возбудителя прорастают, размножаются, и вегетативные клетки продуцируют экзотоксин. Бактерии редко покидают пределы травмированных тканей. Тетаноспазмин влияет на периферические нервы дистанционно, вызывая местные тонические сокращения мышц. Токсин по кровеносным сосудам или нервным путям может проникать в спинной и продолговатый мозг и адсорбироваться на окончаниях двигательных нейронов. Под влиянием токсина в нервных синапсах высвобождается ацетилхолин, раздражающий нервные клетки, что вызывает повышенную рефлекторную возбудимость. По этой причине тонические судороги

возникают на любое раздражение: свет, стук, шорох и т. д. Животные погибают от асфиксии или паралича сердца.

Лабораторная диагностика. Она проводится в двух направлениях — обнаружение токсина и выделение культуры возбудителя с последующей проверкой ее токсичности.

В лабораторию для исследования посылают раневой секрет, кусочки тканей из глубоких слоев раневых поражений, инородные тела, обнаруживаемые в поврежденных тканях, перевязочный материал, в котором могут быть клостридии, при абортах — выделения из половых путей, абортированный плод полностью. В случае генерализации инфекции и гибели животного исследуют кусочки печени, селезенки, кровь.

Исследуемый материал растирают со стерильным песком в стерильной ступке, заливают физиологическим раствором в двойном объеме и делят на две части. Одну часть используют для выделения возбудителя; вторую — оставляют при комнатной температуре на 1 ч для экстрагирования токсина, после чего ее фильтруют через ватно-марлевый или бумажный фильтр.

Фильтратом заражают подкожно в заднюю лапку 2–3 белых мышей массой 16–18 г в дозе 0,5–1 мл или двух морских свинок массой 300–350 г в дозе 3–5 мл.

При наличии в исследуемом материале столбнячного токсина через 48–96 ч у зараженных животных развиваются признаки заболевания, характеризующиеся тетаническими сокращениями мышц, вначале отдельных групп, затем всей мускулатуры. Животные погибают в характерной позе с вытянутыми лапками и искривлением позвоночника в сторону лапки, в которую вводили материал. Срок наблюдения за зараженными животными — до 10 дней.

При обнаружении в исследуемом материале столбнячного токсина дальнейшую работу по выделению культуры не проводят.

Микроскопическое исследование осуществляют при выделении чистой культуры, при этом препараты окрашивают по Граму или Муромцеву.

Бактериологический метод основан на посеве патологического материала на питательные среды и последующего изучения характера роста бактерий.

В случае исследования токсичности культуры возбудителя ее выдерживают при температуре 37–38 °С 6–10 дней для накопления токсина, фильтруют и фильтратом заражают двух белых мышей в дозе 0,3–0,5 мл.

Лабораторный диагноз считают установленным при обнаружении столбнячного токсина в исследуемом материале (без выделения культуры);

выделении из патологического материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя столбняка, продуцирующей токсин.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Принято считать, что иммунитет при столбняке в основном антитоксический. С целью создания активного иммунитета применяют концентрированный столбнячный анатоксин. Иммунитет наступает у животных через 30 дней после его введения. Обработку животных анатоксином проводят перед их массовой кастрацией.

Для пассивной иммунизации и лечения больных в качестве специфического средства используют антитоксическую сыворотку.

При лечении людей применяют специфические препараты — противостолбнячную сыворотку и иммуноглобулин, а также многочисленные антибиотики.

Глава 27 ВОЗБУДИТЕЛЬ НЕКРОБАКТЕРИОЗА

Некробактериоз — инфекционная болезнь многих видов домашних, сельскохозяйственных и диких животных, характеризующаяся гнойно-некротическими поражениями кожи, слизистых оболочек, внутренних органов, мышц, но чаще всего дистальных частей задних конечностей.

Болезнь известна давно (с середины XIX в.) и описывалась под названиями: копытная болезнь, парша губ, энзоотический стоматит ягнят и др.

Впервые возбудителя некробактериоза выделил Р. Кох в 1881 г., а более подробно изучил и описал Ф. Леффлер в 1882 г. Долгое время возбудителя болезни считали сопутствующим микроорганизмом при различных гнойно-некротических процессах. Этиологическую роль выделенных Р. Кохом бактерий как возбудителей некробактериоза окончательно доказал в 1932 г. А. Г. Ревнивых.

Возбудителя некробактериоза относят к домену *Bacteria*, типу *Fusobacteria*, классу *Fusobacteria*, порядку *Fusobacteriales*, семейству *Fusobacteriaceae*, роду *Fusobacterium*, виду *Fusobacterium necrophorum* (подразделяется на *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* и *Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme*).

Морфология. Возбудитель некробактериоза *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* – полиморфный микроорганизм, не образует спор и капсул, неподвижен, грамотрицателен. Хорошо красится функцином Циля, синью Леффлера, по методу Муромцева. При окраске обычными анилиновыми красителями окрашивается неравномерно, что характерно для него.

В препаратах из пораженных тканей имеет вид переплетающихся нитей, достигающих в длину 100–300 мкм, шириной – 0,7–1 мкм, окрашенных зернисто, что является характерным для возбудителя. При микроскопии препаратов из патологического материала у нитеобразных бактерий обнаруживают колбовидные утолщения, шаровидные вздутия, окрашивающиеся более интенсивно. Наряду с нитеобразными могут быть и бактерии в виде палочек длиной 0,7–4 мкм, шириной 0,3–0,5 мкм.

В препаратах, приготовленных из хронических очагов поражения и старых культур, наблюдают палочковидные бактерии, зернисто окрашенные, часто по концам более интенсивно, а также встречаются кокковидные формы.

Культуральные свойства. Возбудитель некробактериоза – строгий анаэроб. Для культивирования бактерий используют среду Китта–Тароцци, бульон Мартена, сывороточный агар, глюкозо-кровоной агар и другие среды. Температурный оптимум культивирования – 37–38 °С, оптимальное значение рН сред 7,4–7,8.

В среде Китта–Тароцци с добавлением 10–20 % бычьей сыворотки или 0,2–0,5 % глюкозы рост в виде помутнения среды и выпадения хлопьевидного осадка на кусочках печени появляется через 24–48 ч. Спустя 5–8 сут среда просветляется, на дне пробирки образуется крошковатый осадок, легко разбивающийся при ее встряхивании.

При посеве в сывороточный агар столбиком на 2–3-е сут появляются чечевицеобразные колонии, от которых отходят волокнистые побеги.

На глюкозо-кровоном агаре через 2–3 сут формируются круглые или продолговатые колонии диаметром 1–2 мм, окруженные зоной альфа- или бета-гемолиза.

Возбудитель болезни хорошо растет на мозговой среде с добавлением 0,05 % железа сульфата, среда при этом чернеет вследствие образования сероводорода.

Биохимические свойства. Возбудители некробактериоза ферментируют с образованием кислоты и газа арабинозу, глюкозу, галактозу, левулезу, мальтозу, сахарозу, салицин. Слабо ферментируют лактозу. Бактерии образуют индол, сероводород, непостоянно свертывают молоко и не разжижают желатин. Аммиак не вырабатывает. Не восстанавливает нитраты в нитриты.

Антигенная структура. Антигенный состав изучен недостаточно. По O-антигену различают четыре серотипа: А, АВ, В, С. Наиболее часто инфекционную патологию у животных вызывают бактерии, относящиеся к серотипам А и АВ.

Устойчивость. Возбудитель некробактериоза относительно нестойкий микроорганизм, но длительное время может сохраняться в объектах внешней среды. Он не теряет своей жизнеспособности до 60 дней в зимнее время и до 30 дней летом. Бактерии сохраняются в навозе 30–60 дней, в воде – 10–15 сут. Под воздействием солнечных лучей возбудитель погибает в течение 8–12 ч. Фузобактерии некробактериоза неустойчивы к дезинфицирующим веществам. Например, под действием 70%-го спирта погибают за 10 мин, 1%-го раствора фенола – 5–10 мин, 1%-го раствора натрия гидроксида – за 20 мин.

Патогенность. Некробактериозом болеют все виды домашних, сельскохозяйственных и многие виды диких животных, птица, а также человек. Наиболее восприимчивы к болезни олени, мелкий и крупный рогатый скот, а из лабораторных животных – белые мыши и кролики. Факторами патогенности являются экзо- и эндотоксины, лейкоцидин, некротоксин, гемолизин, цитоплазматический токсин и ферменты – лецитиназа, гиалуронидаза и др.

Источник инфекции – большие животные. Заражение происходит с кормом и водой при повреждении слизистых оболочек и целостности кожи. Фузобактерии некроза постоянно обнаруживают в желудочно-кишечном тракте животных и насекомых, где они могут размножаться.

Признаки болезни разнообразны и зависят от вида животных, возраста, локализации процесса и степени патогенности возбудителя. Самая распространенная форма у всех видов животных – гнойно-некротическое поражение кожи и подлежащих тканей.

Различают три основные формы болезни:

1) некробактериоз конечностей (крупный и мелкий рогатый скот, олени, лошади) – копытка оленей и овец, абсцессы копыт, инфекционный пододерматит крупного рогатого скота, гангренозный дерматит лошадей, остеомиелит;

2) некробактериоз кожи и слизистых оболочек (свиньи, ягнята, телята, кролики) – дифтерия телят, некротический ринит и стоматит свиней, некротический дерматит, парша губ;

3) некробактериоз внутренних органов (крупный и мелкий рогатый скот) – абсцессы печени у крупного рогатого скота и овец, гнойно-некротическая пневмония, плеврит, родовой сепсис.

Патогенез. Проникнув через ссадины, раны кожи или слизистых оболочек, возбудитель размножается, вызывает воспаление, образование гнойно-некротических очагов, некроз тканей. Бактерии из места проникновения могут с током крови распространяться по всему организму, образуя в органах и тканях вторичные гнойно-некротические очаги. Патологический процесс может осложняться гноеродной микробиотой, и болезнь принимает злокачественный характер, вызывая гибель животного.

Лабораторная диагностика. Некробактериоз диагностируют на основании клинических, эпизоотологических, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований. При дифференциальной диагностике у крупного рогатого скота необходимо исключить ящур, вирусную диарею, везикулярный стоматит, блютанг (катаральную лихорадку овец), злокачественную катаральную горячку, чуму, контагиозную плевропневмонию, дерматофилез. У мелкого рогатого скота некробактериоз прежде всего следует дифференцировать от копытной гнили, а также от ящура, оспы, контагиозной эктимы овец, стрептококкового полиартрита ягнят.

Кроме того, необходимо иметь в виду также артриты различной этиологии, ламиниты, эрозии, язвы копыт, межпальцевую гиперплазию, веррукозный дерматит, вольфартиоз, стоматиты, дерматиты, травматические повреждения копыт и пр.

Лабораторная диагностика включает:

микроскопию препаратов мазков и отпечатков из пораженных тканей на предмет обнаружения возбудителя;

бактериологическое исследование с целью выделения культуры возбудителя и его идентификации;

биопробу — заражение патологическим материалом или выделенной культурой лабораторных животных (мышей, кроликов).

Материалом для исследования служат трупы мелких животных, от павших крупных животных — пораженные ткани и части паренхиматозных органов с некротическими очагами. Для прижизненного исследования в лабораторию направляют соскобы, взятые на границе здоровой и пораженной тканей. При поражении ротовой полости исследуют слюну больного животного.

Из некротизированных тканей делают мазки и окрашивают по Муромцеву, Романовскому—Гимзе или синькой Леффлера, а также по Граму. В мазках из патологического материала, взятого на границе здоровой и некротизированной тканей, возбудитель имеет вид граммотрицательных, а при окраске специальными методами — зернисто окрашенных нитей различной длины, в старых очагах — коротких палочек и даже кокков.

Патологический материал высевают на среду Китта—Тароцци, МПА и в МПА. Кроме того, можно использовать сывороточно-глюкозный агар (чашки с агаром помещают в анаэробные условия, которые создают одним из общепринятых методов). Посевы инкубируют при 37—38 °С до 5 сут, просматривая ежедневно.

На среде Китта—Тароцци *F. necrophorum* через 13—24 ч образует интенсивную муть вначале в нижних слоях среды, а затем и в верхних, газообразование очень слабое. Просветление бульона наступает на 5—8-е сут, при этом на дно пробирки выпадает крошковатый осадок.

При микроскопии мазков из культуры обнаруживают зернисто окрашенные, длинные, переплетающиеся нити, местами в них могут быть колбовидные расширения.

На чашках с сывороточно-глюкозным агаром в строго анаэробных условиях через 48—72 ч появляются мелкие росинчатые колонии, в дальнейшем колонии увеличиваются в размерах и принимают более очерченную круглую или продолговатую форму с зоной гемолиза.

В связи с тем что получение чистой культуры *F. necrophorum* из первичного материала на плотных средах затруднительно, выделение ее целесообразно проводить биологическим методом.

Из присланного в лабораторию материала готовят суспензию на физиологическом растворе из расчета 1:10, которую используют для посева на питательные среды и заражения лабораторных животных. Полученную суспензию в дозе 0,5—1 мл вводят под кожу средней

грести наружной поверхности уха кролика. Для заражения можно использовать суточную бульонную культуру возбудителя в тех же дозах. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 10 сут. Для биопробы можно применять суточную бульонную культуру возбудителя, которую вводят лабораторным животным в тех же дозах, что и суспензию.

При наличии в патологическом материале или исследуемой культуре *F. necrophorum* у кролика на месте инъекции через 3–4 дня развивается некроз. Из очага некроза делают мазки и окрашивают. При обнаружении в мазках зернисто окрашенных нитей, характерных для возбудителя некробактериоза, биопроба считается положительной.

Лабораторный диагноз на некробактериоз считают окончательно установленным при:

выделении из исходного материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя данной болезни и развития некротического очага у кролика на месте ее введения с последующим обнаружением в мазках из этого очага типичных микроорганизмов;

развитии у зараженного кролика некротического очага на месте введения исходного материала и обнаружения в мазках из него типичных микробов, даже при отсутствии роста возбудителя в посевах из исходного материала.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Переболевшие некробактериозом животные не приобретают стойкого иммунитета. Для специфической профилактики болезни применяют инактивированные вакцины:

поливалентную — против некробактериоза животных;

ассоциированную «Некровак» — против некробактериоза конечностей крупного рогатого скота;

эмульгированную ВИЭВ.

Для пассивной профилактики болезни и лечения больных животных используют гипериммунную сыворотку, которую получают из крови волов или молозива коров, гипериммунизированных антигенами возбудителя некробактериоза.

Бруцеллез — инфекционная хроническая болезнь животных разных видов, вызываемая бруцеллами. Основным признаком клинического проявления бруцеллеза у животных является аборт. Помимо абортов бруцеллез у животных сопровождается орхитами, бур-ситами, эндометритами, маститами. Он может протекать без клинического проявления и диагностируется лабораторными методами (рис. 28.1, 28.2).



Рис. 28.1. Бурсит у быка



Рис. 28.2. Орхит у хряка

Возбудитель бруцеллеза был открыт в 1886 г. Д. Брюсом на острове Мальта и выделен из селезенки солдата, умершего от «мальтийской лихорадки». В 1887 г. Д. Брюс выделил чистую культуру возбудителя и назвал его *Micrococcus melitensis*. Возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота открыт датскими учеными Б. Бангом и В. Стрибольтом в 1897 г. Возбудитель бруцеллеза свиней открыт в Америке Дж. Траумом в 1914 г. Т. Заммит в 1904 г. установил бруцеллез у коз, а в 1906 г. — у овец. По предложению бактериологов в 1920 г. в честь Д. Брюса возбудители были объединены в одну группу и названы бруцеллами.

Таксономия бруцелл подвергалась нескольким пересмотрам с момента их открытия, главной целью которых являлась систематизация этих бактерий. С момента открытия бруцелл в конце XIX в. их классифицировали по виду животных, которых они поражали. После того как была установлена способность бруцелл инфицировать большой круг хозяев, бактерии стали классифицировать по их фенотипическим особенностям (рост в присутствии красителей, антибиотикорезистентность, чувствительность к бактериофагам и др.). Современный этап определения таксономии бруцелл основан на установлении их генетических особенностей. Молекулярный анализ генома бруцелл различных видов показал высокую гомологичность генома, превышающую 95 %, в результате чего современная таксономия относит бруцелл к одному виду, представленному *Brucella melitensis* и объединяющему все ранее известные виды и бивары.

Согласно Справочнику Берджи (2004) возбудителей бруцеллеза относят к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Alphaproteobacteria*, порядку *Rhizobiales*, семейству *Brucellaceae*, роду *Brucella*, виду *Brucella melitensis* (имеет гетеротипические синонимы, т. е. синоним обозначения видов с не до конца установленным таксономическим положением, — *Brucella abortus*, *Brucella ovis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae*).

Тем не менее в литературе, в том числе современной, часто употребляется поливидовая таксономия бруцелл. На сентябрь 2015 г. подкомитетом по таксономии бруцелл в Международном комитете по систематике прокариотов (г. Памплона, Испания) выделено 11 видов бруцелл: *Br. abortus*, *Br. canis*, *Br. melitensis*, *Br. neotomae*, *Br. ovis*, *Br. suis*, *Br. ceti*, *Br. inopinata*, *Br. microti*, *Br. papionis*, *Br. pinnipedialis*.

Морфология. Бруцеллы отличаются выраженным полиморфизмом, особенно в молодых культурах. Это мелкие с закругленными концами палочки, часто коккобактерии длиной 0,3–2,5 мкм, шириной 0,3–0,8 мкм, в препаратах в поле зрения микроскопа располагаются одиночно, парами, группами, беспорядочно (рис. 28.3). Бактерии грамтрицателены, спор не образуют, неподвижны. Отдельные штаммы (мукоидные и гладкие) формируют нежную капсулу, хорошо окрашивающуюся анилиновыми красками. При окраске специальными методами (по Козловскому, Шуляку–Шину, Стемпу) бруцеллы окрашиваются в красный цвет, а фон препарата и другие микроорганизмы имеют зеленый или синий цвет, что зависит от цвета дополнительного красителя. Это объясняется тем, что бруцеллы в смешанных культурах

при непродолжительном воздействии красок адсорбируют их несколько позднее, чем другие бактерии (феномен «запаздывания»).



Рис. 28.3. *Br. abortus*

Культуральные свойства. Бруцеллы могут расти на обычных питательных средах при температуре 36–37 °С, рН сред 6,8–7,2. В лабораторной практике для их культивирования используют специальные среды: МППГГА – мясопептонный печеночный глюкозо-глицериновый агар (1 % глюкозы + 2–3 % глицерина), ПГГА – печеночно-глюкозо-глицериновый агар (1 % глюкозы + 2–3 % глицерина), МППБ – мясопептонный печеночный бульон, ПГГБ – печеночно-глюкозо-глицериновый бульон (1 % глюкозы + 2–3 % глицерина), сывороточно-декстрозный агар. Для исследования на *Br. ovis* готовят сывороточно-глицериново-декстрозный агар.

С учетом того что в патологическом материале часто присутствует посторонняя микрофлора, посев лучше проводить на плотные среды, содержащие генцианвиолет или кристаллвиолет в концентрации 1:200 000. Эти красители действуют бактерицидно на многие виды бактерий, кроме бруцелл.

Бруцеллы – строгие аэробы. *Br. abortus* и *Br. ovis* для получения первой генерации требуют содержания CO₂ до 10 %, поэтому на практике чашки помещают в эксикатор, на дне которого сжигают вагу, смоченную спиртом.

Для получения культуры первой генерации посевы выдерживают в термостате 14–30 дней. Чтобы ускорить рост бруцелл, рекомендуют засеивать патологический материал в желток куриных яиц. Через 5 сут производят пересев из желтков на печеночные среды. Затем при последующих пересевах культура разводится через 5–10 сут

При посеве в жидкие среды бруцеллы вызывают их помутнение, появляется осадок и пристеночное кольцо, которое возвышается над уровнем бульона и имеет голубоватый оттенок.

На поверхности плотных питательных сред вирулентные штаммы (S-форма) образуют мелкие, блестящие выпуклые колонии с ровными краями и гладкой поверхностью, с голубоватым оттенком, особенно заметным в отраженном свете. При дальнейшем культивировании колонии приобретают более темный цвет, что связано с появлением пигмента.

Авирулентные варианты (R-форма) на агаре образуют шероховатые колонии большего размера, плоские; в бульоне — неравномерное помутнение с просветлением и крошковатым осадком.

На кровяном агаре бруцеллы гемолиза не дают, пигмента не образуют.

Биохимические свойства. Бруцеллы слабоактивны в биохимическом отношении. Могут продуцировать каталазу, пероксидазу, липазу, фосфатазу. Не изменяют молоко и МПЖ, не ферментируют углеводы. Редуцируют нитраты, не образуют индола. При росте в МПБ *Br. abortus* и *Br. suis* образуют H_2S .

Антигенная структура. Бруцеллы имеют общий O-соматический родоспецифический антиген, поэтому их разные виды дают перекрестную агглютинацию. У данного антигена, основу которого составляет сложный глицидо-липидно-полипептидный комплекс, различают два главных компонента: антигены А (преобладает у *Br. abortus*) и М (преобладает у *Br. melitensis*), имеющиеся в различных количественных соотношениях у разных видов бруцелл. Такая антигенная структура свойственна бруцеллам в S-форме, а при диссоциации культуры антигенный спектр изменяется.

Бруцеллы имеют поверхностный L-антиген (сходен с Vi-антигенами сальмонелл).

Многие антигенные фракции бруцелл обладают выраженным алергизирующим действием.

Бруцеллы имеют перекрестно реагирующие антигены с *E. coli*, *V. cholerae*, *Fr. tularensis*, *Bor. bronchiseptica*, *Y. enterocolitica* серотипа O9, *A. typhimurium*.

Устойчивость. Бруцеллы малоустойчивы к действию различных физических и химических факторов. При температуре 60 °С они погибают через 30 мин, при 80–85 °С — через 5 мин, при 100 °С — мгновенно. Обладают большой устойчивостью к воздействиям низких темпе-

ратур, при -20°C сохраняются в течение 30–50 сут. Солнечный свет убивает бруцеллы в зависимости от интенсивности инсоляции через различные сроки: от нескольких минут до часа. Бруцеллы быстро погибают в гниющем материале. Возбудители бруцеллеза сохраняются в воде до 5 мес.; в почве летом – 20–100 дней, зимой – 4–5 мес.; в навозе – около 1 месяца; в шерсти – 3–4 мес. В пробирках на агаре могут быть жизнеспособными до 3 мес., лиофильно высушенные культуры не теряют жизнеспособности в течение нескольких лет. В молоке бактерии сохраняются 6–8 дней, в масле – 40–60 дней, в замороженном мясе – до года. Обычные дезрастворы: 1%-й креолина, 2%-й фенола, 0,5%-й лизола, 1–2 % формалина и др. – губят бруцелл в течение нескольких минут.

Патогенность. К бруцеллам чувствительны до 60 видов млекопитающих: крупный рогатый скот, свиньи, козы, овцы, буйволы, лошади, собаки, кошки и др. Молодняк до половой зрелости более устойчив. Из лабораторных животных восприимчивы морские свинки, затем мыши.

Каждый вид бруцелл поражает животных определенного вида: *Br. abortus* (крупного рогатого скота), *Br. canis* (собак), *Br. ceti* и *Br. pinnipedialis* (морских млекопитающих), *Br. melitensis* (овец и коз), *Br. microti* (обычных полевок), *Br. neotomae* (бруцеллеза крыс), *Br. ovis* (инфекционного эпидидимита баранов), *Br. papionis* (бабуинов), *Br. suis* (свиней). Однако бруцеллы могут мигрировать, заражая животных других видов, например *Br. melitensis* – крупный рогатый скот, свиней и лошадей, *Br. abortus* – коз, овец, лошадей и свиней, *Br. suis* – крупный и мелкий рогатый скот, лошадей.

Бруцеллезом болеет и человек, у которого болезнь характеризуется длительным течением, лихорадкой, поражением опорно-двигательного аппарата, мочеполовой, сердечно-сосудистой, нервной и других систем. У людей чаще всего возбудителями бруцеллеза являются *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis*, реже *Br. canis* и *Br. inopinata*.

Факторами патогенности у бруцелл являются эндотоксин, гиалуронидаза, каталаза, уреазы и другие ферменты, низкомолекулярные продукты, способствующие подавлению фагоцитоза и окислительного взрыва в макрофагах, наличие алергизирующих субстанций. Бруцеллы обладают высокой инвазивностью, т. е. могут проникать в организм через неповрежденные слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, легких, глаз, реже через кожу. Больные животные выделяют микробов с молоком, абортированным плодом, околоплодной жидкостью, влагалищной слизью, мочой, калом.

Патогенез. Возбудитель бруцеллеза может проникать в организм разными путями: через респираторный тракт, через желудочно-кишечный тракт, при половом контакте и даже через неповрежденную кожу. Установлено, что бруцеллы продуцируют ферменты гиалуронидазу и нейраминидазу, которые разрушают мукополисахаридный остов эпителиальных клеток и помогают им проникать через барьеры кожных и слизистых оболочек.

Пройдя через эпителиальный барьер, возбудитель проникает в кровь или лимфу и затем попадает в близлежащие лимфоузлы. В первые же часы после проникновения в организм возбудитель подвергается фагоцитированию макрофагами и нейтрофилами. Бруцеллы способны не только противостоять бактерицидным системам фагоцитов, но и длительно выживать внутри фагоцита, что в конечном итоге приводит его к разрушению.

При фагоцитозе микробной клетки бруцелл на нее воздействуют активные формы кислорода и водорода пероксид. Однако бруцеллы легко выдерживают этот «натиск», поскольку их клетки содержат большое количество фермента каталазы, которая нейтрализует водорода пероксид, поэтому в фагосому оказывается заключена не убитая, а живая клетка бруцелл. В дальнейшем возбудитель секретирует некое вещество (макрофаготоксин), которое, воздействуя на регуляторные системы фагоцита, увеличивает в нем содержание циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и снижает уровень циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). Таким образом, резко (в 8–10 раз) увеличивается индекс цАМФ/цГМФ в макрофаге, что через каскад сложных реакций приводит к снижению подвижности лизосом. В результате этого процессы сближения лизосом и фагосомы, а также их слияния резко подавляются. «Токсическая триада» (миelopероксидаза-НгОа-галоген), которая губительна для бруцелл, в этом случае не образуется.

Таким образом, возбудитель остается жизнеспособным внутри фагоцита и, паразитируя, нарушает метаболизм этой клетки. В итоге фагоцит погибает и лизируется. Вышедший во внеклеточное пространство возбудитель фагоцитируется новыми клетками, и процесс начинается снова.

Вместе с поглотившими их клетками бруцеллы разносятся во все паренхиматозные органы (печень, селезенку, костный мозг и др.) и лимфоузлы. Однако наибольший тропизм возбудитель имеет к половым органам (семенникам, придаткам семенника, тканям матки, особенно в состоянии беременности). Доказано, что плодные оболочки

содержат эритроид, способствующий росту и размножению бруцелл. Этим и объясняют высокую восприимчивость к бруцеллам беременных животных.

Развиваются множественные воспалительные явления, которые носят хронический характер с периодическими обострениями (ремитирующий тип). Немалую роль в развитии патологии на тканевом уровне играют и реакции ГЗТ. Длительное течение болезни сопровождается серозно-продуктивным воспалением паренхиматозных органов, что приводит к атрофии паренхимы, склерозу стромы и множественным фиброзным отложениям.

В патогенезе бруцеллеза могут определенное значение иметь L-формы бруцелл. Они длительное время персистируют в организме.

Лабораторная диагностика. Бруцеллез диагностируют бактериологическим, биологическим, серологическим и молекулярно-генетическим методами исследования.

Материалом для бактериологического исследования служат абортированный плод или его оболочки, желудок с содержимым, печень, селезенка, околоплодная жидкость, плодовые оболочки, молоко, содержаемое гигром, абсцессы, от убитых животных: лимфоузлы, паховые, надвымянные, подчелюстные, заглоточные, кусочки паренхиматозных органов, матка, яичники, вымя, от баранов — семенники с придатками; для серологического исследования — кровь, сыворотка крови, молоко. Для исследования в ПЦР используют тот же патологический материал, что и для бактериологической диагностики.

Бактериологическое исследование предусматривает микроскопию исходного материала и выделенных культур, выделение культур бруцелл, постановку биологической пробы, серологическую идентификацию выделенных культур.

Из органов и тканей готовят мазки-препараты, окрашивают по Граму, Козловскому или Стампу, Шуляку—Шину. При окраске по Граму бактерии грамотрицательны; по Козловскому бруцеллы ярко-красные, другая микрофлора и фон препарата окрашены в зеленый цвет; по Стампу бруцеллы красные, другая микрофлора и фон препарата — синие; по Шуляку—Шину бруцеллы ярко-красные, другая микрофлора и фон препарата окрашены в сине-голубой цвет.

Посевы производят на питательные среды, в которые добавлен генцианвиолет 1:200 000 или кристаллвиолет 1:100 000. Одну часть посевов инкубируют в атмосфере, содержащей 10—15 % CO₂. Культуры с типичными свойствами исследуют в реакции агглютинации.

Культуры бактерий, обладающие типичными морфологическими, тинкториальными и культуральными свойствами, дающие положительную реакцию агглютинации с позитивной сывороткой, относят к бруцеллам.

Биопробу ставят на морских свинках, которых предварительно проверяют в реакции агглютинации на наличие противобруцеллезных антител. При отрицательном результате их заражают подкожно суспензией патматериала с внутренней стороны бедра в дозе 1 мл. Сыворотку крови морских свинок исследуют в реакции агглютинации с бруцеллезным антигеном на 15-, 20- и 40-й день. Результат считают положительным, если сыворотка реагирует в реакции агглютинации в титре 1:10 и выше. При отрицательной реакции агглютинации морских свинок выдерживают 6–8 нед., затем убивают и подвергают бактериологическому исследованию. Посевы делают из лимфоузлов, печени, селезенки, костного мозга.

Для лабораторной диагностики бруцеллеза наиболее широко применяется серологический метод, включающий исследование сывороток крови животных в реакции агглютинации, РСК, РДСК, РБП (роз-бенгал проба), реакции иммунодиффузии с О-полисахаридным антигеном (РИД), ИФА с сывороткой крови или молоком. Молоко исследуется также в кольцевой реакции агглютинации (КРА). Использование серологического метода позволяет получить результат в сравнительно короткий срок (4 сут).

В целях своевременного выявления бруцеллеза в организациях и населенных пунктах в плановом порядке обязательному исследованию подвергают:

крупный рогатый скот с двенадцатимесячного возраста двукратно с интервалом не менее 3 мес. и не более 12 мес.;

быков, овец и коз с шестимесячного возраста двукратно с интервалом не менее 3 мес. и не более 12 мес., а также быков при поступлении для убоя.

Лошадей исследуют на бруцеллез в хозяйствах, неблагополучных по данной болезни, при выявлении признаков, дающих основание подозревать у них бруцеллез (бурситы и др.), а также перед снятием ограничений с ферм, оздоровленных от бруцеллеза крупного рогатого скота, овец (коз), свиней и других видов животных. Положительно реагирующих на бруцеллез лошадей подвергают убою.

Ветеринарные специалисты организации, занимающейся звероводством, осуществляют контроль абортированных плодов на бруцеллез путем бактериологических исследований.

Согласно санитарным и ветеринарно-санитарным правилам «Состояние здоровья населения в связи с влиянием микробиологического фактора среды обитания человека. Бруцеллез», утвержденным Министерством здравоохранения и Министерством сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 26 марта 2010 г. № 32/20, при условии, что 99,8 % стад рогатого скота в Республике Беларусь имеют статус официально признанных свободными от бруцеллеза и сохраняют этот статус на протяжении не менее четырех лет, исследование на бруцеллез животных проводят один раз в 2 года серологическим методом.

Реакцию агглютинации ставят в объеме 1 мл с единым бруцеллезным антигеном для реакции агглютинации, РСК и РДСК. Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сывороткой крови крупного рогатого скота (буйволов, яков, зебу), верблюдов и лошадей, не иммунизированных или иммунизированных неагглютиногенными противобруцеллезными вакцинами, содержащей 200 МЕ антител и выше; овец и коз — 100 МЕ и выше; оленей (маралов) и собак — 50 МЕ и выше; пушных зверей и морских свинок — 10 МЕ и выше.

При выявлении среди неиммунизированных противобруцеллезными вакцинами, а также иммунизированных неагглютиногенными вакцинами крупного рогатого скота, верблюдов и лошадей, животных, реагирующих только в реакции агглютинации с содержанием антител 50–100 МЕ, а среди овец, коз, оленей (маралов), собак — 25 МЕ, считают сомнительно реагирующими и исследуют повторно через 15–30 сут. При повышении титров болезнь считают установленной. При сохранении титров на прежнем уровне проводят дополнительные исследования по дифференциации согласно утвержденным методам.

При выявлении в стадах крупного рогатого скота, ранее иммунизированного против бруцеллеза агглютиногенными вакцинами, животных, реагирующих только в РА с содержанием не выше 200 МЕ антител и РСК в разведении сыворотки крови не выше 1:10, их повторно исследуют через 15–30 сут в реакции агглютинации, РСК и РИД. При повышении содержания антител в исследуемых сыворотках в реакции агглютинации и (или) РСК или положительной РИД болезнь считают установленной.

При выявлении в неблагополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота, ранее не иммунизированных или иммунизированных противобруцеллезными вакцинами, животных, положительно реагирующих в РА с содержанием 100 МЕ антител и выше, признают больными.

Реакцию считают сомнительной при содержании 50 МЕ антител. Сыворотки крови от таких животных через 15–30 сут исследуют повторно. При получении вновь сомнительного результата животных признают больными бруцеллезом.

При исследовании в реакции агглютинации неиммунизированных баранов-производителей, козлов, пробников и ярок, содержащихся в благополучных по бруцеллезу отарах, где овцы (козы) иммунизируются против бруцеллеза, реакцию считают положительной, а болезнь установленной при содержании в сыворотке крови животных 100 МЕ антител и выше. Реакцию считают сомнительной при наличии 50 МЕ антител. Сыворотки крови от таких животных через 15–30 сут исследуют повторно. При получении вновь сомнительных результатов животных признают здоровыми, а отару – благополучной по бруцеллезу.

Пластинчатую реакцию агглютинации с бруцеллезным роз-бенгал антигеном (РБП) применяют как экспресс-метод диагностики бруцеллеза у не иммунизированного противобруцеллезными вакцинами крупного рогатого скота, овец, коз, верблюдов, лошадей и северных оленей (маралов). Реакцию считают положительной при наличии выраженной агглютинации окрашенных бруцелл антигена в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета, выделяющихся на белом фоне лунки. Реакцию считают отрицательной при отсутствии агглютинации (смесь гомогенна, равномерно окрашена). При нечетко выраженной агглютинации проводят повторное исследование данной сыворотки и по его результатам дают окончательную оценку реакции (положительная или отрицательная).

В благополучных по бруцеллезу хозяйствах все сыворотки крови от животных, с которыми получена положительная РБП, в тот же или на другой день исследуют в реакции агглютинации и РСК (РДСК) или реакции агглютинации и РИД. Если при исследовании в данных реакциях будут получены отрицательные результаты, то у всех животных, давших положительную РБП, через 15–30 сут вновь берут кровь и исследуют на бруцеллез повторно. При получении отрицательных результатов животных признают здоровыми и исследование на бруцеллез прекращают.

В случае получения положительных или сомнительных результатов их оценку проводят в соответствии с действующими санитарными и ветеринарными правилами.

В неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах при получении положительных результатов исследования в РБП сывороток крови овец,

коз и северных оленей (маралов) животных признают больными бруцеллезом; сыворотки крови крупного рогатого скота, верблюдов и лошадей в тот же или на следующий день проверяют в реакции агглютинации и РСК (РДСК) или реакции агглютинации и РИД. Животных, давших положительные результаты, признают больными бруцеллезом. При получении сомнительных результатов таких животных повторно исследуют через 15–30 сут. При получении положительных или сомнительных результатов в одной или двух реакциях их считают больными бруцеллезом.

Кольцевую реакцию с молоком применяют с целью определения благополучия стад (ферм) по бруцеллезу крупного рогатого скота (буйволов) и для проверки молока при продаже его на рынках. Исследование молока на бруцеллез с помощью кольцевой реакции разрешается проводить в лабораториях или непосредственно в хозяйствах только ветеринарным врачам ветеринарных лабораторий, а также лабораторий ветеринарно-санитарной экспертизы, прошедшим специальную подготовку по постановке и учету данной реакции.

Все пробы молока, давшие кольцевую реакцию с оценкой 3 и 2 креста, считают положительными, 1 крест – сомнительными. При получении отрицательных результатов кольцевой реакции по всему стаду его считают благополучным по бруцеллезу. При получении положительного или сомнительного результата кольцевой реакции берут кровь от всех животных данного стада (группы, населенного пункта) для исследования на бруцеллез в реакции агглютинации и РСК (РДСК) или реакции агглютинации и РИД, проводят эпизоотологическое обследование хозяйства, клинический осмотр животных и исследование на заболевание маститами. Отрицательный результат исследования сывороток крови в реакции агглютинации и РСК (РДСК) или реакции агглютинации и РИД у всех животных свидетельствует об их благополучии по бруцеллезу независимо от результатов, полученных в кольцевой реакции.

В случае получения положительных результатов исследования сыворотки крови на бруцеллез животных стада изолируют согласно действующим санитарным и ветеринарным правилам. Кроме того, изолируют животных, выделенных при исследовании молока в кольцевой реакции, если эта реакция не была связана с другими заболеваниями животных.

Для постановки РИД при бруцеллезе применяется сыворотка крови животных и тест-система, основой которой является О-ПС-анти-

гн. Данная реакция применяется при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота, овец и коз, северных оленей при:

плановых исследованиях животных одновременно с реакцией агглютинации в благополучных (где противобруцеллезные вакцины применяют и не применяют) и неблагополучных по данному заболеванию хозяйствах;

контроле эпизоотического состояния животных по данной болезни; дифференциации реакций, полученных в реакции агглютинации (не выше 200 МЕ) или (и) РСК (РДСК) не выше, чем в разведении 1:10 или сомнительно реагирующих в данных реакциях;

дифференциации неспецифических реакций, обусловленных родственной с бруцеллами микробиотой, в том числе и иерсиниями; снятии с неблагополучных хозяйств ограничений по бруцеллезу одновременно с реакцией агглютинации, РСК (РДСК) и другими реакциями, утвержденными в установленном порядке.

В случае получения положительной РИД животное признают больным бруцеллезом. О положительной реакции свидетельствуют сформировавшиеся линии преципитации между лунками с антигеном и исследуемой сывороткой через 24 ч. Сыворотки крови, давшие линию преципитации через 48 ч, подлежат перестановке. Линия преципитации, сформировавшаяся через 24 или 48 ч при перестановке, свидетельствует о положительной реакции.

Молекулярно-генетическое исследование проводят в случае аборта и при появлении у животных других клинических признаков, вызывающих подозрение на бруцеллез, а также при получении положительных и сомнительных результатов серологического исследования на бруцеллез животных, не иммунизированных противобруцеллезными вакцинами, из хозяйств, благополучных по данной болезни. При положительном результате, зарегистрированном при исследовании хотя бы одной пробы материала, животное считают больным бруцеллезом.

Аллергический метод диагностики осуществляют с помощью бруцеллина ВИЭВ. Аллерген вводят животным с соблюдением правил асептики подкожно несколько ниже края века со стороны наружного угла глаза (пальпебральная проба): овцам и козам — по 0,5 мл, а крупному рогатому скоту — 1 мл или внутрикочно в середину подхвостовой складки — по 0,2–0,3 мл (внутрикожная проба).

Свиньям бруцеллезный аллерген вводят с наружной стороны ушной раковины, ближе к основанию уха внутрикочно по 0,2 мл. Пра-

вильность внутрикожной инъекции препарата контролируют по образованию бугорка размером с горошину.

Аллергическую пробу у овец, коз и крупного рогатого скота учитывают один раз через 48 ч после введения аллергена. У свиней реакцию учитывают 2 раза — через 24 и 48 ч после введения аллергена.

Аллергическую пробу считают положительной, если на месте инъекции аллергена возникает воспалительный (плотный или тестоватый) отек, видимый при осмотре или определяемый при пальпации места введения препарата.

У здоровых и не вакцинированных против бруцеллеза животных при учете реакции на аллерген в указанные сроки на месте его введения никаких изменений не отмечается.

Диагноз на бруцеллез по результатам бактериологического исследования считают установленным при:

выделении культуры из патологического материала или от морской свинки (биопроба);

получении у зараженных морских свинок положительной реакции агглютинации в разведении сыворотки крови 1:10 и выше, даже если из исходного материала культура бруцелл не выделена.

Диагноз на бруцеллез по результатам серологического исследования считают установленным при:

получении положительных результатов серологических исследований у невакцинированных животных: крупного рогатого скота и лошадей — реакции агглютинации с наличием антител 200 МЕ/мл и выше, кроме того, при положительных результатах в РБП и РИД; овец и коз — при положительных результатах в РБП, реакции агглютинации 100 МЕ/мл и выше; собак — РБП, реакция агглютинации 50 МЕ/мл и выше; всех видов животных РСК в разведении сыворотки 1:5 и выше, с выделением культуры бруцелл из биоматериала или положительной биопробы;

выявлении среди не иммунизированного противобруцеллезными вакцинами крупного рогатого скота и лошадей, реагирующих только в реакции агглютинации с содержанием антител 50–100 МЕ/мл, а среди овец, коз — 25–50 МЕ/мл, их обследуют повторно через 15–30 дней. При повышении титров болезнь считается установленной. При сохранении реакций проводят дополнительные исследования по дифференциации их согласно утвержденным методам. При получении положительных результатов серологических исследований для окончательной постановки диагноза необходимо бактериологическое исследование;

при выявлении в стадах крупного рогатого скота, ранее подвергавшихся вакцинации против бруцеллеза, положительно реагирующих животных в РБП и реакции агглютинации не выше 200 МЕ/мл и РСК в разведении сыворотки крови не выше 1:10 проводят повторное исследование через 15–30 дней в РБП, реакции агглютинации, РСК и РИД. При повышении титров реакции агглютинации и(или) РСК или положительной РИД болезнь считается установленной при получении положительных результатов бактериологического исследования;

выделении в неблагополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота, ранее не вакцинированных против бруцеллеза животных, положительно реагирующих в РБП, реакции агглютинации в титре 100 МЕ и выше и(или) РСК (РДСК) в разведении 1:5 и выше, признают больными;

получении положительного результата бактериологического исследования абортплодов или положительной биопробы овец и коз, иммунизированных против бруцеллеза, а также при выявлении положительно реагирующих в РБП, реакции агглютинации с содержанием антител 100 МЕ/мл и выше, РСК в разведении сыворотки 1:5 и выше среди баранов-производителей, пробников и ярок;

получении положительной реакции в РБП, РСК и выделении культуры бруцелл из биоматериала или положительной биопробы у свиней их признают больными бруцеллезом;

положительном результате РИД, ИФА, ПЦР (оценку результатов обследования животных в РИД, ИФА и ПЦР проводят в соответствии с наставлениями по постановке и учету этих реакций).

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет при бруцеллезе формируется медленно и подразделяется на две фазы: первая – нестерильный иммунитет, вторая – стерильный. Во второй фазе может наступить освобождение организма от возбудителя и самовыздоровление. Иммунитет при бруцеллезе клеточный, обеспечивается Т-лимфоцитами. Роль антител в механизме защиты неэффективна. Для бруцеллеза характерно развитие ГЗТ.

Вакцины, применяемые для специфической профилактики бруцеллеза у животных, условно принято делить на две группы: агглютино- и неагглютиногенные.

Агглютиногенные вакцины (из штамма № 19 *Br. abortus*, из штамма № 82 *Br. abortus*, из штамма № 75/79-AB *Br. abortus*, из штамма Рев-1 *Br. melitensis* и др.) изготавливают из культур бруцелл, находящихся в S- или в SR- и RS-формах. В организме животных, привитых такими

вакцинами, синтезируются специфические антитела, гомологичные S-антигену, выявляемые стандартными бруцеллезными диагностическими препаратами в РА, РСК, РДСК, РБП, КР с молоком, РИД с О-ПС антигеном и др.

Неагглютиногенные вакцины представляют собой убитые культуры бруцелл в R-форме, эмульгированные в масляном или другом адъюванте (французская вакцина «Абортокс», отечественная — из штамма *Br. abortus* 17/100 и др.). Такие вакцины в организме иммунизированных здоровых животных не вызывают образования антител, выявляемых антигенами, изготовленными из бруцелл в S-форме (антиген бруцеллезный единый для реакции агглютинации, РСК и РДСК, антиген бруцеллезный для кольцевой реакции с молоком, антиген бруцеллезный для роз-бенгал пробы, О-ПС антиген для РИД, антиген бруцеллезный эритроцитарный для реакции непрямой гемагглютинации — РНГА и др.).

Специфических средств пассивной профилактики бруцеллеза и лечения животных не предложено.

Глава 29 МИКОБАКТЕРИИ

29.1. Общая характеристика микобактерий

Микобактерии — отдельная морфологическая группа микроорганизмов, характеризующаяся уникальным строением клеточной стенки с высоким содержанием липидов и липидоподобных веществ.

Клеточная стенка микобактерий отличается высоким содержанием восков и миколовой кислоты, придающих ей высокую гидрофобность. Кроме того, в ней присутствуют сложные полисахариды, гликолипиды и липогликаны. У некоторых микобактерий (например, *M. tuberculosis*) до 10 % их генома кодирует более 100 белков-ферментов, участвующих в липидном обмене, что отражает большое значение метаболизма липидоподобных веществ в биологии микобактерий.

Отдельные микобактерии способны использовать молекулы липидов и стеролов клеточного происхождения в качестве источника энергии путем β -окисления.

Уникальность строения клеточной стенки обеспечила относительно высокую устойчивость микобактерии к воздействию факторов внешней среды и защитных механизмов организма. В частности, по своей устойчивости микобактерии занимают лидирующее место в домене бактерий после спорообразующих бактерий. Компоненты клеточной стенки способны неспецифически подавлять активацию Т-лимфоцитов, что приводит к подавлению иммунного ответа животного. Кроме того, особое морфологическое строение микобактериальных клеток обеспечивает высокую пластичность в отношении способности к трансформации в L-формы.

Среди жироподобных веществ клеточной стенки большое значение имеет корд-фактор, представляющий собой молекулы ацилированной трегалозы. Корд-фактор не только определяет вирулентность микобактерий, но и обеспечивает способность к образованию в культуре скоплений бактерий в виде ветвящихся нитей наподобие грибно-го роста (отсюда название микобактерий, гр. *тyco* – гриб) (рис. 29.1).

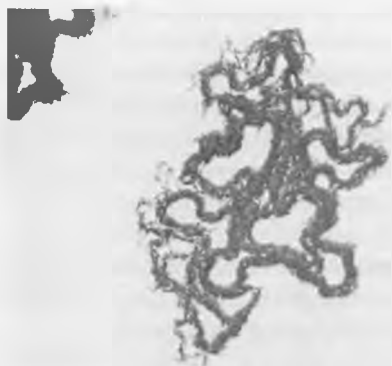


Рис. 29.1. Корд-фактор *Myc. tuberculosis*, окраска по Цилю–Нильсену

Микобактерии условно считаются грамположительными бактериями, хотя архитектура их клеточной стенки (так называемая микомембрана) сходна с таковой у грамотрицательных микроорганизмов. Вместе с тем высокая гидрофобность микомембраны не дает возможности их полноценной окраски водными красителями, особенно генцианвиолетом. В силу этого микобактерии плохо окрашиваются по

методике Грама. Для обнаружения микобактерий разработаны специальные методы окраски, основанные на обработке клеток повышенной температурой и определенными химическими веществами, поэтому микобактерии относятся к группе кислотостойчивых микроорганизмов.

Большинство описанных микобактерий, общее количество которых насчитывает около 130 видов, являются сапротрофными микроорганизмами почвы и воды. Из их общего пула только небольшое количество микобактерий характеризуются патогенностью для человека и животных. Патогенные микобактерии отличаются замедленным метаболизмом, в результате чего для них свойствен небыстрый рост за исключением *Mycobacterium abscessus* (возможный этиологический агент в развитии муковисцидоза). Большинство сапротрофных микобактерий имеют пигментообразование, биохимически тесно связанное с биосинтезом каротиноидов. Продуцируемые пигменты играют защитную роль сапротрофных микобактерий, поглощая свет и солнечные лучи внешней среды, губительные для остальных бактерий. В процессе эволюции патогенные микобактерии потеряли гены, контролирующие биосинтез пигментов, поэтому они отличаются и по этому важному культуральному свойству.

Патогенные микобактерии вызывают у людей и животных туберкулез, паратуберкулез, проказу (у человека). Эволюционно патогенные микобактерии тесно связаны с их сапротрофными видами и являются их эволюционными потомками. Например, возбудитель туберкулеза человека *Myc. tuberculosis* наиболее близко связан со свободноживущими микобактериями *Myc. marinum* и *Myc. smegmatis*, эволюционно происходящими от одного общего предка, обитавшего в водной среде. В ходе эволюции *Myc. tuberculosis* утратил значительную часть генов, в результате чего бактерия стала более чувствительной к условиям обитания и биохимически менее активной, однако получили более 600 новых генов, обеспечивших большую способность к метаболизму липидов. В результате такого эволюционного процесса некоторые микобактерии приобрели высокую патогенность, утратив возможность к сапротрофному существованию. Отдельные микобактерии в процессе эволюции сохранили гены, обеспечивающие их сапротрофность, приобретая часть дополнительных генов, придающих им способность к патогенному существованию. Такие микобактерии называются атипичными.

Микобактерии относят к домену *Bacteria*, типу *Actinobacteria*, классу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales*, семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium*, включающему 126 видов.

Среди всех видов микобактерий наиболее часто проявляют себя патогенные следующие:

Myc. tuberculosis — возбудитель болезни у человека;

Myc. bovis — возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота;

Myc. avium subsp. avium — возбудитель туберкулеза птиц;

Myc. leprae — возбудитель лепры человека;

Myc. avium subsp. paratuberculosis — возбудитель паратуберкулеза крупного рогатого скота и овец.

К роду *Mycobacterium* относятся многие виды потенциально-патогенных и непатогенных микобактерий, которые получили название атипичных. Чем же продиктован интерес к атипичным микобактериям? Во-первых, они изолируются не только от людей и животных, больных туберкулезом, но и в условно благополучных стадах от животных, вызывая их сенсибилизацию к туберкулинам. Во-вторых, отдельные атипичные микобактерии могут вызвать ряд хронических болезней, напоминающих туберкулез, которым присвоено название «микобактериозы». В-третьих, атипичные микобактерии очень сложно дифференцировать от истинных микобактерий туберкулеза. Э. Раньон (1959) предложил классификацию атипичных микобактерий, основанную на двух свойствах — образовании пигмента и скорости роста. Выделены четыре группы:

I — фотохромогенные микобактерии. Вырастают в темноте (в термостате) в течение 15–30 дней. Бесцветны, но после освещения дневным или электрическим светом становятся желтыми или желто-оранжевыми. Такой же пигмент культуры приобретают, если во время роста находились на свету. К ним относятся *Myc. kansasii* и *Myc. marinum*;

II — скотохромогенные микобактерии. Образуют ярко-оранжевый пигмент независимо от того, выращивались они на свету или в темноте, растут медленно — 15–30 дней. К ним относятся *Myc. gordonae*, *Myc. scrofulaceum*, *Myc. paraffinicum*;

III — нефотохромогенные микобактерии. Не образуют пигмента, имеют светло-кремовую или бледно-желтую окраску. К ним относятся *Myc. intracellulare*, *Myc. xenopi*, *Myc. terrae*, *Myc. gastri*, *Myc. triviale*;

IV — быстрорастущие микобактерии. Образуют пигментные или беспигментные колонии, чаще R-формы. Вырастают в течение 3–10 дней. К этой группе относятся *Myc. fortuitum*, *Myc. chelonae*, *Myc. phlei*, *Myc. diernhoferi*, *Myc. thamnophaeos*, *Myc. smegmatis*, *Myc. vaccae*, *Myc. flavescens*, *Myc. peregrinum*.

29.2. Возбудители туберкулеза животных

Туберкулез — хроническая болезнь сельскохозяйственных и диких животных, которая характеризуется образованием в легких, а иногда в других органах и тканях узелков — туберкулов, некротическим творожистым перерождением пораженных тканей, разрушением кровеносных сосудов, образованием полостей в легких под названием каверны (рис. 29.2). Туберкулез известен с древних времен. Клинические признаки болезни у человека были описаны Гиппократом в IV в. до н. э.

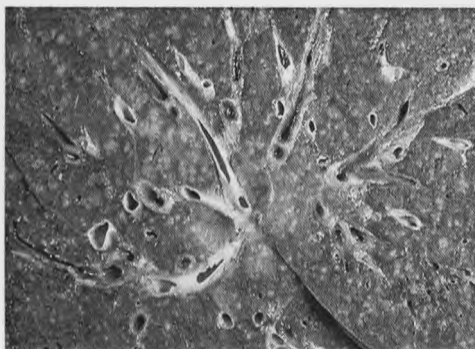


Рис. 29.2. Милиарный туберкулез в легких

Возбудителями туберкулеза животных, как уже говорилось, являются *Myc. bovis*, *Myc. avium subsp. avium*, *Myc. tuberculosis*.

Возбудителей туберкулеза человека и крупного рогатого скота открыл Р. Кох в 1882 г., он же в 1890 г. приготовил туберкулин. Птичий вид установили С. Штраусс и Н. Ф. Гамалея (1891).

Морфология. Микобактерии туберкулеза имеют форму тонких, прямых или слегка изогнутых палочек с закругленными краями длиной 0,8–5,5 мкм и шириной 0,2–0,6 мкм. Размеры непостоянны и зависят от вида бактерий (по сравнению с *Myc. tuberculosis*, *Myc. bovis* обычно более короткие и толстые), условий обитания, питательных сред, возраста культур и др. В тканях животных микобактерии более удлиненные, чем выращенные на питательных средах. В старых культурах нередко встречаются удлиненные формы и иногда с ветвлением. Расположены изолированно или образуют небольшие группы. Неподвижны, спор и капсул не образуют.

Микобактерии с трудом окрашиваются по Граму. Они способны окрашиваться люминесцентными красителями (аурамином и родами-

ном) и давать золотисто-желтый цвет под воздействием ультрафиолетового облучения.

Из-за высокого содержания липидов (30,6–38,9 %) микобактерии медленно воспринимают анилиновые красители и поэтому для их окраски применяют специальные методы: Циля–Нильсена (возбудители туберкулеза окрашиваются в красный цвет, другие элементы препарата – в синий цвет, если в качестве дополнительной краски использован метиленовый синий, и в зеленый, если малахитовая зелень) и др.

В микрокультурах, развивающихся на жидких питательных средах, микобактерии человеческого и бычьего видов образуют косы, жгуты, завитки, скопления, имеющие, как правило, ориентированный рост. Это явление агрегации определяется выработкой вещества, называемого корд-фактором, связано с целостностью липидных структур, расположенных на поверхности клетки и присуще только вирулентным микобактериям. Микобактерии птичьего вида и атипичные, за исключением *Myc. kansasii*, *Myc. chelonae*, не склонны образовывать строго ориентировочные колонии. Микрокультуры легко обнаруживаются при обычной микроскопии мазков, окрашенных методом Циля–Нильсена.

А. Фонтес в 1910 г. обнаружил фильтрующиеся формы микобактерий туберкулеза, являющиеся мельчайшими фрагментами микобактерий, образующимися в неблагоприятных условиях существования (например, при антибиотикотерапии).

Полиморфизм возбудителей туберкулеза проявляется в образовании различных морфов: фильтрующихся и ультрамелких, зернистых и кокковидных, нитевидных, а также L-форм бактерий, которые обладают низкой метаболической активностью и длительно персистируют в макроорганизме внутриклеточно в макрофагах. Они нечувствительны к противотуберкулезным препаратам. Реверсия этих дремлющих форм в вирулентные палочковидные формы ведет к возникновению рецидивов и обострению болезни.

Культуральные свойства. Растут палочки туберкулеза на специальных средах, содержащих в определенных соединениях углерод, азот, водород и кислород. Из минеральных веществ очень необходимыми являются железо, калий, магний, сера, фосфор. В 1887 г. Э. Нокар и П. Ру обнаружили у микобактерий глицерофильность. Глицерин оказался лучшим источником углерода. Для выращивания микобактерий используют плотные яичные среды: Левенштейна–Йенсена, Гельберга, ФАСТ-ЗЛ, Финн-2, Петраньяни.

Для посева на питательные среды патологический материал подвергают предварительной обработке, гомогенизируя и подвергая воздействию для уничтожения сопутствующей микрофлоры. Предварительная обработка должна быть щадящей для микобактерий туберкулеза. Кусочки органов и тканей, свежие или отмытые дистиллированной водой от консервирующей жидкости, обрабатывают одним из приведенных методов.

1. *Метод Гона–Левенштейна–Сумиоши.* Кусочки материала измельчают ножницами в ступке, тщательно растирают пестиком со стерильным песком или стеклом и заливают в зависимости от свежести материала растворами серной кислоты (концентрация 3–5 или 6 %) или раствором щавелевой кислоты (концентрация 5 или 10 %) в соотношении: на одну объемную часть материала четыре части кислоты. Пробу центрифугируют в течение 10–15 мин с частотой вращения 3000 мин^{-1} . Общая экспозиция контакта с кислотой не должна превышать 30 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок отмывают 2–3 раза изотоническим раствором натрия хлорида с помощью центрифугирования и используют для посевов, нанося и втирая его шпателем на поверхность яичной среды.

2. *Метод Аликаевой.* Ткани нарезают на кусочки размером $0,5 \text{ см}^3$, помещают в ступку, заливают раствором серной кислоты концентрацией 3–5 или 6 % и оставляют на 10–20 мин. Ступку накрывают стерильной пергаментной бумагой, кислоту сливают, материал промывают 2–3 раза в течение 5–10 мин изотоническим раствором натрия хлорида. После этого раствор удаляют и кусочки ткани тщательно растирают с незначительным объемом свежего изотонического раствора натрия хлорида (1–1,5 мл). Из полученной взвеси делают посевы и препараты-мазки, а к оставшейся доливают изотонический раствор натрия хлорида в количестве, необходимом для заражения животных (1 см^3 на одно животное).

3. *Метод флотации.* Материал растирают в ступке с изотоническим раствором натрия хлорида до консистенции сметаны. В узкогорлую колбу вместимостью 250 мл помещают 10 мл исследуемого материала, добавляют равное количество 1%-го раствора натрия гидроксида. Смесь тщательно встряхивают (не более 10 мин) в специальном аппарате или вручную до получения однородной консистенции. Затем гомогенизированный материал разбавляют в соотношении 1:9 дистиллированной водой и прибавляют 1–2 мл ксилола или авиационного бензина. Смесь вновь встряхивают в течение 5–10 мин, добав-

ляют дистиллированную воду (до горлышка колбы) и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Микобактерии туберкулеза концентрируются во флотационном растворе у горлышка колбы.

Необходимым условием выращивания является оптимальная температура: *Myc. tuberculosis* – 37–38 °С, *Myc. bovis* – 38–39 °С, *Myc. avium subsp. avium* – 39–41 °С.

Возбудителям туберкулеза присущ медленный обмен веществ, а следовательно, они характеризуются замедленным ростом культур на средах. Их рост проявляется через 7–30 дней и более. С учетом этого пробирки и колбы закрывают резиновыми пробками или ватно-марлевыми, чтобы среда не высыхала, но верхнюю часть пробки обрезают, нижнюю – вталкивают внутрь пробирки на 1–2 см и заливают парафином. Продолжительность роста при пересевах для *Myc. avium subsp. avium* составляет 10–12 сут, для *Myc. tuberculosis* – 20–30, для *Myc. bovis* – 20–60 сут.

На плотных средах микобактерии растут в виде колоний, которые могут быть гладкими (S-форма, рис. 29.3) или шероховатыми (R-форма), крошкоподобными мелкими либо крупными, блестящими или матовыми, в виде единичных обособленных или же сплошными скоплениями, в виде морщинистого налета белого, или белого с желтоватым оттенком, или же другого цвета (рис. 29.4).

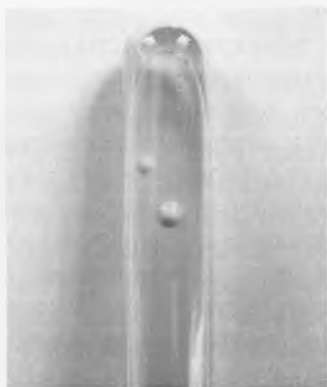


Рис. 29.3. Колонии *M. bovis* на среде Левенштейна–Йенсена



Рис. 29.4. Колонии *M. tuberculosis* на среде Левенштейна–Йенсена

Кроме плотных сред, применяют жидкую (Моделя, Сотона) или полужидкую (Школьниковой), глицериновый МПБ.

В жидких питательных средах наблюдается рост микобактерий в виде пленки, сначала нежной, затем по мере старения пленка становится толстой, морщинистой, поднимающейся на стенки сосуда, но среда остается прозрачной.

На практике для выделения микобактерий служат плотные среды, а поддерживают культуры на картофельной среде с глицерином.

Биохимические свойства. Микобактерии туберкулеза содержат различные ферменты. Ферменты эстеразы и липазы расщепляют жиры, что дает возможность микобактериям использовать их в качестве питательного материала. Дегидразы расщепляют органические кислоты, в том числе аминокислоты, уреазы – мочевины, перигалоза – углеводы, каталаза – водорода пероксид.

Протеолитические ферменты (протеазы) расщепляют белок. Микобактерии ферментируют алкоголь, глицерин и многочисленные углеводы, лецитин, фосфатиды. У молодых микобактерий туберкулеза сильно выражены редуцирующие свойства, что, в частности, проявляется в их способности восстанавливать теллурит.

Антигенная структура. Микобактерии имеют довольно сложную антигенную структуру. Антигены туберкулезных бактерий сравнительно малоактивны. Они связаны с клеточной стенкой, рибосомами, цитоплазмой, имеют белковую и липополисахаридную природу, участвуют в реакциях ГЗТ и ГНТ, обладают протективной активностью, что связано с наличием миколовых кислот.

Токсинообразование. Микобактерии туберкулеза содержат эндотоксины – туберкулины (Р. Кох, 1890), которые проявляют токсическое действие только в больном организме. Жирные кислоты (масляная, пальмитиновая, туберкулостеариновая, олеиновая) способствуют распаду клеточных элементов, творожистому перерождению тканей, блокируют липазу и протеазы, вырабатываемые микобактериями. Вирулентные микобактерии содержат полисахаридные компоненты, корд-фактор, обуславливающий вирулентность, склеивание микобактерий и рост их в виде жгутов и кос. Корд-фактор разрушает митохондрии клеток зараженного макроорганизма, нарушает функцию дыхания и фосфорилирование.

Устойчивость. Микобактерии туберкулеза обладают значительной устойчивостью к химическим и физическим воздействиям, особенно к высушиванию. В культурах они погибают через 8–10 мес. В мокроте сохраняются 5–6 мес., в фекалиях крупного рогатого скота на пастбищах летом – до 2, зимой – до 5 мес. В воде микроб выживает 7 мес., в

почве – более 2 лет, при гниении материала – 76–167 дней и дольше. Холод не влияет на жизнеспособность микобактерий.

Микобактерии весьма чувствительны к воздействию прямых солнечных лучей, в жаркие дни в мокроте они погибают через 1,5–2 ч. Особенно губительны для микобактерий ультрафиолетовые лучи. Важное значение в санитарно-профилактическом отношении имеет высокая чувствительность микобактерий к нагреванию. Во влажной среде микобактерии гибнут при 60 °С в течение 1 ч, при 65 °С – через 15 мин, при 70–80 °С – через 5–10 мин. В свежем молоке сохраняются 9–10 дней, в скисшем погибают под воздействием молочной кислоты, в масле – неделями, в сыре – 2–3 мес.

К дезинфицирующим средствам микобактерии туберкулеза сравнительно устойчивы по сравнению с другими неспорообразующими бактериями. Наилучшее влияние на них оказывают хлорсодержащие препараты: 3–5%-й раствор хлорамина, осветленный раствор хлорной извести, содержащий 5 % активного хлора, а также 3%-й щелочной раствор формальдегида при экспозиции не менее 3 ч.

Патогенность. Микобактерии патогенны для 55 видов млекопитающих и 25 видов птиц. Факторы патогенности: миколовые кислоты, корд-фактор, сульфатиды, микозиды, липоарабиноманан. Туберкулез протекает в большинстве случаев хронически и сопровождается образованием в пораженных органах и тканях типичных узелков-туберкулов, предрасположенных к творожистому распаду (казеозу).

Микобактерии бычьего вида патогенны для многих животных (коровы, овцы, козы, свиньи, лошади, верблюды, олени, кошки, собаки и др.), а также для человека, особенно для детей. Из лабораторных животных наиболее чувствительны кролики и морские свинки, у которых развивается генерализованный туберкулез.

Птичий вид вызывает туберкулез у кур, индеек, голубей, уток и др., но могут заразиться домашние животные и человек – иногда с тяжелым течением. Он вызывает туберкулезоподобные изменения у свиней. У крупного рогатого скота возбудитель туберкулеза птичьего вида обуславливает разную по времени (3–6, иногда до 9 мес.) сенсibilизацию к туберкулину. У кроликов вызывает сепсис, морские свинки малочувствительны.

Микобактерии туберкулеза человеческого типа весьма патогенны для людей, а также для свиней, кошек, собак, коз, крупного рогатого скота, попугаев. Из лабораторных животных наиболее чувствительны

морские свинки, хомяки. У кроликов возникают местные локальные изменения в легких и почках.

Отдельные виды атипичных микобактерий или их ассоциаций могут вызывать сенсбилизацию организма крупного рогатого скота, свиней и птиц к туберкулинам, а в отдельных случаях патоморфологические изменения в лимфатических узлах у свиней (например, *Mus. intracellulare*), неотличимые от туберкулезных изменений.

Патогенез. Возбудитель туберкулеза проникает в организм аэрогенным путем, реже – алиментарно.

При аэрогенном заражении первичный инфекционный очаг развивается в легких, при алиментарном – в мезентериальных, заглочочных, подчелюстных лимфоузлах.

В организме бактерии туберкулеза поглощаются макрофагами, взаимоотношение с которыми определяет дальнейшее развитие инфекции. В результате взаимодействия микобактерий и макрофагов под влиянием факторов вирулентности развивается воспаление гранулематозного типа.

Лабораторная диагностика. Включает микроскопию, посев патологического материала на питательные среды, исследование патологического материала и изолятов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и биологическую пробу.

Пробу для бактериологического исследования отбирают от каждого животного в отдельности. От млекопитающих берут лимфатические узлы: заглочочные, подчелюстные, бронхиальные, средостенные, портальные, брыжеечные, взятые в области илеоцекального соединения и подвздошной кишки. Парные лимфатические узлы вырезают с обеих сторон туши (трупа), указав их название на этикетке, которую упаковывают вместе с пробой.

При характерных туберкулезных изменениях в других органах или тканях из них берут кусочки размером 10×10 см. От животных при жизни направляют мокроту, слизь, гной, фекалии, кровь. От коров возможно взятие проб молока из всех четвертей вымени в объеме 150–200 мл. Тушки (трупы) птиц и мелких животных направляют в лабораторию полностью.

Материал доставляют в свежем или замороженном виде. Допускается пробы консервировать 30%-м стерильным водным раствором химически чистого глицерина. На отправляемый в лабораторию материал составляют сопроводительный документ с приложением к нему выписки из описи туберкулинизации животных и протокола или акта осмотра органов убитых животных (протокола вскрытия павших животных).

Мазки из патологического материала высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем и окрашивают по Цилю–Нильсену. Для микобактерий туберкулеза характерны тонкие, прямые или изогнутые красные палочки различной длины, часто зернистые. Они расположены небольшими скоплениями или единичны. Атипичные микобактерии морфологически трудноотличимы от возбудителя туберкулеза, однако чаще это грубые, толстые, как правило, незернистые палочки, различные по длине.

Способ световой микроскопии обычно дает положительные результаты при содержании 100 000 и более бактериальных клеток в 1 мл материала. Результаты (положительные или отрицательные) микроскопии не дают основания для постановки диагноза на туберкулез у животных (кроме птиц) и обязательно должны быть подтверждены культуральным или биологическим методами исследований.

При диагностике туберкулеза может использоваться люминесцентная микроскопия с использованием метода флюорохромирования и иммунофлюоресценции.

Сущность бактериологического метода заключается в выделении культур микобактерий туберкулеза и определении скорости роста и характера бактерий. Для посева на питательные среды патологический материал подвергают предварительной обработке указанными методами.

Посевы проводят на плотные яичные среды: Левенштейна–Йенсена, Гельберга, ФАСТ-ЗЛ, Финн-2, Петраньяни. Каждый материал засевают в 5–10 пробирок со средой. Пробирки заливают расплавленным парафином. Посевы просматривают не реже одного раза в неделю и выдерживают в термостате при соответствующей температуре не менее трех месяцев. Одновременно делят посевы на МПА, МПБ и яичную среду с салицилатом натрия, на которой растут микобактерии птичьего вида и атипичные. Атипичные микобактерии могут расти при разных температурах на яичных, а некоторые – и на простых средах.

Для микобактерий туберкулеза бычьего вида характерен рост через 20–60 сут в виде скупко растущих мелких, шаровидных в глубине среды, слегка возвышающихся, цвета слоновой кости колоний. Реже образуются морщинистые колонии.

Микобактерии человеческого вида растут через 20–30 сут в виде морщинистых, сухих, цвета слоновой кости колоний. Реже встречаются S-варианты (гладкие).

Для микобактерий туберкулеза птичьего вида характерны мягкие, слизистые (иногда с пуговицеобразным возвышением и кратеровид-

ным углублением) серовато-белые, реже слегка желтоватые колонии в течение 10–15 сут.

Для ускоренной бактериологической диагностики с целью выявления бактериологических маркеров туберкулезной инфекции — измененных (трансформированных) микобактерий в последнее время предложено использование питательной среды ВКГ, «Микофаст» и др. Использование ускоренного метода бактериологического исследования в сочетании с ПЦР благодаря высокой чувствительности позволяет в короткие сроки исключить туберкулезную инфекцию.

ПЦР применяют для обнаружения ДНК *Myc. bovis* и *Myc. tuberculosis* в посевах при ускоренной бактериологической диагностике туберкулеза для идентификации культур микобактерий, выделенных с использованием яичных питательных сред (допускается использование ПЦР для непосредственного выявления ДНК микобактерий туберкулеза в патологическом материале).

Определение видов микобактерий туберкулеза проводят на основании результатов патологоанатомического исследования погибших зараженных лабораторных животных. Используют морских свинок — подкожно, кроликов — внутривенно в краевую вену уха, кур — подкрыльцовую вену в дозах 1 мг микобактерий, суспендированных в 1 см³ физиологического раствора. Морских свинок и кур перед заражением подвергают туберкулинизации. Используют отрицательно реагирующих особей.

Myc. bovis вызывает развитие генерализованного туберкулезного процесса у кроликов и морских свинок в период от 3 нед. до 2–3 мес. после заражения. *Myc. tuberculosis* за это время вызывает генерализованный процесс только у морских свинок, у кроликов — местные изменения в легких и почках. В результате заражения *Myc. avium* кролики погибают в течение 11–30 сут от туберкулезного сепсиса без бугорковых изменений, морские свинки — нечувствительны. Гибель кур наступает в течение 3–4 нед. со множественными узелковыми поражениями печени и других органов.

В качестве раннего диагностического теста используют серологические реакции: РСК, РНГА, РИД, реакции агглютинации и перипципации, ИФА.

Дополнительно при диагностике туберкулеза животных может использоваться гистологический метод, сущность которого заключается в обнаружении в лимфатических узлах и органах больных туберкулезом животных морфологических изменений. Положительным резуль-

татом считают наличие в органах и лимфатических узлах частично или полностью обызвествленных некротических очагов-казеозов, окруженных зоной эпителиоидных, гигантских и лимфоидных клеток и соединительнотканной капсулой.

При дифференциальной диагностике туберкулеза учитывают схожие изменения, наблюдаемые при гранулемах, образующихся при микозах и паразитарных болезнях. В этих случаях регионарные парные лимфатические узлы не поражены.

В гранулемах микотического происхождения в некрозе находят мицелий гриба, при паразитарных — тело паразита и эозинофильно-клеточную пролиферацию в капсуле.

При паратуберкулезе наблюдают в брыжеечных лимфатических узлах и кишечной стенке эпителиоодноклеточную пролиферацию без образования некрозов.

На практике широко применяют аллергический метод с помощью туберкулина, который впервые предложил Р. Кох в 1890 г.

ППД для млекопитающих и ППД для птиц — протеин-пурифици-д-дериват — представляет вытяжку культуральных фильтратов бактерий. Для дифференциации аллергических реакций у животных А. Н. Шаровым в 1978 г. предложен комплексный аллерген из атипичных микобактерий (КАМ).

При выявлении реагирующих на туберкулин животных в срок не более 15 сут их подвергают диагностическому убою с последующим осмотром внутренних органов и тканей. Если у убитых животных туберкулезных изменений в органах и тканях не обнаруживают, отбирают пробы лимфатических узлов (при необходимости других органов и тканей) для лабораторного исследования.

При выявлении значительного количества реагирующих на туберкулин коров допускается применение прижизненных методов дифференциальной диагностики: ускоренное бактериологическое исследование крови, постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа, по результатам которых отбираются животные для диагностического уоя.

Диагноз на туберкулез считают установленным:

у *крупного рогатого скота* — при обнаружении характерных для туберкулеза патологоанатомических изменений (туберкулы); выделении из исследуемого материала культуры *Myc. bovis*, *Myc. tuberculosis*; положительной биопробе;

у *свиней* — при выделении из исследуемого материала культуры *Myc. bovis*, *Myc. tuberculosis*; положительной биопробе;

у птиц — при обнаружении микобактерий в препаратах-мазках из исследуемого материала методом световой микроскопии при характерных патологоанатомических изменениях; выделении культуры микобактерий птичьего вида (от попугаев — человеческого или птичьего); положительной биопробе.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет при туберкулезе нестерильный. Механизм иммунитета до конца не изучен. Возникающие в ответ на внедрение и размножение возбудителя антитела играют незначительную роль в защите организма. Главная роль в иммунной защите принадлежит Т-клеткам.

Вакцину против туберкулеза предложили французские ученые А. Кальметт и К. Герен в 1924 г. В течение 18 лет они культивировали штамм *Myc. bovis* на картофеле, пропитанном бычьей желчью с 5%-м глицерином (230 пересевов). В результате получили штамм с определенными биологическими свойствами. Назван штамм BCG (*Bacterium Calmett u Geurin*). Вакцину применяют для вакцинации людей. В ветеринарной практике возможно применение вакцины в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах. Необходимо иметь в виду, что микобактерии вакцинного штамма БЦЖ в организме вакцинированных животных подвергаются L-трансформации.

29.3. Возбудитель паратуберкулеза

Паратуберкулез (гипертрофический энтерит, паратуберкулезный энтерит) — хроническая инфекционная болезнь крупного рогатого скота (реже овец), характеризующаяся сначала периодическим, а затем постоянным расстройством деятельности желудочно-кишечного тракта, что клинически выражается поносами, постепенным истощением животного и его гибелью. На вскрытии регистрируют характерное утолщение слизистой оболочки в тощей и подвздошной кишках, напоминающее извилины мозга или гофрированной трубки, а также увеличение мезентериальных лимфоузлов (рис. 29.5, 29.6).

Впервые о болезни стало известно в 1829 г. в Великобритании. Возбудитель болезни открыт в Германии в 1895 г. Х. Ионе и Г. Фротингешем. В 1912 г. Ф. Туорт получил чистую культуру бактерий.

Возбудителя относят к домену *Bacteria*, типу *Actinobacteria*, классу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales*, семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium*, виду *Myc. avium subsp. paratuberculosis*.



Рис. 29.5. Корова, больная паратуберкулезом



Рис. 29.6. Поражение кишечника коровы, больной паратуберкулезом

Возбудитель паратуберкулеза является подвидом микроорганизма *Myc. avium*. Его в свою очередь относят к так называемому комплексу *Mycobacterium avium-intracellulare*, объединяющему, как минимум, два вида микобактерий, в том числе *Myc. avium* и *Myc. intracellulare*, не дифференцируемых по лабораторным тестам. В этой связи в клинической микробиологии при описании болезни, вызванной одним из названных микроорганизмов, говорят об инфекции из группы комплекса *Mycobacterium avium-intracellulare*.

Морфология. Возбудитель болезни *Myc. avium subsp. paratuberculosis* — кислото-, спирто- и щелочеустойчивая палочка, мелкая, длиной 0,5–1,5 мкм, шириной 0,2–0,5 мкм. Спор и капсул не образует, неподвижная, полиморфная. В препаратах из патологического материала (комки слизи, пораженные части слизистой кишечника) характерно расположение бактерий в виде частокола, мелкими глыбками, кучками, может быть по 2–3 клетки и более (рис. 29.7). В препаратах-отпечатках может располагаться внутриклеточно.

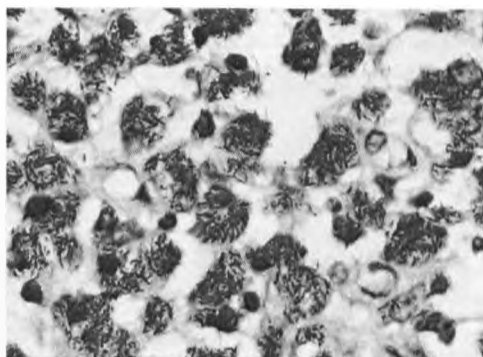


Рис. 29.7. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* в патматериале

По Цилю–Нильсену окрашивается в красный цвет. В старых культурах можно наблюдать кокковидные зернистые, а иногда длинные ветвистые формы.

Культуральные свойства. На обычных средах возбудитель не растет, очень плохо растет на средах для культивирования микобактерий. Используют специальные среды: Данкина, Вишневского, Смита, Боке, Дорсе с добавлением стимуляторов роста — экстракта из бактерий тимофеевой травы (*Myc. phlei*), туберкулина. Для получения первичных культур применяют плотную среду Данкина (состав: печеночный экстракт, глицерин, белок и желток яиц, спиртовой раствор генцианвиолета, экстракт бактерий тимофеевой травы).

В числе жидких сред применяют среды Данкина, Боке, Дорсе.

Культивируют бактерий в аэробных условиях при 38 °С. Рост появляется через 1,5–2 мес. На плотной среде возникают мелкие (1–2 мм) серовато-белые колонии, которые с течением времени превращаются в складчатые наложения. В жидких средах на их поверхности появляется пленка, со временем она утолщается и через 2–4 мес. опускается на дно колбы.

Антигенная структура. Изучена недостаточно. Установлено антигенное родство с *Myc. avium subsp avium*.

Устойчивость. Возбудитель паратуберкулеза довольно устойчив к воздействию физико-химических и биологических факторов. На пастбище они могут сохраняться и заражать животных в течение 2–3 сезонов. В почве и навозе он сохраняется до 10–12 мес., в кормах и воде непроточных водоемов — 8–10 мес., в моче — 7 дней. Солнечный свет убивает его через 10 мес. В молоке гибнет при нагревании до 85 °С — в

тчение 1–5 мин. Из дезинфектантов рекомендуют 10–20%-й раствор хлорной извести, 5%-й раствор формалина и лизола.

Биохимические свойства. Не изучены.

Патогенность и патогенез. Болеют крупный рогатый скот, овцы, олени, буйволы, реже верблюды, козы, яки. Лошади, мулы и свиньи паратуберкулезом не болеют. Из лабораторных животных могут болеть кролики, хомяки, мыши. Человек не болеет.

Заражение животных алиментарное. Молодняк чаще всего заражается при скармливании молозива от больных животных.

Существенную роль в развитии болезни играет токсин.

Возбудитель может локализоваться в слизистой оболочке кишечника, брыжеечных лимфоузлах, почках, яичниках, матке, плодных оболочках и водах, тестикулах. У молодняка возбудитель проникает в кровь, печень и вызывает там дегенеративные изменения. Поражение кишечника ведет к нарушению его функций, интоксикации организма, нарушению солевого и минерального обмена.

Лабораторная диагностика. Включает микроскопический, бактериологический и серологический методы исследования. Дополнительно применяется гистологический метод исследования.

Для посмертного бактериологического и гистологического исследований отбирают 3–5 разных участков тонкого отдела кишечника и 2–4 брыжеечных лимфатических узла, кусочек илеоцекальной заслонки с прилегающим лимфатическим узлом. При этом желательно отбирать измененные участки кишечника (с утолщенными стенками, с выраженной складчатостью слизистой оболочки) и увеличенные лимфатические узлы. От живых животных в лабораторию направляют фекалии с примесью слизи и крови (не менее 10 см³) и соскобы со слизистой оболочки прямой кишки. Для серологического исследования берут кровь.

Для бактериологического исследования отобранный материал можно консервировать стерильным 30%-м водным раствором глицерина или замораживанием.

Из патологического материала готовят мазки-отпечатки (из слизистой кишечника и брыжеечных лимфоузлов растиранием материала между двумя предметными стеклами), высушивают и окрашивают по методу Циля–Нильсена. Одновременно делают посевы из материала, подготовленного методом центрифугирования, на среду с микобактерином (Дюбо–Смита) и среду Левенштейна–Йенсена.

Питательные среды после посева материала выдерживают в термостате при 38 °С в течение 3–4 мес. Возбудитель паратуберкулеза в

первых генерациях размножается на питательной среде только в присутствии микобактина.

Биопробу не проводят, так как лабораторные животные нечувствительны к *Myc. avium subsp. paratuberculosis*. Возможна постановка биопробы с целью дифференциации от микобактерий туберкулеза.

Серодиагностика основана на РСК. В качестве антигена используют спиртовые, ацетоновые или эфирные экстракты из культур микобактерий паратуберкулеза. Однако эта реакция может быть полезна лишь при исключении у животных туберкулеза ввиду близкого антигенного родства возбудителей этих болезней. У клинически больных животных в 80 % случаев РСК подтверждает диагноз.

Сущность гистологического исследования заключается в выявлении в тканях животных, больных паратуберкулезом, микобактерий возбудителя болезни и характерных морфологических изменений (пролиферация из эпителиоидных и гигантских клеток). При этом следует учитывать, что у 1/3 животных гигантские клетки и микобактерии могут отсутствовать.

Аллергическая диагностика — применяют паратуберкулин (ионин, изготовленный Вишневым). Это фильтрат убитой кипячением 2—3-месячной культуры паратуберкулезных микобактерий, высушенных на специальной синтетической безбелковой среде. Кроме того, используют ППД для птиц. Оба препарата вводят внутривенно в области средней трети шеи.

Лабораторный диагноз на паратуберкулез считают установленным при:

наличии типичных клинических, патологоанатомических, гистологических изменений и обнаружении возбудителя в материале микроскопическим методом;

выделении из исследуемого материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя паратуберкулеза.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет изучен недостаточно. Считают, что иммунитет нестерильный, как и при туберкулезе. Аллергия возникает на начальной стадии болезни, а при дальнейшем ее развитии она постепенно угасает, а к концу болезни животные становятся ареактивными (анергия).

Биопрепараты для активной и пассивной профилактики болезни, а также лечения больных не разработаны.

Дизентерия свиней — это инфекционная, контактно-озная болезнь свиней, характеризующаяся профузным поносом с примесью слизи, крови, катарально-геморрагическим и некротическим воспалением слизистой оболочки толстого отдела кишечника и истощением животных. Болезнь регистрируется во многих странах мира, в том числе и на территории Республики Беларусь.

Болезнь под названием «дизентерия свиней» впервые была описана в 1921 г. К. П. Дойлем и др. в США. В последующие годы ее регистрировали почти во всех странах мира. Однако в течение 50 лет, несмотря на интенсивные исследования, этиологию дизентерии свиней не удалось установить и болезнь описывалась под различными названиями (вibriоз, балантидиоз, спирохетоз, геморрагический энтерит, дифтерический и поверхностный некротический колит, кровавый понос и др.). Окончательно этиология прояснилась лишь в 70-е гг., когда Д. Харрис и Р. Глок (1972), а также Лончаревич (1973) выделили от больных животных спирохету *Treponema hyodysenteriae*.

Согласно Справочнику Берджи (2011. Т. 4) брахиспир относят к домену *Bacteria*, типу *Spirochaetes*, классу *Spirochaetes*, порядку *Spirochaetales*, семейству *Serpulinaceae*, роду *Brachyspira*, виду *Brachyspira hyodysenteriae* (син. *Serpulina hyodysenteriae*, син. *Treponema hyodysenteriae*).

Морфология. При микроскопии в темном поле брахиспир имеют форму подвижных нитей с ровными, правильно расположенными завитками и острыми концами. Подвижны. Перемещаются они поступательно, змеевидно. Размер — 7–20 × 0,3–0,4 мкм. Морфологически различают три формы брахиспир свиней: крупные — длиной до 20 мкм с 8–12 завитками, средние — 8–12 мкм с 6–8 завитками и малые — до 8 мкм с

3–4 завитками. Хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, по Граму – грамотрицательны. Спор и капсул не образуют.

Культуральные свойства. Анаэроб, культивируется на специальных средах. К ним относятся: а) трипсин-агар с 5 % цитратной крови крупного рогатого скота; б) триптический соевый бульон с 10 % сыворотки крови плода коровы и спектиномицина (400 мг/л); в) соевый агар с 5 % крови крупного рогатого скота; г) МПБ (рН 7,4–7,6) с кусочками мелко нарезанной печени коровы, 50 % асцитической жидкости и 1:5000 аскорбиновой кислоты и др.

Посевы культивируют в анаэробных условиях 4–8 дней при 37–39 °С. На дне чашки с трипсин-агаром и 5 % крови через 72 ч развивается неправильной формы размером 3–4 мм зона гемолиза, в центре которой на поверхности агара редко встречаются мелкие прозрачные колонии или же нежная пленка со следами эрозии. Некоторые штаммы дают крупные колонии, под которыми ясно вырисовывается зона гемолиза. В препаратах из колоний микроскопически выявляются бактерии *Brachyspira hyodysenteriae*.

Биохимические свойства. Возбудитель ферментирует глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу, выделяет индол, не образует каталазу, оксидазу, лецитиназу, уреазу и сероводород, не разжижает желатин и не редуцирует нитраты в нитриты.

Антигенная структура. Слабо изучена. Установлено 12 серологических вариантов возбудителя дизентерии свиней. Штаммы дифференцируют на серотипы на основании водорастворимых антигенов.

Токсинообразование. *Brachyspira hyodysenteriae* выделяет гемолизин, обуславливающий β-гемолиз на кровяном агаре, продуцирует эндотоксин.

Устойчивость. Являясь строгим анаэробом, возбудитель вне организма имеет незначительную устойчивость. В фекальных массах при 0 °С сохраняется до 48 дней, при 10 °С – до 38, при 20 °С – до 12 дней, в замороженном патологическом материале – не менее 2 мес. При возвращении анаэробных условий в навозной жиже возбудитель может не только длительно сохраняться, но и накапливаться.

Для дезинфекции применяют 4%-й (70 °С) раствор натрия гидроксида и 2%-й раствор формальдегида. Возбудитель чувствителен к осарсолу, спирамицину и тилозину, а также к мышьяковистым и нитроимидазольным препаратам.

Важной характеристикой возбудителя дизентерии свиней является его способность выживать в местах фекальных загрязнений в течение

ние длительного времени. В целом брахиспира размножается во влажных прохладных биологических субстратах, органических материалах или на поверхности неживых объектов (фомитов). Это значит, что любая поверхность, загрязненная свиными фекалиями, может стать потенциальным источником инфекции для изначально незараженных популяций.

Патогенность. Восприимчивы свиньи всех пород и возрастов, но чаще болеет молодняк в возрасте 1–6 мес. Заражение происходит алиментарным путем.

Последовательность клинических признаков варьирует, что позволяет выделить сверхострое течение, при котором больные через 10–12 ч погибают, а также острое (геморрагический колит), подострое (диарея при нормальном аппетите) и хроническое – перемежающиеся поносы и запоры, истощение и появление на коже экзематозных поражений.

Основной источник распространения инфекции – зараженные свиньи и их фекалии. Оборудование для хранения и обработки навоза представляет собой постоянный источник инфекции. Через фомиты (транспортные средства, подъемное оборудование, инструменты, обувь и т.п.), загрязненные экскрементами, может происходить заражение других мест.

Бактерия *Br. hyodysenteriae* может переноситься мышами в течение года после истребления зараженных свиней. Возбудитель выделяется из фекалий свиней, птицы нанду и других млекопитающих, в том числе собак, контактирующих с фекалиями больных животных.

Основным возбудителем дизентерии свиней считается анаэробная грамотрицательная спирохета *Brachyspira (Treponema, Serpulina) hyodysenteriae*, синергично взаимодействующая с условно-патогенной микробиотой кишечника свиней. При этом ведущая роль в этиологии болезни отводится расстройствам микроиммунологического равновесия на почве снижения численности популяции бифидо- и лактобактерий (дисбактериоза), вызванного стрессорными воздействиями различного характера. В большинстве случаев дизентерия осложняется кампилобактериями, фузобактериями, листериями, клостридиями, инерихиями и некоторыми другими микроорганизмами.

Патогенез. Попав в организм свиней алиментарным путем, *Br. hyodysenteriae* достигает толстого кишечника, где фиксируется на слизистой оболочке. Здесь часть бактерий погибает, из них освобождаются вазомоторные субстанции, сенсibiliзирующие слизистую оболочку

толстого кишечника и повышающие ее проницаемость. Это способствует проникновению возбудителя в подслизистую ткань. Размножение микробов идет одновременно с их разрушением и освобождением токсических продуктов, под действием которых происходят морфологические и физиологические нарушения функции кишечника, что приводит к развитию дисбактериоза. Некротические и воспалительные процессы часто усиливаются другими бактериями (*Fusabacterium necrophorum*, *Bacteroides fragilis* и др.).

Лабораторная диагностика. Дизентерию свиней диагностируют по результатам бактериологического исследования, которое включает обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии (основной метод), а также выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим и ферментативным свойствам.

Материалом для прижизненной диагностики в лаборатории служат фекалии, для посмертной — слизистая оболочка большой ободочной кишки, которую соскабливают после удаления из кишечника содержимого и промывания водой. От трупов материал берут не позднее чем через 2 ч после гибели животного, материал должен быть исследован в течение 2–4 ч, а при хранении на холоде — 6–8 ч. Из материала готовят суспензию.

Поскольку культивирование возбудителя весьма трудоемко, *микроскопическое исследование* — это основной метод диагностики, доступный практическим лабораториям. Поступивший материал исследуют методом темнопольной, фазово-контрастной или обычной световой микроскопии.

При темнопольной микроскопии препарат «раздавленная капля» исследуют в водной иммерсии с объективом $\times 40$ и окулярами $\times 7$ или $\times 10$. Возбудитель в этом случае виден как спиралевидная клетка с 3–12 правильными витками размером $7-9 \times 0,3-0,4$ мкм, движущаяся змеевидно-поступательно. При температуре 22°C наблюдают изгибание и скользящее движение клетки, а при $37-42^\circ\text{C}$ клетка движется поступательно. У большинства больных дизентерией свиней в препарате «раздавленная капля» в одном поле зрения обнаруживают 5–10 спирохет и более.

В окрашенных по Граму препаратах видны грамотрицательные извитые клетки со строением, типичным для спирохет. Клетки возбудителя хорошо окрашиваются по Романовскому–Гимзе, фуксином Пфейффера. Сходные по морфологии с *Br. hyodysenteriae* вибрионы, обитающие

в кишечнике, различаются тем, что их клетка в 2–4 раза толще, с тупыми концами, движение вращательное вокруг длинной оси.

Разработан также прямой вариант реакции иммунофлюоресценции.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель – строгий анаэроб, температурный оптимум – 36–38 °С, при 25 и 30 °С не растет, рН 7,0–7,2. Для первичной изоляции используют селективные среды, например: а) кровяной агар со спектомицином: к перевару Хоттингера добавляют 0,001 % резазурина (индикатор ОКВП), 0,5 % натрия хлорида, 0,25 % глюкозы, 1 % пептона, 2 % агара, кипятят, пропускают через среду азот или оксид углерода(IV) в течение 10–15 мин, устанавливают рН 7,0–7,2, вносят 0,05 % гидрохлорида цистеина. Среду автоклавируют при 110 °С 30 мин, охлаждают до 40–45 °С, пропуская при этом через среду стерильный обескислороженный газ, после чего вносят 10 % дефибринированной крови барана (или крупного рогатого скота) и 400 мкг/мл спектомицина. Среду разливают в атмосфере оксида углерода(IV); б) жидкую или полужидкую среду, содержащую сердечно-мозговую вытяжку и 10 % эмбриональной телячьей или кроличьей сыворотки.

На кровяном агаре через 48–96 ч инкубирования при 38 °С вырастают плоские, просвечивающие колонии диаметром 0,5–3 мм с зоной бета-гемолиза. В полужидком сывороточном агаре возбудитель растет в виде беловатого диффузного облачка ближе к поверхности среды.

После изучения морфологии и культуральных свойств у выделенных бактерий исследуют ферментативную активность. Патогенные для свиней культуры гидролизуют эскулин, утилизируют пируват, при сбраживании глюкозы образуют водород, углекислоту, ацетат, бутират; нитрат не восстанавливают; растут на средах, содержащих 6,5 % натрия хлорида, но не растут на средах с 1 % глицина.

Биопроба – бронхиспиры хорошо размножаются в организме кролика и накапливаются в тестикулах. Фильтрат материала от больных свиней вводят кроликам внутрибрюшинно в дозе 5–7 мл. Через 7–10 дней берут пунктат и микроскопируют. При обнаружении бронхиспир кроликов убивают и подвергают исследованию (микроскопия, выделение культур).

Для подтверждения диагноза могут проводить метод флюоресцирующих антител, постановку РСК, гистологический метод исследования фекалий или соскоба слизистой оболочки толстого кишечника.

Аллергическая диагностика не разработана.

Дифференциальный диагноз — необходимо исключить вирусный и энтеровирусный гастроэнтериты, эшерихиоз, сальмонеллез, анаэробную дизентерию, пастереллез, кормовые токсикозы.

Диагноз на дизентерию свиней ставят на основании лабораторных исследований с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений. При этом о наличии возбудителя дизентерии свиней судят по обнаружению морфологически типичного возбудителя в мазках из патологического материала или культуры методом световой или люминесцентной микроскопии.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет непродолжительный и слабой напряженности. Биопрепараты для специфической профилактики и терапии не разработаны.

С целью профилактики дизентерии свиней необходимо тщательно выполнять ветеринарно-санитарные правила содержания, кормления и эксплуатации животных. На фермах (цехах) нужно систематически проводить профилактическую дезинфекцию, дезинсекцию и дератизацию.

Глава 31 ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛЕПТОСПИРОЗА

Лептоспироз — инфекционная природно-очаговая болезнь многих видов домашних, сельскохозяйственных и диких животных, характеризующаяся кратковременной лихорадкой, гемоглобинурией, геморрагиями, атонией органов пищеварения, анемией, желтухой, некрозом слизистых оболочек и кожи, абортными, рождением нежизнеспособного потомства, снижением продуктивности животных и их гибелью.

Впервые болезнь у человека была описана немецким ученым в 1886 г. А. Вейлем. В России научное описание болезни дал Н. П. Васильев в 1888 г. С учетом этого лептоспироз у человека называли болезнью Васильева–Вейля. Возбудителя лептоспироза впервые обнаружили Р. Инадо и И. Идо в Японии в 1914 г. Они выделили лептоспир из печени морских свинок, которых ученые заражали кровью людей, больных «инфек-

ционной желтухой». Затем лептоспиры были изолированы от крупного рогатого скота (С. Н. Никольский, Ф. М. Десятов, Г. Ф. Марченко, 1934), свиней (А. Кларендек и И. Виссер, 1937), коз (Вирт, 1937), овец (В. И. Терских и В. С. Газарян, 1942).

Всестороннее изучение лептоспироза сельскохозяйственных животных было начато в 50–60-е гг. XX в. и продолжается до сих пор.

Согласно Справочнику Берджи (2011. Т. 4) лептоспир относят к домену *Bacteria*, типу *Spirochaetes*, классу *Spirochaetia*, порядку *Spirochaetales*, семейству *Leptospiraceae*, роду *Leptospira*.

Род объединяет 15 видов. *Leptospira biflexa* — сапротрофы. К патогенным видам относят *L. interrogans* и виды с невыясненной патогенностью — *L. alexanderi*, *L. inadai*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii* и др. Тем не менее, несмотря на наличие видовой классификации лептоспир, для практического удобства используют классификацию, основанную на антигенной принадлежности, в которой главным таксоном является серогруппа (*Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Icterohemorrhagiae*, *Louisiana*, *Mini*, *Pomona* и др.). При этом сероварианты одной серогруппы могут принадлежать двум и более видам. Например, к виду *L. interrogans* относятся сероварианты: *Australis*, *Autumnalis*, *Bataviae*, *Canicola*, *Djasiman*, *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Icterohemorrhagiae*, *Louisiana*, *Mini*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Ranarum*, *Sarmin*, *Sehgali*, Сејгое; к виду *L. alexanderi* — *Hebdomadis*, *Javanica*, *Manhoa*, *Mini*; к виду *L. kirschneri* — *Australis*, *Autumnalis*, *Bataviae*, *Canicola*, *Cynopteri*, *Djasiman*, *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Icterohemorrhagiae*, *Pomona*.

Среди патогенных лептоспир насчитывается 230 сероваров, которые по степени антигенного родства объединены в 23 серологические группы. В связи с выделением новых штаммов количество сероваров и серогрупп постоянно увеличивается. В этиологии лептоспироза животных в Беларуси основную роль играют лептоспиры серогрупп *Pomona*, *Tarassovi*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Hebdomadis*.

Морфология. Лептоспиры разных сероваров не различаются по морфологическим и культуральным признакам. Это спиралевидные бактерии, длина клетки — от 3 до 30 мкм, ширина — 0,06–0,15 мкм. Они имеют вид тонких серебристых нитей, концы которых булавовидно утолщены и загнуты в виде крючков. Микроскопируют лептоспиры в живом состоянии, используя конденсор темного поля (рис. 31.1). Гело лептоспир состоит из осевого цилиндра с расположенной на нем в виде завитков цитоплазмы. Осевая нить имеет две плотно прилегающие друг к другу нити, каждая из которых в свою очередь состоит из 6–7 фибрилл. Осевая нить прикреплена к концевым дискам (ба-

зальным тельцам). В центре микробной клетки осевая нить прерывается. По строению и функции она близка к жгутикам и считается органеллой движения. Лептоспиры по виду напоминают начертание букв Г, С, S. Они постоянно движутся, движение вращательно-поступательное, прекращается только после их гибели. Микробные клетки, выделенные из патологического материала, по сравнению с лабораторными культурами меньшего размера и более подвижные. Спор и капсул лептоспиры не образуют. С трудом окрашиваются по Граму, грамотрицательны. Плохо окрашиваются анилиновыми красителями, а при окрашивании их морфология изменяется. Тело лептоспир имеет коэффициент преломления, близкий к таковому у стекла.

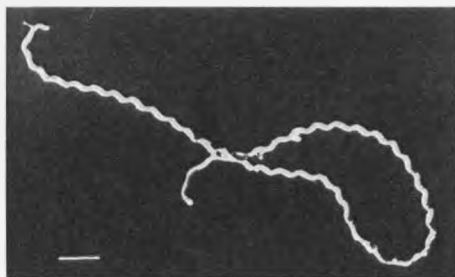


Рис. 31.1. Лептоспира в темном поле

Лептоспир необходимо отличать:

от нитей фибрина;

обломков хвостовых частей спермиев;

разрушенных эритроцитов;

спирилло- и вибриоподобных микроорганизмов;

интерспир у хряков.

Нити фибрина, обломки хвостовых частей спермиев, обломки эритроцитов неподвижны, на концах нет крючков. Спирилло- и вибриоподобные микроорганизмы отличаются по виду и характеру движения, отсутствию концевых крючков, утолщений.

Интерспир, обитающие в препуциальном мешке хряков, отличаются тем, что завитки у них грубые и более четко выражены, они маятникообразно перемещаются.

Для достоверной дифференциации лептоспир от других бактерий применяют метод иммунофлюоресценции.

Культуральные свойства. Культивируют лептоспир на специальных средах. Первые изоляты лептоспир Р. Инадо и И. Идо получили

на среде Ногучи: агар — 1 ч, раствор Рингера — 3 ч, сыворотка крови кролика — 1 ч, цитратная плазма крови кролика — 0,5 части. С того времени прошло много лет, было предложено немало питательных сред, однако практическое применение получили сывороточные; полусинтетические (твин-альбуминовые) и синтетические среды.

В ветеринарных лабораториях чаще всего используют сывороточные жидкие, реже плотные среды.

Лептоспиры прихотливы к питательным средам. К приготовлению питательных сред предъявляют следующие общие требования:

посуда должна быть вымыта;

в сыворотке крови доноров должны отсутствовать специфические антитела к лептоспирам;

должны применяться химические вещества только марки ХЧ, дистиллированная, бидистиллированная или деминерализованная вода;

должна соблюдаться стерильность и полная прозрачность среды;

нейтральная или слабощелочная реакция среды — рН 7,0—7,4;

среда на интенсивность роста и возможность ее использования для культивирования лептоспир должна быть апробирована, при просмотре 5—7-дневных культур не должно быть самоагглютинации, дегенеративных форм лептоспир.

Из плотных сред в практике используют среды Кокса, Киктенко, Канарейкиной, Ежова, среду ВГНКИ.

Сравнительная оценка 12 плотных питательных сред была проведена Г. Л. Соболевой. В результате было установлено, что наиболее приемлема среда следующего состава: агар Дифко — 10 мл; пептон Дифко — 1; сыворотка крови кролика — 100 мл; дистиллированная вода — до 1 л; фосфатно-буферная смесь Зоренсена — 100 мл.

Пригодна для культивирования лептоспир плотная среда, содержащая корсаковский агар и сыворотку крови кролика. Эту среду используют для очистки культур лептоспир, отбора S-форм колоний.

Посев производят на поверхность среды бакпетлей или шпателем. Чашку Петри переворачивают и в крышку помещают фильтровальную бумагу, смоченную стерильной водой. Чашку закрывают лейкопластырем, изоляционной лентой или заливают парафином.

Растут лептоспиры в аэробных условиях, оптимальная температура роста — 28—30 °С. На плотной питательной среде лептоспиры формируют колонии, представляющие собой матовые непрозрачные гомогенные диски с хорошо выраженным отчетливым, иногда расплывчатым краем.

По мере старения колоний появляется зернистость и вокруг них прозрачная зона, т. е. начинается лизис бактерий с края колонии. Колонии могут быть в S-, O- и R-формах. S-форма типична, расплодка из таких колоний характеризуется выраженной вирулентностью, антигенной и иммуногенной активностью.

Исследования, проведенные Ю. А. Малаховым и Г. Л. Соболевой, позволили сделать вывод о том, что лептоспиры различных сероваров, паразитирующие в разных регионах мира на животных разных видов, имеют практически один и тот же характер роста на плотной питательной среде независимо от их вирулентности и давности выделения. На практике для выращивания лептоспир используют среды Уленгута, Любашенко, Ферворта–Вольфа, Кортгофа, среду ВГНКИ и др.

Для поддержания диагностических штаммов лептоспир в ветеринарных лабораториях применяют сывороточную среду. Дистиллированную воду (нехлорированную, водопроводную, колодезную, речную) стерилизуют в автоклаве при давлении $1,013 \cdot 10^5$ Па, охлаждают и добавляют 5–7 % сыворотки крови кролика или барана, фильтруют через пластинки марки СФ и разливают по пробиркам.

Ю. А. Малахов рекомендует использовать для культивирования лептоспир сыворотку крови только кроликов и овец. Сыворотка крупного рогатого скота, лошадей, свиней обладает бактерицидным действием по отношению к лептоспирам. Наиболее активно росту лептоспир способствует альбуминовая фракция. Какая фракция ингибирует рост, остается неизвестным.

Рост лептоспир в жидкой питательной среде начинается на 5–20-й день, иногда через 1–2 мес. после посева. При росте лептоспиры вызывают слабое помутнение. В сывороточной среде обычно вырастет не более 100 млн микробных клеток/мл, в альбуминовых средах – 1–2 млрд/мл лептоспир, однако в альбуминовых средах антигенная и иммуногенная активность их резко снижается.

Биохимические свойства. Изучены плохо. Ферментация углеводов не доказана.

Антигенная структура. Лептоспиры обладают общим белковым соматическим антигеном, который определяет видовую специфичность. Поверхностные полисахаридные антигены служат критериями групповой и серовариантной дифференциации. Антигенные свойства лептоспир изучают в РМА и методом иммуноадсорбционного анализа.

Устойчивость. Лептоспиры являются типичными гидрофилами, в воде могут сохраняться до 30 сут, во влажной почве – до 300 дней. В замороженном виде при -70°C они могут выживать годами.

В пробирках под ватно-марлевыми пробирками в сывороточной, особенно в альбуминовой, среде, лептоспиры быстро отмирают. Исключение доступа воздуха увеличивает продолжительность выживания культур в десятки раз. Чем ниже температура, тем лептоспиры дольше выживают и лучше сохраняются. Они могут выживать годами при температуре жидкого азота. Содержание в жидком азоте обеспечивает сохранение их биологических свойств. Недостаток метода — необходимость постоянно поддерживать уровень азота в сосуде Дьюара.

Штаммы лептоспир можно хранить в запаянных ампулах в течение двух лет, при этом они не теряют своих биологических свойств.

Штаммы лептоспир можно хранить лиофильно высушенными, но проще в запаянных ампулах.

Патогенность. Лептоспиры способны вызывать болезнь у многих видов животных, а также у человека. Они патогенны для крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, оленей, мелкого рогатого скота, свиней, песцов, шакалов, волков, зайцев и т. д.

Из лабораторных животных восприимчивы к лептоспирам белые мыши, золотистые хомячки, крольчата 10–20-дневного возраста.

Существует ряд сообщений о выделении лептоспир от домашних и диких птиц. Однако в их патологии бактерии не имеют значения. Низкая зараженность птиц объясняется особенностями их физиологии. У птиц высокая температура тела (41 °С). Моча насыщена солями и мочевой кислотой, в которой лептоспиры теряют подвижность и быстро погибают.

Факторами патогенности лептоспир являются эндотоксин и ферменты: гемолизин, фибринолизин, плазмокоагулаза, липаза, лецитиназа, гиалуронидаза.

Патогенез. Инфекционный процесс, вызываемый лептоспирами разных сероваров у животных разных видов, имеет ряд общих черт: одни и те же ворота инфекции, отсутствие поражений на месте проникновения возбудителя и в регионарных лимфоузлах, кратковременная лихорадка, длительное персистирование в мочеполовых органах, выделение возбудителя с мочой, поражения типа нефритов и дегенерация в почках, иногда — гематурия и желтушность. Интенсивность проявления симптомов и патологоморфологических изменений зависит от степени адаптации возбудителя к макроорганизму, вирулентности лептоспир, возраста и состояния животного.

Попав в организм, лептоспиры вследствие активного движения, по данным одних авторов, через 5–60 мин, других — через 12 ч про-

никают в кровь и различные органы, минуя лимфоузлы. Накопление и развитие лептоспир в крови, внутренних органах и тканях вызывает повышение температуры.

Начиная с 3–5-го дня болезни в крови животных появляются агглютинирующие и лизирующие антитела и лептоспиры исчезают из крови.

Эндотоксины лептоспир разрушают клетки крови и органов. В результате разрушения эритроцитов у животных развивается анемия, в крови накапливается большое количество гемоглобина, из которого образуется билирубин. В нормальной печени билирубин связывается с глюкуроновой кислотой и выводится из крови. В пораженной печени этого не происходит, билирубин адсорбируется из крови тканями, окрашивая их в желтый цвет. В результате нарушения фильтрационной способности почек в моче появляется гемоглобин, а иногда и эритроциты. Формируется другой клинический признак — гемоглобинурия или гематурия. Из-за пораженного эндотелия капилляров стенки сосудов становятся хрупкими, повышается их проницаемость, появляются кровоизлияния в почках, легких, эндокарде, эпикарде, на слизистой желудочно-кишечного тракта и в коже. Вследствие интоксикации капилляры кожи и слизистых оболочек суживаются, закупориваются тромбами. Это нарушает питание тканей и вызывает появление некрозов. Аборты происходят вследствие поражения плаценты и действия токсических веществ лептоспир на плод, куда они проникают через плаценту.

Лабораторная диагностика. Лептоспироз диагностируется бактериологическим (микроскопия исходного материала и выделенных культур, выделение культур лептоспир, постановка биологической пробы, серологическая идентификация выделенных культур), серологическим (обнаружение специфических антител в крови животных в реакции микроагглютинации (РМА) и гистологическим (импрегнация гистологических срезов почек и печени серебром по Левадити) методами исследований.

Материалом для исследования при жизни животного служат кровь, моча, абортированный плод или же его желудок с содержимым, паренхиматозные органы плода. Кровь берут на 5–7-й день болезни и на 60-й день после вакцинации.

После гибели животного материалом для исследования являются печень, трансудат из грудной и брюшной полостей, спинномозговая жидкость, мочевого пузыря с содержимым. Мочу собирают при естественном мочеиспускании в чистые пробирки, банки, колбы, чашки

Петри. Лучше брать мочу утром, после подъема животных, у свиней после 1–2-часового лежания. У коров и свиноматок мочу можно брать с помощью катетера.

Кровь для высева берут в период лихорадки, на 1–5-й день болезни, для серологического исследования – не ранее чем через 5–7 дней после появления клинических признаков болезни. Почку направляют в не вскрытой капсуле.

Сердце, мочевой пузырь и желудок используют с содержимым, для чего накладывают лигатуры на сосуды и сфинктеры. Транссудат, спинномозговую жидкость и другие жидкие субстраты насаживают в шприцы или пипетки, которые запаивают с обоих концов.

Патологический материал должен быть взят и исследован в течение 6 ч в летнее время и 10–12 ч в зимнее при условии хранения его в охлажденном состоянии. Вообще необходимо придерживаться правила: чем меньше прошло времени с момента гибели животного до исследования материала, тем больше вероятность обнаружения лептоспир.

Для микроскопического исследования моча должна быть в нативном виде или после центрифугирования. Прозрачную мочу центрифугируют при частоте вращения 10 000–15 000 мин⁻¹, сливают надосадочную жидкость, осадок микроскопируют. Если посторонних частиц много, центрифугируют при 3000 мин⁻¹, надосадочную жидкость сливают, снова центрифугируют при частоте вращения 10 000–15 000 мин⁻¹ 30 мин, микроскопируют осадок.

Кровь смешивают с двойным количеством 1,5%-го раствора лимоннокислого Na, центрифугируют при частоте вращения 2000–3000 мин⁻¹ 5 мин, отстаивают в течение 1 ч, микроскопируют надосадочный слой.

Кусочки органов растирают в ступке с 5–7 мл питательной среды до получения гомогенной взвеси, суспензию отстаивают в холодильнике, центрифугируют при частоте вращения 3000 мин⁻¹ 10 мин и микроскопируют надосадочную жидкость.

Транссудат из грудной и брюшной полости, окологердечную жидкость, содержимое желудка плода и другие жидкие субстраты готовят для исследования по той же методике, что и мочу.

Из проб крови и суспензии каждого органа готовят не менее трех раздавленных капель и просматривают не менее 50 полей зрения.

Выделение культур лептоспир из крови при жизни возможно в первые 5–7 дней болезни. В 5–7 пробирок вносят по 3–5 капель крови. Мочу, ликвор, транссудат, суспензию из органов засевают по 1–

2 капли в 3–5 пробирок с питательной средой. Посевы культивируют при 28–30 °С в течение 3 мес. Для выявления роста пробирки с питательной средой микроскопируют каждые 5 сут. Содержимое каждой пробирки, где обнаружен рост, пересевают в 3–5 пробирок со свежей питательной средой.

Очистка загрязненных культур лептоспир проводится биологическим методом, фильтрацией через бактериальные фильтры, высевом на плотные среды.

Загрязненную культуру вводят внутрибрюшинно морским свинкам по 1–2 мл, крольчатам – 1–2 мл, хомячкам или белым мышам – по 0,5 мл.

Лептоспиры проходят через фильтр-пластинки марки «СФ» и свечи Шамберляна Л-5. Фильтрат засевают в пробирки с питательной средой.

Биологическое исследование проводят на золотистых хомячках, крольчатах, сусликах, щенках собак, котятках, белых и серых мышках. В работе используют 20–30-дневных хомячков, 10–30-суточных крольчат-сосунов, морских свинок недельного возраста. Исследуемый материал вводят подкожно или внутрибрюшинно: хомячкам – 0,3–1 мл, крольчатам – 2–3 мл. Одного зверька убивают на 4–5-й день, другого, если не погибает, – на 14–15-й, их кровь исследуют в РМА и реакции агглютинации. Делают высевы из сердца, печени, почки. Околосердечную жидкость, трансудат, содержимое мочевого пузыря микроскопируют. Культуры лептоспир чаще удается выделить в период проявления у животных клинических признаков.

Серологическое исследование заключается в постановке РМА. Для исследования пригодны свежие, замороженные, высушенные, консервированные фенолом или борной кислотой сыворотки. Консервированные пробы пригодны в течение месяца. Гемолизированные, загнившие, плесневелые, проросшие сыворотки не исследуют. В качестве антигенов используют культуры лептоспир в возрасте 5–15 дней без признаков агглютинации с накоплением 70–100 микробных клеток в поле зрения микроскопа. В качестве электролита применяют 0,85%-й раствор NaCl (ХЧ и ЧДА) в дистиллированной воде. Сыворотку исследуют в трех разведениях: 1:100, 1:500, 1:2500. Можно ставить реакцию в разведении 1:100, 1:200, 1:400 и т. д. до предполагаемого титра. Животных с титром сыворотки в РМА в любом разведении считают инфицированными лептоспирами.

Гистологический метод диагностики основан на обнаружении лептоспир в гистологических срезах, импрегнированных серебром по Лева-

шти. Материалом для гистологического исследования служат кусочки коркового слоя почек и печени толщиной не более 1 см, консервированные 10%-м раствором формалина. При микроскопии гистосрезов лептоспиры обнаруживают чаще на поверхности эпителия и в просветах мочевых канальцев почек, несколько реже в цитоплазме эпителия, преимущественно группами. Типичные лептоспиры всегда окрашены в черный цвет, имеют S-образную форму с 1–2 изгибами или змеевидную форму с грубыми толстыми завитками, которые в отдельных случаях слабо заметны. Окружающая ткань окрашивается в буровато-желтый цвет.

Диагноз на лептоспироз считают установленным:

а) по результатам бактериологического исследования, если:

культура лептоспир выделена из патологического материала или органов лабораторного животного, зараженного исследуемым материалом;

лептоспиры обнаружены при микроскопическом исследовании в крови, моче или суспензии из органов животных, абортировавшем (мертворожденном) плоде или органах лабораторного животного, павшего после заражения исследуемым материалом;

лептоспиры обнаружены в гистологических срезах, импрегнированных серебром, приготовленных из почек или печени животных (органов абортировавшего или мертворожденного плода);

лептоспиры обнаружены методом флюоресцирующих антител;

б) по результатам серологического исследования при:

установлении нарастания титров антител в сыворотке крови при двукратном исследовании с интервалом 7–10 дней в РМА у одних и тех же животных;

выявлении антител в сыворотке крови абортировавших животных при однократном исследовании в титре 1:2500 и выше или увеличении их при двукратном исследовании;

обнаружении антител в сыворотке крови в титре 1:50 и выше более чем у 25 % обследованных невакцинированных животных;

выявлении менее 25 % реагирующих животных (1:50 и выше — у невакцинированных и 1:100 и выше — у вакцинированных), дополнительно выполняют микроскопию мочи. При отрицательном результате исследования мочи через 15–30 дней проводят повторное исследование крови и мочи ранее исследованных животных. Обнаружение лептоспир или антител при повторном исследовании у животных, не имевших их при предыдущем анализе, или нарастании титра антител свидетельствует о неблагополучии хозяйства. У ранее привитых жи-

вотных поствакцинальные антитела могут сохраняться у свиней до 2 мес., у крупного рогатого скота — до 3 мес.

Необходимо помнить, что лептоспиры обладают высокой степенью инвазивности и весьма опасны для человека, поэтому специалисты, работающие с культурами лептоспир, в обязательном порядке должны быть вакцинированы против лептоспироза.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Переболевшие лептоспирозом животные приобретают длительный и напряженный иммунитет. Ведущую роль в иммунитете играют специфические антитела, при этом невосприимчивость к болезни определяется серовариантной принадлежностью лептоспир, вызвавших инфекционную патологию. Не исключена возможность и реинфекции. Сыворотка крови реконвалесцентов обладает превентивными свойствами.

Для активной профилактики болезни применяют поливалентную вакцину ВГНКИ. ОАО «БелВитунифарм» выпускает вакцину в двух вариантах: первый — составлен из штаммов лептоспир помона, тарассови, интерогеморрагия и каникола, второй — из бактерий, относящихся к серогруппам помона, тарассови, гриппотифоза, иктерогеморрагия, харжио.

Для пассивной профилактики лептоспироза и лечения больных животных применяют специфическую гипериммунную сыворотку. Иммунитет у животных, получивших сыворотку, сохраняется в течение 10–14 сут.

Глава 32 ВОЗБУДИТЕЛИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА

Кампилобактериоз (вibriоз) — инфекционная болезнь животных и человека, вызываемая патогенными микроорганизмами рода *Campylobacter*, характеризующаяся разной степенью тяжести и полиморфности проявлений. Сопровождается у животных поражением половых органов, частыми перегулами, бесплодием, массовыми абортами, метритами, вагинитами, рождением нежизнеспособного потомства, поражением кишечника и печени. У человека чаще протекает как

острая желудочно-кишечная болезнь, реже вызывает системные заболевания, перинатальные инфекции.

Впервые возбудителей болезни у овец в 1909 г. и крупного рогатого скота в 1913 г. обнаружили Д. МакФадриан и С. Стокман в Англии.

В 1918 (1919) г. Т. Смит и М. Тейлор в США выделили вибрионы от крупного рогатого скота, описали морфологические свойства их и назвали *Vibrio fetus*.

В бывшем СССР впервые кампилобактериоз у крупного рогатого скота установил В.А. Якимов в 1926 г., затем первые данные по вибриозу овец были опубликованы в 1929 г., у свиней – в 1960 г., у кур – в 1963 г., у коз – в 1972 г.

Болезнь регистрируют во многих странах мира, в том числе и в Беларуси. Болезнь сопровождается значительными экономическими потерями вследствие частых повторных осеменений, аборт, недополучения приплода и молодняка, больших затрат на проведение оздоровительных мероприятий.

Согласно Справочнику Берджи (2004) кампилобактерии относят к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Epsilonproteobacteria*, порядку *Campylobacterales*, семейству *Campylobacteraceae*, роду *Campylobacter*.

Род включает 17 видов. Некоторые виды объединены в подвиды. Так, вид *fetus* включает подвиды *fetus* и *venerealis*; вид *jejuni* – подвиды *jejuni* и *doylei*; вид *sputorum* – подвиды *sputorum* и *bubulus*; вид *hyointestinalis* – подвиды *hyointestinalis* и *lawsonii*.

Основными возбудителями кампилобактериоза крупного рогатого скота являются *C. fetus sbsp. fetus*, *C. fetus sbsp. venerialis*, *C. jejuni*; овец – *C. fetus sbsp. fetus*, *C. jejuni*; свиней – *C. hyointestinalis*, *C. mucosalis*; птиц – *C. jejuni*; собак – *C. jejuni* и *C. fetus sbsp. fetus*; человека – *C. fetus sbsp. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*.

Морфология. Кампилобактерии (от гр. *campylos* – кривой, изогнутый) – палочки длиной от 0,5 до 30 мкм, шириной 0,2–0,8 мкм, полиморфные, тонкие, изогнутые, в виде запятой, летящей чайки, букв V и S, могут иметь вид спирали, штопора с несколькими завитками (рис. 32.1). В старых культурах бактерии сферической или кокковидной формы. Бактерии грамотрицательны, спор и капсул не образуют, подвижные – имеют один полярный жгутик, реже – два на каждом из концов клетки. Движение винтообразное. По Граму окрашиваются с трудом. Красят карболовым фуксином Циля, разведенным 1:5, в течение 1–2 мин, и всеми анилиновыми красками.



Рис. 32.1. Возбудитель кампилобактериоза (*C. fetus* sbsp. *fetus*)

Культивирование. Выращивают микробы на специальных и элективных питательных средах при 37–38 °С в анаэробных или микроаэрофильных условиях (в атмосфере 85 % N₂, 10 % CO₂, 5 % O₂) в течение 6–10 сут.

Бактерии требовательны к питательным средам. Для культивирования используют 0,2%-й полужидкий агар (ПЖА), 2–3%-й мясопептонно-печеночный агар (МППА), среду Китта–Тароцци без вазелинового масла, сафранин- и железновобиоциновую среду (СЖН), приготовленную на основе экстракта мышцы крупного рогатого скота с добавлением 2–5 % аминокептида, 2–5 % экстракта сухих дрожжей.

В полужидком агаре через 2–7 сут отмечен рост на поверхности среды в виде серовато-голубоватого диска толщиной 1–4 мм, на плотной среде – мелкоросинчатый налет, вначале бесцветный, а затем серо-голубоватый, или отдельные голубоватые колонии, заметные через лупу.

На сафранин-железновобиоциновой среде при росте чистой культуры цвет среды не изменяется (розовый), при росте смешанной культуры среда становится ярко-желтой. В жидкой питательной среде рост скудный, наблюдается легкое помутнение.

Биохимические свойства. Микробы не обладают сахаролитической и протеолитической активностью. Индол не выделяют, образуют H₂S, желатин не разжижают, молоко не свертывают. Реакция с метиловым красным и Фогеса–Проскауэра отрицательная. Оксидазоположительные. Редуцируют нитраты. Пигмента не образуют.

Антигенная структура. В антигенном отношении кампилобактеры неоднородны: они четко дифференцируются в реакциях агглютина-

нии и непрямой гемагглютинации. Для их типирования производятся моноспецифические сыворотки. Кампилобактеров имеют O-соматический и H-жгутиковый антиген. Выявлена антигенная связь кампилобактерий с бруцеллами.

Устойчивость. Кампилобактерии – типичные гидробионты: в сене, подстилке, навозе, почве, воде при 18–23 °С остаются жизнеспособными 20–30 дней. В замороженном патологическом материале при –20 °С сохраняются до 5–8 мес., в сперме – 9 мес. В гниющем материале разрушаются быстро. Высушивание их убивает через 3 ч. Неустойчивы к высоким температурам, при 55 °С гибнут за 5–10 мин.

Обычные дезрастворы инактивируют бактерий за 5–10 мин.

Патогенность. Патогенные свойства связаны с активной подвижностью, хемотаксисом и адгезией к эпителиальным клеткам, а также со способностью образовывать термостабильные эндо-, энтеро- и цитотоксины.

Чаще всего болеют крупный рогатый скот, овцы, реже – свиньи, козы, куры. Основным источником возбудителя при кампилобактериозе – крупный рогатый скот, зараженные быки-производители, у которых микробы пожизненно сохраняются в семенниках, придатках, крипах слизистой оболочки препуциального мешка. Выделяются бактерии со спермой, секретом предстательной железы, препуциальной слизью. Заражение происходит в основном при естественном спаривании или искусственном осеменении. Возможно контактное заражение неполовозрелых телок и телят-молочников от больных коров.

Основным источником возбудителя при кампилобактериозе овец служат абортировавшие овцематки, выделяющие возбудителя с околоплодными водами, последами, плодами, влажными истечениями. Часть овец могут быть скрытыми микробоносителями до 1–1,5 лет. Микробы заселяют слизистые оболочки кишечника и желчного пузыря, выделяясь с фекалиями.

Заражение здоровых животных происходит алиментарным и половым путями.

В распространении возбудителя кампилобактериоза свиней наибольшее значение придается хрякам-производителям и свиноматкам, выращенным в неблагополучном стаде и являющимся длительные время бактерионосителями.

У кур бактерии передаются с пометом. Болезнь характеризуется снижением прироста массы бройлеров, яйценокости кур-несушек, надежом цыплят.

У человека кампилобактерии вызывают энтероколиты, менингиты, энцефалиты, эндокардиты, гнойно-воспалительные заболевания новорожденных и заболевания ротовой полости. Инкубационный период длится 2–3 дня. Болезнь начинается остро: диарея, рвота, интоксикация, повышение температуры, длится до 10 сут.

Из лабораторных животных болеют беременные морские свинки, хомячки, небеременные самки белых мышей.

Патогенез. У быков возбудитель кампилобактериоза локализуется в слизистой оболочке препуциальной полости и уретры, семенниках, их придатках, длительное время сохраняется и выделяется со спермой. Попав во влагалище, кампилобактерии размножаются, проникают в матку, вызывают вагинит, эндометрит, оплодотворенная яйцеклетка не приживается, эмбрион гибнет. Если эмбрион развивается, то бактерии внедряются в плаценту, плодные оболочки, вызывают воспаление, нарушение кровообращения, аборт.

Овцы заражаются алиментарным путем, возбудитель по кровеносным сосудам попадает в матку, вызывает ее воспаление, аборт.

Лабораторная диагностика. Кампилобактериоз диагностируют путем микроскопии, бактериологического и серологического исследований, постановки биопробы.

Материалом для исследования служат оболочки, желудок с содержимым, печень, селезенка, легкие, часть плаценты, слизь из шейки матки, но при отсутствии в ней гноя и крови, взятая в первые 3–4 дня после аборта или в период эструса (половой охоты), от крупных плодов – голова. От быков берут препуциальную слизь, сперму, секрет придаточных половых желез, от животных, убитых с диагностической целью, – влагалище, матку, лимфоузлы тазовой полости, для серодиагностики – влагалищную слизь, сыворотку крови. Материал посылают в лабораторию в замороженном состоянии и исследуют как можно быстрее.

Для микроскопии препараты окрашивают фуксином Циля, разведенным 1:5, 1–2 мин. В препаратах из патологического материала бактерии имеют вид запятой, летящей чайки, буквы S.

Кампилобактерии – микроаэрофилы, поэтому их культивируют в эксикаторах или анаэроштатах в течение 6–10 сут.

Жидкий материал центрифугируют при частоте вращения 1000 мин⁻¹ в течение 10 мин или фильтруют через мембранные фильтры, используя центрифугат и фильтрат для посева и заражения животных.

Биопробу ставят в основном с целью выделения чистой культуры. Используют беременных морских свинок и небеременных самок белых мышей. Заражают внутрибрюшинно или внутривлагалищно смешанной культурой в дозе 0,5 мл. После аборта делают посев из абортированных плодов. Если у морских свинок аборта нет, их убивают на 10–12-е сут после заражения и исследуют эмбрионы и полость матки. Белых мышей убивают на 3–4-е сут и делают высевы из сердца, печени, селезенки, рогов матки. При необходимости заражают беременных телок, овец подкожно или орально. Животные abortируют, если нет, то их убивают и исследуют.

Серодиагностика — при кампилобактериозе крупного рогатого скота ставят реакцию агглютинации с влагалищной слизью (РАВС), овец — с сывороткой крови. Сыворотку исследуют в РДСК или в реакции иммунофлюоресценции. Слизь берут, применяя стеклянную или эбонитовую трубку, при помощи которой во влагалище вводят тампон и оставляют на 40–60 мин. Затем тампон извлекают и помещают в пробирку с 5 мл стерильного формолизированного 3%-го раствора NaCl. Пробирку выдерживают в холодильнике при 4 °С 12–14 ч, затем тампон отжимают, жидкость центрифугируют при частоте вращения 2500 мин^{-1} 20–30 мин или фильтруют. Для постановки реакции агглютинации используют вибриозный антиген в концентрации 1 млрд микробных клеток/мл в разведении 1:9.

Серотипизацию культур проводят в реакции агглютинации капельным или пробирочным методом, используя стандартные агглютинирующие моноспецифические сыворотки, которые разводят формолизированным 3%-м раствором NaCl.

Серологический метод, применяемый в целях диагностики кампилобактериоза, является ориентировочным из-за отсутствия у исследователей единого мнения о величине диагностических титров, а в некоторых случаях с выявлением ложноположительных результатов в реакции агглютинации.

Диагноз на кампилобактериоз считают установленным при:

обнаружении морфологически типичного возбудителя в мазках из патологического материала методом люминесцентной микроскопии;

выделении из патологического материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Переболевшие животные приобретают стойкий иммунитет.

Повторных абортс у нх не региструють. Для активної профілактики применяють емульсинвакцину против кампілобактеріоза овец. Специфічних средств пассивной профілактики болезни и лечения больных животных не разработано.

Глава 33 ВОЗБУДИТЕЛЬ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА

Хеликобактериоз – инфекционная болезнь человека и животных, характеризующаяся поражением желудка и двенадцатиперстной кишки, преимущественно в виде хронических гастритов и язвы желудка.

Изучение патогенной роли отдельных спиралевидных микроорганизмов желудка в патологии желудочно-кишечного тракта за последние десятилетия позволило увеличить возможности гастроэнтерологии, раскрыть многие стороны патогенеза хронических болезней желудка и двенадцатиперстной кишки (гастрита, язв и новообразований).

Присутствие спиралевидных бактерий на поверхности и в толще слизистой оболочки желудка было открыто более века назад. Однако патогенная роль этих бактерий, первоначально классифицированных как представителей рода *Campylobacter*, долгое время не подтверждалась. Открытие роли спиралевидной бактерии *Helicobacter pylori* в развитии язвы желудка человека австралийскими учеными Б. Маршалл и Р. Уоррен в 1982 г. произвело революцию в гастроэнтерологии, за что в 2005 г. ими была получена Нобелевская премия.

H. pylori считается типовым, самым изученным и патогенным представителем достаточно многочисленной группы желудочных хеликобактер-подобных организмов (GHLO – *gastric Helicobacter-like organisms*), включающей, как минимум, 38 различных видов. Видовые названия большинства из них до сих пор не нормализованы, а их таксономическая классификация устанавливается по изучению генетических последова-

тельности рибосомальных РНК, выделяемых из различных штаммов. Тем не менее широко используются видовые названия *H. felis*, *H. bizzeronii*, *H. billis*, *H. pametensis*, изолированные из содержимого желудка собак и кошек.

Хеликобактеры относятся к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Epsilonproteobacteria*, порядку *Campylobacterales*, семейству *Helicobacteraceae*, роду *Helicobacter*.

Род *Helicobacter* по Справочнику Берджи (2009) включал 23 вида. По состоянию на 2016 г. данный род насчитывает 36 видов. Возбудителем хеликобактериоза является *H. pylori*.

Морфология. Хеликобактерии (от гр. *helix* – винт) представляют собой бактерии размером $0,5 \times 5-10$ мкм, имеющие спиралевидную форму клетки, обнаруживаются в световом микроскопе в виде палочек изогнутой, S-образной формы (рис. 33.1). При неблагоприятных условиях могут превращаться в кокковидную форму. По Граму хеликобактеры окрашиваются отрицательно. Подвижность обеспечивается жгутиками в количестве от 4 до 6, расположенных в виде пучка (лофотрихи). Спор не образуют (рис. 33.2).



Рис. 33.1. *H. pylori*, чистая культура, окраска по Граму (по А. А. Воробьеву, А. С. Быкову)

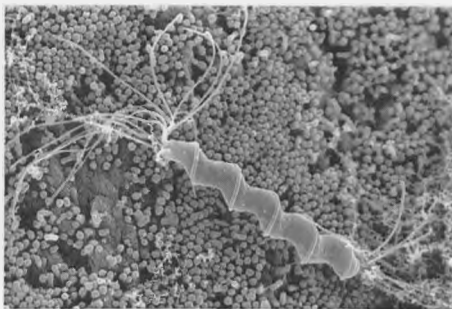


Рис. 33.2. *Helicobacter felis* в содержимом желудка собаки

Наличие жгутиков и подвижности обеспечивает бактерии отрицательный ацидофильный хемотаксис, т. е. перемещение в сторону с меньшим значением рН и внедрение в толщу слизистых оболочек, достигая эпителиальных клеток, где кислотность значительно ниже, чем на поверхности слизистой. Таким образом, жгутики рассматриваются как один из факторов патогенности микроорганизма.

Наличие хеликобактерий в препарате определяется после окраски по Граму, Романовскому—Гимзе гематоксилин-эозином, акридиновым оранжевым путем фазово-контрастной микроскопией.

Культуральные свойства. Хеликобактерии являются микроаэрофилами. Их культивирование до сих пор остается трудно разрешимой проблемой. Обязательным условием является создание микроаэрофильных условий, что достигается в основном использованием инкубатора с 5–10 % углекислого газа. Удовлетворительного роста удается достичь только после 3–4 сут культивирования. Для культивирования предложены как плотные, так и жидкие питательные среды, однако последние имеют несомненное преимущество. Состав предлагаемых сред в некоторой степени может меняться, однако в большинстве случаев в их состав входит 5 % сыворотки крови лошадей и 0,25 % дрожжевого экстракта.

Биохимические свойства. Хеликобактеры имеют ферменты гидрогеназу, используемую бактерией для окисления водорода, который продуцируют кишечные бактерии. Содержат оксидазу, каталазу и уреазу — последняя используется микроорганизмом для снижения кислотности окружающей среды путем расщепления мочевины до углекислого газа и аммиака, и именно ее определение является важным маркерным тестом для установления присутствия хеликобактерий.

Антигенная структура. *H. pylori* обусловлена сочетанием наружных липополисахаридных и белковых компонентов. Первые из них составляют структуру соматического О-антигена, а вторые являются составной частью подвижных жгутиков хеликобактерий, т. е. представляют собой Н-антиген. Наибольшее значение имеет соматический О-антиген хеликобактерий, определяющий и патогенность бактерий. Липополисахариды *H. pylori* после незначительной биохимической модификации приобретают антигенные детерминанты, сходные с групповыми антигенами клеток организма, в том числе эпителиальных клеток желудка, поэтому О-антиген выступает в роли адгезина и обеспечивает нераспознаваемость иммунной системой организма.

Мутантные штаммы, не синтезирующие компоненты О-антигена, не проявляют патогенности при экспериментальном заражении.

Патогенность. Кроме жгутиков, хеликобактерии содержат два типа адгезинов (BabA и SabA) для прикрепления к липидным и углеводным белкам эпителиальных клеток.

Кроме того, выделяемый бактериями аммиак токсичен для эпителиальных клеток аналогично некоторым протеазам, вакуолизирующему цитотоксину и фосфолипазам, также активно продуцируемым хеликобактериями.

Сочетанное действие этих факторов приводит к воспалению слизистой оболочки желудка и распаду слизистого слоя. Воспаление в значительной степени усиливается действием отдельных протеинов бактерии, богатых цистеином. Обнажение клеточного слоя слизистой оболочки при действии соляной кислоты вызывает развитие хронических, долго незаживающих язв.

Патогенез. Изучен слабо.

Лабораторная диагностика. Считается, что обнаружение *H. pylori* на поверхности слизистой не является достаточным основанием для постановки диагноза на хеликобактериоз без установления другими методами клинической патологии желудочно-кишечного тракта (пептической язвы, лимфомы, рака или хотя бы диспепсии).

Для лабораторной диагностики предпочтительным является получение биопсийного материала путем гастроскопии, при этом проводят микроскопию одним из методов в сочетании с экспресс-методом на обнаружение уреазы либо культивирование бактерии.

Доступны методы диагностики путем обнаружения антител в крови иммуноферментным анализом (ИФА), характеризующимся высокой чувствительностью (96 %) и специфичностью (79 %), а также выявления антигена *H. pylori* в фекалиях. Косвенным методом подтверждения диагноза является так называемый углерод-мочевинный тест дыхания, в котором пациент выпивает меченную радиоактивным изотопом углерода мочевины, после чего по содержанию радиоактивных изотопов в углекислом газе с выдыхаемым воздухом судят о метаболизме хеликобактериями мочевины.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет слабо изучен. Средств специфической профилактики и лечения животных не предложено.

34.1. Общая характеристика актиномицет

Актиномицеты – морфологическая группа микроорганизмов с характерным филаментозным (ветвящимся) ростом и способностью к споровому размножению.

Свойственный актиномицетам рост в виде ветвящихся форм напоминает рост микроскопических грибов, поэтому изначально они были классифицированы как грибы и получили соответствующее название (гр. *actis* – луч, *mykes* – грибы, т. е. лучистые грибы). Актиномицеты относятся к многочисленному типу *Actinobacteria* – самому разнообразному из всех известных типов бактерий, объединяющих микроорганизмы со свойственным ветвистым ростом, наподобие грибного мицелия, в последующем распадающегося на отдельные клетки бациллярной или кокковидной формы.

Актинобактерии представляют собой одну из самых ранних эволюционных линий, обособившейся в бактериальном мире около 2,7 млрд лет назад до периода оксигенации, т. е. наполнения атмосферы кислородом, поэтому среди актинобактерий известны как аэробные, так и анаэробные представители. В этой связи актинобактерии являются самыми убиквитарными, т. е. широко распространенными в природе микроорганизмами. Кроме того, актинобактерии являются продуцентами наибольшего количества известных антибиотиков, воздействие которых на бактериальный мир является одним из главных факторов в его эволюции грамотрицательных бактерий и архей из грамположительных микроорганизмов. Ранняя эволюция и обособление в бактериальном мире актинобактерий также отразилось на организации их генома. В частности, у актинобактерий отмечено высокое содержание гуанин-цитозиновых пар в структуре ДНК, а сама хромосома у некоторых представителей имеет не привычную

ти всех бактерий кольцевую, а линейную форму (роды *Gordonibacter*, *Kineococcus*, *Rhodococcus* и *Streptomyces*).

Самый разнообразный среди актинобактерий род *Streptomyces* по видовому составу составляет около 5 % всех описанных видов бактерий и одновременно является продуцентом более 70 % всех известных антибиотиков. Высокая приспособляемость актинобактерий обусловлена их способностью к симбиотическому существованию с другими организмами и их биохимической активностью, особенно способностью к разложению целлюлозосодержащего растительного субстрата.

Актиномицеты, относящиеся к типу актинобактерий, имеют все характерные для них черты и относятся к порядку *Actinomycetales*. Другие актиномицеты распределены по другим порядкам, общее количество которых в классе актинобактерий достигает 16. Все актиномицеты филогенетически очень разнообразны, однако морфологически демонстрируют характерный нитевидный рост. К числу аэробных актиномицетов, имеющих ветеринарное и медицинское значение, относят микроорганизмы родов *Nocardia*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Corynebacteria*. Наиболее важные анаэробные актиномицеты представлены родами *Actinomyces*, *Arachnia*, *Rothia* и *Bifidobacterium*.

Морфологически зрелые актиномицеты сходны с грибным мицелием, состоящим из множества нитей, подобных грибным гифам. Обычно нити актиномицет несептированные и содержат несколько нуклеоидов. Наличие нуклеоида является главным определяющим обстоятельством принадлежности актиномицет к бактериям. Толщина актиномицелярных нитей меньше, чем у гифов грибов, и имеет диаметр около 0,4–1,5 мкм. При определенных условиях актиномицелярное тело септируется на отдельные клетки размером около 20 мкм и более либо формирует споры (рис. 34.1).

Рост актиномицет представляет собой увеличение размера актиномицелярного тела (колонии) путем апикального удлинения, формирования ответвляющихся боковых нитей за счет почкования либо ее дифференциацию на субстратную и воздушную части.

Размножение актиномицет представляет собой септирование или фрагментацию актиномицелярной колонии на множество разделенных перегородками участков либо прорастание изолированной споры в субстрате. Фрагментация вегетативного тела актиномицет на сегменты наступает спустя 24–48 ч после формирования начальной микроколонии.



Рис. 34.1. Актиномицелярное тело микроорганизма *Streptomyces* с характерной для всех актиномицет морфологией, состоящее из множества нитей

Спорообразование, свойственное всем актиномицетам, проявляется в различной степени у разных представителей, например нокардиоформные актиномицеты их образуют очень редко. Количество и форма спор очень сильно варьируют среди актиномицетов, но они всегда образуются из воздушного мицелия. Некоторые актиномицеты формируют только одну спору (например, *Saccaromonospora*, *Micromonospora*), другие формируют короткие цепочки спор (например, *Actinomadura*), а третьи (большинство других актиномицетов, к примеру *Streptomyces*, *Frankia*, *Geodermatophilus*) продуцируют множество спор, заключенных в спорангии (рис. 34.2).

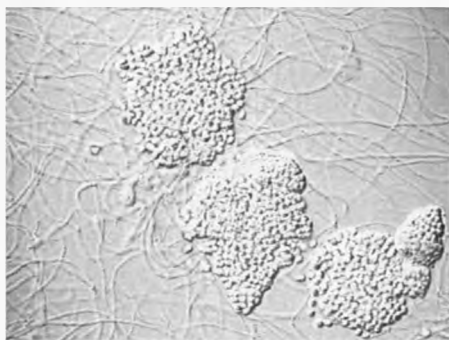


Рис. 34.2. Спорангий актиномицетов рода *Frankia*

Спорообразование актиномицет представляет собой превращение вегетативных клеток в неактивное состояние путем фрагментации и

и воляции, снижения метаболизма и изменения химического состава. Споруляция у актиномицетов в большей степени является механизмом приспособления к неблагоприятным условиям. Хотя устойчивость спор актиномицет к нагреванию невелика по сравнению с эндоспорами других бактерий, они благополучно переносят высушивание, оказавшись в благоприятных условиях, определяющим фактором которых является влажность. Спора прорастает путем образования от одной до трех ростовых трубок, давая начало новой колонии актиномицет.

Клеточная стенка актиномицет построена по бактериальному типу, иными словами, основным формообразующим веществом является пептидогликан с наличием тейхоевой и тейхуроновой кислот и полисахаридов. Пептидогликан клеточной стенки обеспечивает грамм-положительное окрашивание актиномицет, а для некоторых из них также присуща кислотоустойчивость.

Основной средой обитания актиномицет является почва, в 1 г которой нередко обнаруживается более 1 млн клеток. Характерный почвенный запах определяется летучими компонентами, выделяемыми мицелием актиномицет. Высокая приспособляемость актиномицет обеспечила их присутствие в грунте Антарктики, пустынных почвах и даже в глубине Марианской впадины.

Среди множества актиномицет известны патогенные бактерии, наиболее важными из которых являются представители родов *Nocardia*, *Corynebacteria* и *Actinomyces*.

34.2. Возбудитель актиномикоза

Актиномикоз — хроническая болезнь сельскохозяйственных, домашних и некоторых видов диких животных, характеризующаяся возникновением в различных органах и тканях гранулематозных поражений с последующим их некротическим распадом и образованием свищей. Из сельскохозяйственных животных чаще всего болеет крупный рогатый скот.

Подробное описание микроскопического гриба как вероятного возбудителя актиномикоза у крупного рогатого скота дал С. Ривольта (1868). Исследованиями О. Боллингера (1876—1877) установлена грибная природа болезни. С. Харц дал наименование возбудителю — *Actinomyces bovis*. В 1891 г. Дж. Израэлем от больных актиномикозом людей выделена чистая культура *Actinomyces israelii*.

Согласно Справочнику Берджи (2004) *актиномицеты* относятся к домену *Bacteria*, типу *Actinobacteria*, классу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales*, семейству *Actinomycetaceae*, роду *Actinomyces*.

Род включает 39 видов. Среди них *Ac. bovis* – возбудитель актиномикоза животных, редко человека; *Ac. israelii* – возбудитель актиномикоза человека; *Ac. viscosus* – редко возбудитель актиномикоза человека, изолируют при актиномикозе свиней, собак, кошек; *Ac. hordeovulneris* – обнаруживают при висцеральных абсцессах, перитонитах, артритях у собак; *Ac. naeslundii* и *Ac. odontolyticus* – редко возбудитель актиномикоза человека; *Ac. pyogenes* – обуславливает гнойные процессы у животных, в том числе маститы коров, перитониты свиней, переведен в род *Arcanobacterium*.

Морфология. Морфология клетки и тинкториальные свойства *Ac. bovis* типичны для рода. В препаратах из культур обнаруживаются грамположительные палочки, коккобактерии, палочки с утолщенными или разветвляющимися концами (рис. 34.3), могут присутствовать нити различной длины (100–600 мкм в длину и 0,5–1,2 мкм в поперечнике). В пораженных тканях животных образует друзы (зернышки желтоватого или сероватого цвета, видимые невооруженным глазом) – скопления из нескольких клеток с булавовидным утолщением на концах и расходящихся радиально из центра друзы (рис. 34.4). В центре друзы кроме густо переплетенного мицелия иногда обнаруживаются палочковидные элементы, окрашивающиеся по Граму в темно-фиолетовый цвет, концы утолщенных гиф мицелия по Граму не окрашиваются, т. е. они остаются красными. Размер друз колеблется от 20–40 до 150–320 мкм.



Рис. 34.3. *Ac. bovis*
(молодая культура)



Рис. 34.4. Скопление клеток *Ac. bovis*
(формирование друз)

Капсул возбудитель не образует, неподвижен. Размножается путем сегментации и фрагментации, с помощью спор (конидий).

Культуральные свойства. Питательные среды и условия культивирования актиномицетов подбирают с учетом отношения конкретного вида к молекулярному кислороду, потребности в сыворотке крови и некоторых ростовых факторах.

Ac. bovis — факультативный анаэроб, но в аэробных условиях без добавления CO_2 на плотных средах не растет. Культивируют возбудителя актиномикоза крупного рогатого скота на агаре Сабуро и глюкозо-кровяном агаре в анаэробных условиях. Можно выращивать возбудителя на обычном кровяном, сывороточном МПА, в МПБ, среде Кинга—Тароцци, сердечно-мозговом агаре и бульоне. Оптимальная температура культивирования — 37°C , оптимальное значение pH сред 6,9–7,0. Возбудитель растет медленно, видимый рост появляется на 15–20-е сут после посева.

На плотных питательных средах возбудитель образует выпуклые, иногда с вдавленным центром, ровным или волокнистым краем, непрозрачные, белые, серо-белые, кремовато-белые, шероховатые или гладкие, мягкие (рис. 34.5). В жидкой среде возбудитель растет в виде чернышек на дне пробирки или пушинок, состоящих из густых сплетений мицелия. На поверхности среды с течением времени образуется желтоватая морщинистая пленка. В полужидком агаре наблюдают рост в виде крупных желтовато-белых колоний. На кровяном агаре отмечают зону гемолиза.

Биохимические свойства. У актиномицетов они выражены умеренно. *Actinomyces bovis* ферментирует с образованием кислоты глюкозу, сахарозу, часть штаммов — мелибиозу, инертен по отношению к раффинозе, рамнозе, салицину, рибозе, сорбиту, трегалозе, ксилозе. Продуцирует сероводород, не гидролизует ксантин, тирозин, твин-20, 40, 60, 80, крахмал, лецитин, гиппурат, гуанин, желатин, казеин, часть штаммов гидролизует эскулин. Не разжижает свернутую сыворотку, в молоке образует кислоту, пептонизации нет. Не образует каталазу, цитохромоксидазу, не редуцирует нитраты и нитриты, тест Фогеса—Проксауэра отрицательный, с метиловым красным — положительный.

Антигенная структура. Возбудитель актиномикоза обладает соматическим антигеном, индуцирующим экссудативно-пролиферативные процессы в макроорганизме и незначительную выработку агглютинирующих, преципитирующих и комплементсвязывающих антигенов.

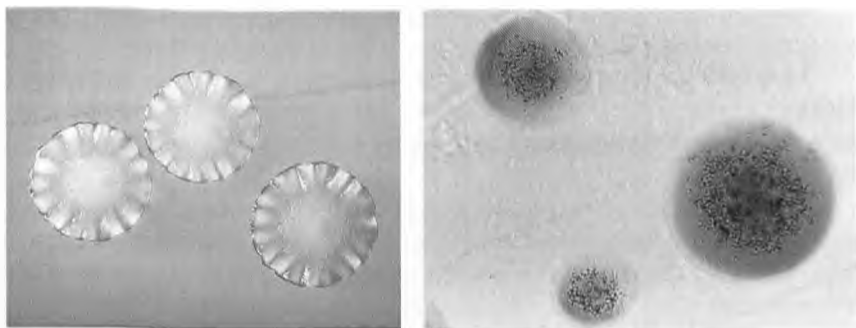


Рис. 34.5. Рост *Ac. bovis* на питательном агаре

Устойчивость. Актиномицеты широко распространены в природе. Они обитают в почве, воде, на растениях, кожном покрове и слизистых оболочках животных. Возбудитель актиномикоза весьма устойчив во внешней среде. Особенно резистентны споры. В высушенном состоянии он может не терять своей жизнеспособности в течение 9–10 лет, при низкой температуре – 1–2 года, не погибает на солнечном свете. Нагревание до 70–80 °С губит актиномицетов в течение 5 мин, кипячение – моментально. Под действием 3%-го раствора формалина они погибают в течение 5–7 мин, сулемы (1:1000) – 5–10 мин. Лучший дезинфектант – щелочной раствор формальдегида в соотношении 3:3.

Патогенность. Чаще всего актиномикозом болеет крупный рогатый скот, значительно реже свиньи, овцы, козы, лошади и другие животные. Из лабораторных животных восприимчивы птицы, кролики, молодые белые мыши, 3–4-недельные хомяки. Актиномикозом болеет человек. Факторами патогенности являются экзо- и эндотоксины (рис. 34.6).

Патогенез. В месте проникновения возбудитель актиномикоза вызывает воспалительный процесс, характеризующийся преимущественно пролиферативными явлениями. Возбудитель проникает в организм через травмы кожи, вымени, кастрационные раны, через слизистые оболочки верхних дыхательных путей, кишечника. В результате воспалительного процесса образуется плотная опухоль – гранулема. Постепенно в центре гранулемы развивается некробиотический процесс, в слизисто-гнойном содержимом находятся друзы. Если процесс прогрессирует, гнойнички вскрываются, образуются долго не заживающие свищи. Распространение возбудителя в организме может происходить по лимфатическим и кровеносным сосудам. В результате

появляются метастазы в кровеносных сосудах, периосте, костном мозге, лимфоузлах. Однако генерализация патологического процесса наблюдается редко.



Рис. 34.6. Клиническое проявление актиномикоза

Лабораторная диагностика. Актиномикоз диагностируют путем микроскопии патологического материала, выделения чистой культуры и ее идентификации. В редких случаях применяют постановку биопробы на 1–2-дневных кроликах и проводят серологическое исследование.

В лабораторию для исследования направляют гной из абсцессов, лимфоузлы, кусочки пораженных органов и тканей. В случае необходимости (отсутствия друз в патматериале) прибегают к гистологическому исследованию.

Для *Ac. bovis* характерно различие морфологии бактерий в препаратах из патологического материала и в чистой культуре. В патологическом материале отыскивают твердые, серовато-белые зернышки с желеноватым оттенком – друзы. Их промывают в дистиллированной воде и переносят на предметное стекло в каплю с 10–20%-м раствором NaOH или KOH и выдерживают в течение 15 мин или слегка подгревают над пламенем горелки. Затем в препарат вносят каплю 50%-го водного раствора глицерина, накрывают его покровным стеклом («раз-

давленная капля») и исследуют под микроскопом под малым увеличением или с помощью иммерсионной системы. Друза имеет гомогенный центр, состоящий из густо переплетенных нитевидных палочек, булавовидно-утолщающихся к периферии. В препарате, окрашенном по Граму, центр друзы приобретает фиолетовый цвет (грамположительно), а периферическая часть – розовый (грамотрицательно). Такая микроскопическая картина характерна и имеет диагностическое значение. Друзы в экссудате могут быть не всегда несмотря на наличие отдельных клеток возбудителя.

В препаратах из 10–15-дневных культур, выращенных на питательных средах и окрашенных по Граму, возбудитель имеет вид грамположительных палочек.

Если микроскопическое исследование дает положительный результат, то этого достаточно для постановки диагноза. При отрицательном результате микроскопии производят высевы на питательные среды с целью выделения культуры возбудителя.

Серологическое исследование осуществляют путем постановки реакций преципитации и агглютинации, РСК. Необходимо отметить, что серологические и аллергические методы исследования не нашли должного применения из-за их низкой специфичности.

Лабораторный диагноз считают окончательно установленным при положительном результате микроскопии и явных клинических признаках.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет при актиномикозе у животных не формируется, поэтому возможно их повторное заболевание. Обнаружение в крови животных агглютинирующих, преципитирующих и комплементсвязывающих антител не является свидетельством резистентности макроорганизма к патогену. В процессе болезни развивается гиперчувствительность замедленного типа.

Биопрепараты для активной и пассивной профилактики болезни и лечения животных не предложены.

Для лечения животных применяют оперативные методы и антибиотикотерапию. Наиболее эффективным методом лечения считают оперативное удаление актиномиком. В начале заболевания положительный результат получают при применении препаратов йода, пенициллина, стрептомицина, окситетрациклина. Антибиотики вводят непосредственно в актиномикому и вокруг нее. Кроме антибиотиков применяют сульфаниламидные препараты.

35.1. Общая характеристика микоплазм

Микоплазмы – это отдельная морфологическая группа, объединяющая в себя микроорганизмы, не имеющие внешней пептидогликановой клеточной стенки. Все бактерии данной группы объединены в класс *Mollicutes*, поэтому могут именоваться молликутами. К числу молликутов относят собственно мико-, уреа-, спиро- и ахолеплазмы, различающиеся в основном по биохимическим особенностям и химическому строению цитоплазматической мембраны, являющейся внешней мембраной для микроорганизмов этой группы.

Вместо клеточной стенки микоплазмы имеют трехслойную мембрану, цитоплазму с ядерной субстанцией, гранулами и вакуолями. Мембрана состоит из полярных липидов и протеинов. В отличие от бактериальных клеток в состав микоплазм входит стерол, составляющий до 20 % общего мембранного липида. Основным компонентом паразитических видов является свободный и этерифицированный холестерин, обеспечивающий энергию и структурную организацию клетки. Они занимают промежуточное положение между микробами и вирусами. Строение микоплазм, способность культивироваться на бесклеточных искусственных средах сближает их с микробами. Незначительные размеры, фильтруемость, способность расти на развивающихся куриных эмбрионах и культуре клеток, наличие одной молекулы ДНК с вирусами.

Микоплазмы происходят от лактобацилл, бацилл или стрептококков путем регрессивной эволюции и потери части генома, в результате чего они потеряли клеточную стенку и стали самыми маленькими свободноживущими и свободноразмножающимися организмами.

Многие признаки микоплазм свидетельствуют об их выраженном сходстве с L-формами бактерий.

Особенности микоплазм:

они не имеют ригидной клеточной стенки, что обуславливает их полиморфность;

имеют трехслойную цитоплазматическую мембрану, которая играет роль клеточной стенки;

кольцевая хромосома представлена одной молекулой ДНК;

могут размножаться почкованием, простым делением, сегментацией ветвистых и цепочных форм;

для роста нуждаются в стеринах и нативном белке;

нечувствительны к антибиотикам, угнетающим синтез пептидогликана клеточной стенки;

вызывают гемадсорбцию, гемагглютинацию и лизис эритроцитов;

на плотных средах формируют колонии, напоминающие яичницу-глазунью;

на средах с кровью некоторые виды дают α - и β -гемолиз.

По Справочнику Берджи (2010. – Т. 4) микоплазм относят к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Mollicutes*, порядку *Mycoplasmatales*, семейству *Mycoplasmataceae*, родам *Mycoplasma* (включает 117 видов) и *Ureaplasma* (включает 7 видов), порядку *Entomoplasmatales*, семейству *Spiroplasmataceae*, роду *Spiroplasma* (включает 37 видов), порядку *Acholeplasmatales*, семейству *Acholeplasmataceae*, роду *Acholeplasma* (включает 18 видов бактерий, которые по биологическим свойствам схожи с патогенами растений, называемыми фитоплазмами. Типовым видом рода *Acholeplasma* является *Acholeplasma laidlawii*).

Для большинства видов ахолеплазм этиологическая роль до конца не установлена, несмотря на то что многие из них выделены от животных: насекомых (*Ach. entomophilum*), генитального тракта морской свинки (*Ach. cavigenitalium*), взрослых лошадей (*Ach. hippikon*) или их эмбрионов (*Ach. equifetale*), фетальной сыворотки телят (*Ach. vituli*). Значительное количество видов ахолеплазм выделяют из различных источников в растительном мире: капусты (*Ach. brassicae*), пальм (*Ach. palmae*). Для некоторых видов (*Ach. oculi*) установлена этиологическая роль в развитии кератоконъюнктивитов у коз.

Acholeplasma laidlawii была выделена из сточных вод, гумуса, навоза в 1936 г. Являясь одним из наименьших представителей ахолеплазм

(мнее 0,2 мкм), *Ach. laidlawii* изолируют практически из любого источника внешней среды и представляет собой единственный молликут, способный к свободному от хозяина существованию. Высокая степень сапротрофности обусловлена наличием в микроорганизме практически всех ферментов, необходимых для метаболизма питательных веществ внешней среды.

Тем не менее *Ach. laidlawii* также изолируют от различных животных, в том числе позвоночных (млекопитающие, птицы, человек) и беспозвоночных (насекомых, моллюски). В организме млекопитающих этот микроорганизм выделяют из ротовой полости, влагалища и ран, однако его этиологическая роль остается невыясненной. Как минимум, у одного вида животных *Ach. laidlawii* способна вызывать болезнь, в частности болезнь жабр промыслового краба *Scylla serrata*.

Микоплазмы имеют очень большое значение в лабораторной практике в связи с тем, что являются самым частым контаминантом культур клеток, используемых при постановке лабораторного диагноза на вирусные и некоторые бактериальные инфекции. По общим оценкам от 15 до 35 % всех используемых эукариотических линий клеток контаминированы микоплазмами. Микоплазменная контаминация приводит к снижению жизнеспособности культуры клеток и часто к диагностическим ошибкам. Наиболее частыми контаминантами в зависимости от культуры клеток и ее происхождения являются два молликута крупного рогатого скота (*M. arginini*, *Ach. laidlawii*), два молликута человека (*M. orale*, *M. fermentans*) и один свиной молликут (*M. hyorhina*).

Спироплазмы представляют собой монофилетическую, т. е. ведущую происхождение от одного общего предка, группу в пределах класса *Mollicutes*, разделенную на три антигенно-генетических кластера. Спироплазм отличают от других молликутов наличие уникальных цитоплазматических мембранных протеинов (главным из них является белок спиралин) и архитектура цитоскелета, которые обеспечивают высокую плеоморфность и подвижность спиралевидных форм бактерий в жидкой среде без использования жгутиков.

Основным хозяином спироплазм в природе являются различные членистоногие: мухи, осы, стрекозы и др. — с единичными исключениями среди представителей растительного мира (цитрусовые, кукуруза). В организме членистоногих спироплазмы присутствуют как внутриклеточно, так и в гемолимфе, что выражается в различном патологическом действии. Установлен мутуалистический характер взаимодействия отдельных спироплазм с организмами своих хозяев.

Ветеринарное значение среди спироплазм имеют два вида — *Spiroplasma apis* и *Spiroplasma melliferum*. Первый из них вызывает так называемую майскую болезнь пчел, а второй является возбудителем болезни, описываемой как спироплазмоз пчел. Предполагают участие спироплазм в развитии так называемого синдрома краха колоний пчел, однако большинство исследований это не подтверждает. Обычно эти микроорганизмы обнаруживаются в больших количествах у пчел в весенний период и к летнему сезону практически полностью выпадают из поля чувствительности доступных серологических и микроскопических тестов, что указывает на оппортунистический характер этих инфекций.

Предположительно, патогенные для пчел спироплазмы сохраняются во внешней среде в цветках опыляемых растений, в большей степени в нектаре — секрете медовых желез растений, что подтверждено результатами выделения этих микроорганизмов в весенне-летний период. Характер и механизм сохранения спироплазм во внешней среде в межсезонный период до сих пор не определен.

35.2. Возбудители микоплазмозов

Микоплазмы являются возбудителями инфекционной болезни у животных под общим названием микоплазмоз.

Микоплазмоз — это контагиозная болезнь животных, характеризующаяся поражением верхних дыхательных путей, серозно-катаральным воспалением легких, серозных покровов, кератоконъюнктивитами, заболеваниями уrogenитального тракта, артритам у молодняка, абортатами у беременных животных, эндометритами, маститами и рождением мертвого или нежизнеспособного приплода.

Впервые этиологическую роль микоплазм в инфекционной патологии животных установили Э. Нокар, Э. Ру, А. Боррель в 1893 г. Они выделили микоплазм из плеврального экссудата крупного рогатого скота, больного контагиозной плевропневмонией.

Морфология. Микоплазмы (от гр. *mykes* — гриб, *plasma* — лепная фигура) — мелкие микроорганизмы, имеют различную величину, которая по данным различных авторов колеблется от 125 до 600 нм.

Микоплазмы исключительно полиморфные микроорганизмы. В препаратах из патологического материала и культур они могут быть округлыми, овальными, дисковидными, кольцевидными, подковообразными, овоидными, палочковидными, нитевидными, ветвистыми, звездчатыми и треугольными (рис. 35.1).

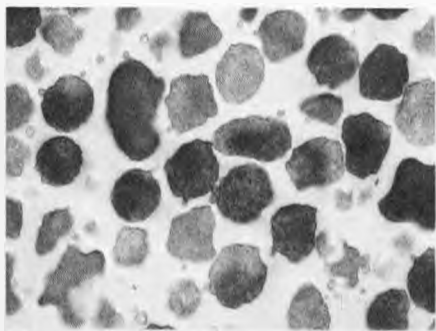


Рис. 35.1. Морфология микоплазмы *Mycoplasma mycoides* при микроскопии в трансмиссивном электронном микроскопе

Микоплазмы грамотрицательны, хорошо окрашиваются по Романовскому–Гимзе в розовый цвет, не образуют спор и капсул (за исключением некоторых видов, например *M. mycoides*), неподвижны. Некоторые виды обладают скользящей подвижностью, подобно амёбе, некоторые обладают жгутиками.

Культуральные свойства. Для своего роста, размножения микоплазмы нуждаются в полноценном белке, холестерине, рибонуклеиновой кислоте, стеринах, витаминах, минеральных солях. При культивировании микоплазм необходимо учитывать, что они весьма чувствительны к лизису под влиянием осмотического шока, алкоголя, кислот, щелочей.

Микоплазмы требовательны к составу питательных сред, поэтому в лабораторной практике применяют среды, обогащенные 20 % сыворотки крови лошади или свиньи, 10 % экстракта пивных дрожжей и 1 % глюкозы. Наиболее часто употребляют промышленные среды Фрея, Хейфлика, приготовленные в лабораторных условиях среды Мартена, Эдварда, Хоттингера и из куриного мяса.

Способы получения энергии у микоплазм разнообразны. Среди них описаны виды, получающие энергию за счет окисления или сбраживания органических соединений, а также за счет окисления неорганических соединений (железа, марганца). Описаны микоплазмы, являющиеся строгими аэробами, хотя большинство из них – факультативные анаэробы. Некоторые микоплазмы – облигатные анаэробы, погибающие в присутствии минимального количества кислорода.

Для подавляющего большинства патогенных видов микоплазм животных и человека оптимум температуры культивирования соот-

ветствует 37 °С, для птичьих штаммов — 38, уреаплазм — 36, для *Ach. laidlawii* — 30 °С. Посевы инкубируют в течение 5–10 дней. Оптимальное значение рН сред 7,4–7,8.

Практическое применение для культивирования микоплазм получила среда следующего состава: основа — перевар Хоттингера, 0,3 % NaCl, 0,5 % пептона, 0,5 % двузамещенного фосфорнокислого Na, 0,5 % глюкозы и 20 % стерильной сыворотки крови лошади.

В отличие от классических микоплазм бактерии рода *Ureaplasma* (ранее называемые Т-штаммами) очень чувствительны к щелочному значению рН. Эти микроорганизмы культивируются на питательных средах при рН от 5,0 до 8,0. Концентрация водородных ионов свыше 8,0 резко угнетает их развитие. Оптимальный уровень рН для этих бактерий равен $6,0 \pm 0,5$. Уреаплазмы, обладая уреазной активностью и используя в процессе своего развития в качестве источника энергии мочевины, образуют аммоний, который вызывает защелачивание питательной среды, резко угнетающее жизнеспособность данных микроорганизмов. В результате при выделении и культивировании уреаплазм возникает необходимость предотвращения избыточного увеличения концентрации водородных ионов. Это достигается стабилизацией рН различными буферами. Наилучшие результаты могут быть получены при использовании в качестве буфера 0,05 М М-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновой кислоты (HEPES). Его включение в питательные среды увеличивает жизнеспособность уреаплазм и стимулирует развитие на агаре более крупных колоний, что является немаловажным при изучении таких микроорганизмов.

Рост микоплазм в первичных посевах начинается на 5–7-е сут, при последующих пересевах рост можно наблюдать на 3–5-е сут.

В жидких питательных средах рост микоплазм сопровождается слабой опалесценцией. Отдельные виды образуют на поверхности среды нежную пленку, легко разбивающуюся при встряхивании. Некоторые виды дают придонный рост, адаптированные к среде культуры вызывают помутнение среды и образование осадка.

На плотных средах микоплазмы растут в виде характерных вырастающих в среду колоний трех типов: 1) наиболее часто встречающиеся, напоминающие по форме яичницу-глазунью, они вырастают в агар, имеют темный центр, более светлую периферию, зернистую поверхность (рис. 35.2); 2) сосочкообразные; 3) равномерно зернистые. Размеры колоний варьируют от 0,25 до 2 мм.

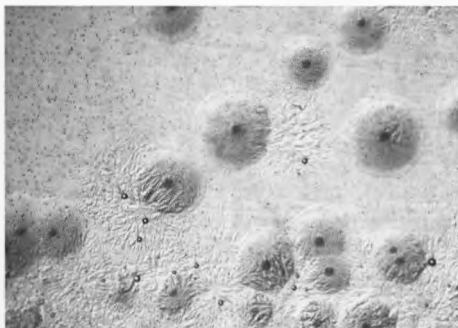


Рис. 35.2. Морфология колоний на плотной питательной среде в виде яичницы-глазуньи, характерная для большинства микоплазм

В полужидких средах микоплазмы растут по месту укола, формируют крошковатые колонии.

Выделение ахолеплазм из различных объектов необходимо проводить на питательных средах без ацетата таллия, в то время как другие микоплазмы обладают высокой резистентностью к нему.

Биохимические свойства. Микоплазмы обладают сложными ферментативными системами. Биохимические свойства их вариабельны и плохо изучены. Известно, что некоторые штаммы разлагают глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, декстрозу. Некоторые не всегда и не полностью расщепляют салицин, маннит, дульцит, лактозу и маннозу.

Представители рода *Mycoplasma* в отличие от рода *Ureplasma* не гидролизуют мочевины, нечувствительны к ацетату таллия(1), способны восстанавливать соли 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида, чувствительны к натрию полтанетолсульфонату.

В отличие от микоплазм и уреаплазм ахолеоплазмы продуцируют никотинамидадениннуклеотид и не нуждаются в холестероле.

Антигенная структура. Микоплазмы имеют сложную структуру и видовые и вариантыные различия, которые устанавливаются реакцией агглютинации, пассивной гемагглютинации, связывания компонента, ИФА, иммунодиффузии в геле и др. Основные АГ представлены фосфо- и гликолипидами, полисахаридами и белками; наиболее иммуногенны поверхностные АГ, включающие углеводы в составе сложных гликолипидных, липогликановых и гликопротеиновых комплексов. Так, вокруг мембраны *M. mycoides subsp. mycoides* находится капсула, состоящая из галактана, в котором галактоза находится

в форме фуранозы. Это вещество реагирует с рутеином красным (он связывает полианионы), а также с антисывороткой в реакции преципитации и РСК. Галактан серологически идентичен галактану клеток легких крупного рогатого скота, что является причиной аутоиммунной реакции животных при заражении данным видом и разрушения клеток легких при перипневмонии. Подобное биологическое явление называется антигенной мимикрией, т. е. сходством антигенных детерминант у микроба и организма хозяина, в результате чего микроб не распознается иммунной системой как чужеродный, что способствует его сохранению (персистенции) в организме.

Устойчивость. Во внешней среде устойчивость возбудителей микоплазмозов незначительная. Вместе с тем чувствительность микоплазм к различным физическим и химическим воздействиям характеризуется большой гетерогенностью, которая зависит от видовой принадлежности этих микроорганизмов, их происхождения, среды обитания, фазы роста и некоторых других факторов.

На кормах, предметах ухода и в стойлах возбудители агалактии мелкого рогатого скота сохраняются 2–3 нед., в почве пастбищ — не более 25 дней, в навозе — до 10, в воде — 30, в молоке — 10 дней. Высушивание, действие солнечных лучей на пастбище уничтожает возбудителей перипневмонии через 5–24 ч, в экссудате из грудной полости при температуре 4–8 °С сохраняют вирулентность до 8 сут, нагревание до 58 °С убивает их в течение часа.

Дезинфектанты в обычных концентрациях (креолин, формалин, натрия гидроксид, хлорная и свежегашеная известь) убивают возбудителей микоплазмозов в течение 3–4 ч.

Микоплазмы характеризуются высокой устойчивостью к действию низких температур. По мере повышения температуры окружающей среды их устойчивость снижается.

Патогенность. Среди микоплазм различают: 1) патогенные виды, вызывающие заболевания человека, животных, в том числе насекомых и растений; 2) условно-патогенные, вызывающие латентную, как правило, ничем не проявляющуюся инфекцию; 3) виды, ведущие сапротрофный образ жизни, патогенное действие которых неизвестно (например, микоплазмы почвы, сточных вод, выделений человека и животных, полости рта и др.).

Микоплазмы патогенны для крупного и мелкого рогатого скота, свиней, собак, кошек, кур, индеек, уток. Они могут поражать отдельные органы, системы органов и вызывать специфические болезни.

У микоплазм факторы патогенности разнообразны и могут значительно варьировать. Основные факторы — адгезины, экзо- и эндоферменты, гемолизины, различные ферменты и продукты метаболизма.

Адгезины — входят в состав поверхностных антигенов и обуславливают взаимодействие с клетками хозяина. Взаимодействие происходит по типу лиганд-рецепторных взаимодействий и имеет важное значение в развитии начальной фазы инфекционного процесса. Они способны находиться в инвагинатах клеточных мембран, что делает микоплазмы недоступными для действия антител, комплемента и прочих факторов защиты.

Экзотоксины — идентифицированы лишь у некоторых микоплазм. Нейротоксин выделяет *M. pneumoniae*, *M. neurolyticum*, *M. gallisepticum*.

Эндотоксины — выделяются у многих патогенных штаммов микоплазм. Их введение лабораторным животным вызывает пирогенный эффект, лейкопению, тромбогеморрагические поражения, коллапс и отек легких. У микоплазм выделены такие эндотоксические субстанции, как галактан, глюкан.

Гемолизины — присутствуют у некоторых видов микоплазм (наибольшей гемолитической активностью обладает *M. pneumoniae*). Большая часть видов вызывает выраженный гемолиз, обусловленный синтезом супероксидантов (O_2 , H_2O_2 и др.). Предположительно микоплазмы не только синтезируют окислительные продукты, но и индуцируют их образование в клетках, что ведет к окислению мембранных липидов.

Ферменты — многие микоплазмы синтезируют нейраминидазу, через которую осуществляется взаимодействие с поверхностными клеточными структурами, содержащими сиаловые кислоты. Кроме того, активность фермента нарушает строение клеточных мембран и межклеточные взаимодействия. В числе опасных факторов патогенности — фосфолипаза А и аминопептидаза, гидролизующие фосфолипиды клеточной стенки.

Протеазы вызывают дегрануляцию клеток (в том числе и тучных), расщепление молекул антител, другие ферменты микоплазм расщепляют незаменимые аминокислоты (в частности, аргинина), а РНКазы, ДНКазы и тимидинкиназы нарушают метаболизм нуклеиновых кислот в клетках организма. До 20 % общей ДНКазной активности сосредоточено в мембранах микоплазм, что облегчает вмешательство фермента в метаболизм клетки. Некоторые микоплазмы (например, *M. hominis*) синтезируют эндопептидазы, расщепляющие молекулы IgA на интактные мономерные комплексы.

К факторам патогенности микоплазм (например, *M. mycoides*) относится образование капсулы, гликолипиды которой токсичны для макроорганизма: они снижают фагоцитоз и блокируют иммунокомпетентную систему.

Для некоторых патогенных видов доказана первичная роль в этиологии болезней крупного и мелкого рогатого скота (контагиозная плевропневмония крупного рогатого скота, инфекционная плевропневмония коз, инфекционная агалактия овец и коз), свиней (энзоотическая пневмония), лошадей, собак, кошек, лабораторных животных, приматов, птиц (респираторный микоплазмоз птиц, инфекционный синусит индеек) и диких млекопитающих. Другие виды микоплазм встречаются как возбудители вторичных и смешанных инфекций или сопутствующих микробов при различных болезнях. Апатогенные микоплазмы могут контаминировать куриные эмбрионы и культуры клеток, что препятствует изготовлению качественных средств специфической профилактики.

В патологии животных наибольшее значение имеют:

M. mycoides subsp. mycoides — возбудитель контагиозной плевропневмонии (перипневмонии) крупного рогатого скота;

M. mycoides subsp. capri — возбудитель инфекционной плевропневмонии коз;

M. agalactiae — возбудитель инфекционной агалактии овец и коз;

M. gallinarum — возбудитель респираторного микоплазмоза (инфекционного синусита), аэросаккулитов, воспаления половых органов кур, индеек, гусей, уток;

M. synoviae — возбудитель инфекционного синовита кур и индеек;

M. hyopneumoniae — возбудитель энзоотической пневмонии свиней (*M. hyorhinis* и *M. flocculare* являются комменсалами верхних дыхательных путей у свиней и осложняют ее течение);

M. gallisepticum — обуславливает трахеит и аэросаккулит кур;

M. anatis — возбудитель воспаления респираторных органов уток;

M. gallopavonis — возбудитель синусита и аэросаккулита индеек;

M. meleagridis — возбудитель аэросаккулита, деформации костей индеек;

M. pullorum — возбудитель трахеита цыплят;

M. bovine genitalium — возбудитель мастита, воспаления мочеполовых органов крупного рогатого скота;

M. bovoculi — возбудитель кератоконъюнктивита телят;

M. suis (син. *Eperythrozoon suis*) — возбудитель эспиритрозооноза свиней;

Ur. diversum — вызывает у крупного рогатого скота хроническую пневмонию (особенно у молодняка) и поражения гениталий, у свиней — снижение оплодотворяемости, возможны аборт, у кур — хроническое воспаление респираторного тракта, у индеек — препятствует оплодотворению яиц.

Перипневмония (плевропневмония, повальное воспаление легких) — контагиозный микоплазмоз крупного и мелкого рогатого скота, характеризующийся экссудативным поражением легких с выраженным серозным воспалением междольчатых перегородок, серозно-фибринозным плевритом, скоплением в грудной полости большого количества экссудата и образованием инкапсулированных очагов в легких, длительное время содержащих возбудителя.

Инфекционная агалактия овец и коз — контагиозная болезнь, характеризующаяся преимущественным поражением молочной железы, суставов и глаз. У беременных животных наступают аборты.

Респираторный микоплазмоз — инфекционная болезнь кур и индеек, характеризующаяся поражением органов дыхания и хроническим течением. Переболевшие птицы являются пожизненными носителями возбудителя, а при снижении резистентности становятся источником инфекции микоплазм.

Энзоотическая пневмония свиней — инфекционная хроническая энзоотическая болезнь свиней всех возрастов, проявляющаяся ремиттирующей лихорадкой, лобарной катаральной пневмонией, воспалением серозных покровов, сухим кашлем, отставанием в росте и развитии поросят, а при осложнениях — прогрессирующим исхуданием, нарушением воспроизводительной функции у свиноматок, снижением продуктивности при откорме.

Эperyтхрозоноз (eperythzoonosis suis) — кровопаразитарная болезнь свиней всех возрастов, протекающая остро или хронически, характеризующаяся желтушностью, анемией, затрудненным дыханием, слабостью, лихорадкой, сыпью на коже, некрозами ушных раковин, отставанием в росте и развитии.

Патогенез. Микоплазмы — мембранные паразиты и способны адсорбироваться на различных эукариотических клетках. Этому способствует подвижность патогенных микоплазм, связанная с хемотаксисом и наличием микроворсинок. Микоплазмы способны тесно связываться с мембранами эукариотической клетки, вступать в межмембранное взаимодействие, обмениваться мембранными компонентами (в том числе использовать холестерин и стенолы для пос-

троения собственных клеток), оказывать разнообразное влияние на клетки.

Возбудители перипневмонии крупного и мелкого рогатого скота попадают в организм животного в основном аэрогенным путем. Они обладают выраженным тропизмом к легочной ткани. Микоплазмы вызывают воспаление легких, застойные явления, эмболию кровеносных и лимфатических сосудов. Образуются обширные очаги некроза легочных долей с последующей секвестрацией. При этом нарушается газообмен, деятельность сердечно-сосудистой, центральной нервной и выделительной систем, печени и других органов.

При инфекционной агалактии возбудители проникают в кровь, разносятся по организму, вызывают воспалительные процессы в разных органах. Затем с током крови разносятся по всему организму.

При респираторном микоплазмозе птиц микоплазмы проникают в клетки эпителия и ткани респираторных органов, вызывают воспалительные процессы и дистрофические изменения.

Возбудители энзоотической пневмонии свиней, проникнув в легкие аэрогенным путем, в течение первых 2 нед. после заражения активно размножаются на слизистой оболочке трахеи, бронхов и бронхиол, вызывая образование очажков серозно-катаральной бронхопневмонии. Через 3 нед. они постепенно проникают в более глубокие части дыхательных путей и в альвеолы.

Наступающая лимфоидно-моноцитарная инфильтрация в стенках альвеол и интерстициальной ткани вызывает сжатие альвеол и сужение бронхов, препятствующие нормальному дыханию. В это время начинают появляться первые клинические признаки болезни. Воспаление чаще развивается в вентилируемых участках — по краям верхушечных долей легких в виде лобулярной пневмонии, чаще с правой стороны, что обусловлено топографией регионарных лимфатических узлов. Пораженные участки эпителиальных клеток слизистой оболочки становятся восприимчивыми к воздействию других видов микоплазм, бактерий, стрептококков, а иногда риккетсий и вирусов. В сочетании между собой, а также с возбудителями гельминтозов они обуславливают развитие смешанной или вторичной инфекции и инвазии, утяжеляя тем самым патологический процесс и ускоряя течение болезни.

В результате ослабления резистентности организма и усиления секундарной микробиоты патологический процесс на последних стадиях болезни может перейти в лобарную катарально-гнойную и даже гнойно-некротическую или фибринозную пневмонию. Легкие часто

генализированы. Вначале гипоксию может компенсировать учащение дыхания, а при охвате значительных участков легких наступает декомпенсация, проявляющаяся сердечной недостаточностью, одышкой и слабостью, что в конечном счете приводит к истощению животных, появлению в стаде заморышей и их гибели.

Эритрозооны обладают тропизмом к эритроцитам, тромбоцитам и лейкоцитам. Развивается аутоиммунная гемолитическая анемия, ассоциированная с холодовой агглютинацией. Присутствие микроорганизмов в плазме приводит к микроагглютинации эритроцитов в тех частях тела, где ниже температура, в частности на ушах, хвосте и конечностях. Болезнь протекает остро или хронически, характеризуется желтушностью, анемией, затрудненным дыханием, слабостью, лихорадкой, некрозами, отставанием в росте и развитии.

Лабораторная диагностика. Микоплазмы диагностируют путем микроскопического, бактериологического и серологического исследований и постановки биопробы.

При жизни от больных животных материалом для исследования служат бронхиальная слизь, секрет молочной железы, молоко, синовиальная жидкость из пораженных суставов, выделения из пораженных глаз, плевральный экссудат, кровь или сыворотка крови.

При гибели животных материалом для исследования являются кусочки пораженных легких, взятых на границе со здоровыми, средостенные и бронхиальные лимфатические узлы, участки печени, сердца, селезенки, почки, вымени, пораженный глаз, сердце, экссудат грудной полости, трахея (трахеальный экссудат), стенки воздухоносных мешков, головной мозг, трубчатая кость, свежие трупы птиц или живая птица с явными клиническими признаками, не подвергавшаяся лечению антибиотиками.

Для подавления роста сопутствующей (посторонней) микробиоты приготовленную суспензию из органов на питательном бульоне центрифугируют при частоте вращения 1000 мин⁻¹ или же фильтруют через асбестовые и мембранные фильтры. С той же целью к центрифугату, фильтрату или непосредственно в питательную среду вносят ингибиторы — ацетат таллия(I) (на 100 мл питательной среды добавляют 0,5 мл 10%-го раствора ацетата таллия(I) на дистиллированной воде) и пенициллина из расчета 1000 ЕД/мл.

Обработанный материал высевают на обычные среды для исключения роста посторонней микробиоты и на специальные среды для выращивания микоплазм.

Из присланных образцов патологического материала делают препараты, окрашивают по Романовскому–Гимзе, микроскопируют.

В мазках-отпечатках, окрашенных краской Романовского–Гимзы, при диагностике инфекционной агалактии овец и коз, перипневмонии крупного и мелкого рогатого скота, респираторном микоплазмозе птиц в положительных случаях обнаруживают мелкие полиморфные образования кокко-, ните- и кольцевидной форм, окрашенные в розовый цвет.

Возбудитель энзоотической пневмонии свиней – *Mycoplasma hyorhynchitidis* по культурально-морфологическим и ферментативным свойствам имеет сходство с другими микоплазмами. Морфологически характеризуется выраженным полиморфизмом; грамотрицателен, хорошо окрашивается по Романовскому–Гимзе. В мазках-отпечатках из легких имеет вид кокков, кольцеобразных и сферических образований.

Для лабораторной диагностики эперитрозооза свиней нужна сыворотка крови или цельная кровь, стабилизированная гепарином или другим антикоагулянтом. Возбудитель болезни в мазках-отпечатках – полиморфен, может иметь округлую, овальную, палочковидную, гантелевидную, кольцевидную формы, может встречаться в виде запятой и иметь зернистость. Размер бактерий – от 0,2 до 2 мкм, у скоплений – от 1,0 до 2,5 мкм. В препаратах из крови бактерии лежат индивидуально или цепочкой на внешней оболочке эритроцита и могут находиться внутри эритроцита (рис. 35.3). При лихорадочном состоянии можно обнаружить свободно лежащие бактерии.

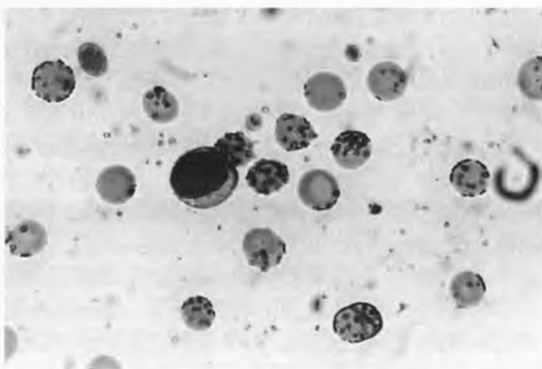


Рис. 35.3. *M. suis* (син. *Eperhytrozoon suis*) внутри пораженных эритроцитов, окраска по Романовскому–Гимзе

Эперитрозооны паразитируют на эритроцитах, тромбоцитах, лейкоцитах и имеют в мазках крови, окрашенных по Романовскому—Гимзе, вид нежных розоватых или розовато-фиолетовых полиморфных образований. По Здродовскому эперитрозооны окрашиваются в розово-красный цвет.

У патогенных видов микоплазм отсутствуют многие биосинтетические компоненты, в связи с чем их культивируют в специальных средах, содержащих сыворотку крови или ее компоненты, имеющих фактор роста, идентифицированный как липопротейн (это стирол, включающий различные аминокислоты), экстракт сердечной мышцы, пептонный, дрожжевой экстракты, а также компоненты мембранных липидов или их предшественников.

В качестве питательных сред для культивирования возбудителя перипневмонии чаще всего используют мартеновский мясопептонный бульон и агар с 10–15 % сыворотки крупного рогатого скота или лошади и глюкозы (1–2 %), рН среды 7,4–8,0; добавление 10 % свежего дрожжевого экстракта стимулирует рост. Используют также жидкую среду Эдварда (к отвару сердца крупного рогатого скота добавляют 1 % пептона, 20 % сыворотки лошади, крупного рогатого скота, свиней, птиц, 10 % дрожжевого экстракта с рН 8,0).

Посевы инкубируют при температуре 37–38 °С. В жидкой среде рост проявляется через 2–3 дня легкой опалесценцией и образованием незначительного мелкозернистого осадка. На плотных средах *M. pleuropneumoniae* растет в виде круглых росинчатых колоний с ровными краями и более темным, врастающим в среду центром (типичный для микоплазм рост, колонии напоминают яичницу-глазунью). Величина колоний колеблется от 10 до 600 мкм.

На кровяном агаре возбудитель перипневмонии формирует зону гемолиза. Для стимуляции роста микоплазм на искусственных питательных средах рекомендуется провести 3–5 последовательных слепых посевов (пассажей) культуры на жидкой среде (через каждые 5–6 сут). После последнего пассажа производят пересев культуры на плотные агаровые среды. Микроорганизм для роста нуждается в стеринах. Не растет при 22 °С в отличие от ахолеплазм. Возбудитель перипневмонии культивируется на РКЭ.

Возбудитель перипневмонии разлагает с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, маннозу, декстрин, галактозу, левулезу, фруктозу и крахмал; мочевины не гидролизует. Обладает протеолитическими свойствами. Образует сероводород. Этот микроорганизм

редуцирует хлористый тетразолий. Колонии микоплазм, обладающих способностью редуцировать тетразол, в течение часа приобретают характерный синий цвет (уреаплазмы дают отрицательный результат).

Выделить культуру *M. agalactiae* можно лишь при условии доставки совершенно свежего материала, не обсемененного посторонней микробиотой. В жидких питательных средах рост появляется через 5–6 дней, на плотных – через 10–12 дней в виде одиночных, очень мелких колоний. Часто в первичных посевах рост не регистрируется, поэтому необходимо проводить не менее пяти последовательных пассажей.

M. agalactiae не сбраживает глюкозу и сахарозу, не образует сероводород и индол, не гидролизует аргинин, быстро восстанавливает метиленовый синий, обладает активным липолитическим действием, о чем свидетельствует образование на яичной среде пленки и пятен. На плотной среде в анаэробных условиях восстанавливает тетразолий, обладает гемолитической активностью, продуцирует фосфатазу, не разжижает свернутую сыворотку, не развивается на питательных средах без сыворотки и при температуре 25 °С.

M. gallisepticum успешно культивируется на питательных средах, обогащенных сывороткой крови животных и дрожжевым экстрактом. Репликацию усиливают при добавлении к средам гемоглобина, эритроцитов, глюкозы или мальтозы. Для изоляции культуры возбудителя из патологического материала пассируют его на питательных средах не менее 5 раз с интервалом 5 сут. На жидких средах рост характеризуется опалесценцией или нежным равномерным помутнением, на полужидких – образованием хлопкообразного облака. На плотных средах образуются мелкие, круглые, бесцветные колонии, различимые невооруженным глазом или при 30–60-кратном увеличении.

Ферментативная активность выделенных культур исследуется на сывороточных жидких, полужидких питательных средах (обогащенный бульон Мартена или Эдварда, рН 7,8–8,0), к которым добавляется 0,002 % фенолового красного и 0,5 % одного из необходимых углеводов (глюкоза, сахароза, мальтоза, декстрин) и 1 % раствор индикатора Андресе. В каждую пробирку засеивается по 0,5 мл 72-часовой бульонной культуры.

Ферментативная активность и протеолитические свойства микоплазмы незначительны, биохимические свойства в больших диапазонах варьируют у разных штаммов. *M. gallisepticum* ферментирует глюкозу, маннозу, не гидролизует аргинин, желатин и казеин, не обладает фосфатазной активностью, редуцирует тетразол в аэробных и анаэ-

робных условиях, не образует пленки и пятен, не разжижает свернутую сыворотку крови.

M. hyopneumoniae растет на бесклеточных и клеточных средах, но отличается медленным ростом (10–30 сут) и высокой требовательностью к составу питательных сред. Возбудитель на агаре формирует мелкие колонии без центрального уплотнения. Они вырастают в агар всей поверхностью. Для выделения микоплазм используют также 5–6-дневные куриные эмбрионы.

M. hyopneumoniae ферментирует глюкозу, не гидролизует аргинин, не продуцируют фосфатазу, слабо образуют пленки и пятна, не разжижает свернутую сыворотку.

С учетом культуральных, морфологических, питательных и биохимических особенностей культуру микоплазм ориентировочно относят к соответствующему роду и виду. Однако окончательно ее идентифицируют лишь с помощью серологических методов.

Из серологических методов в диагностике микоплазмозов нашли применение следующие реакции: агглютинации (РА), связывания комплемента (РСК), задержки (угнетения) роста (РЗР), гемагглютинации (РГА), задержки гемагглютинации (РЗГА), торможения непрямо́й (косвенной) гемагглютинации (РТНГА), задержки (угнетения) метаболизма (РЗМ), агглютинации с латексом (латекс-РА), иммунодиффузии (РИД), иммуноферментный анализ (ИФА) и др.

При диагностике микоплазмозов также используется молекулярно-генетический метод – полимеразная цепная реакция (ПЦР), метод гибридизации рРНК микоплазм с флюоресцентно-мечеными зондами.

Биопробу при перипневмонии ставят на телятах 6–8-месячного возраста, которых заражают подкожно в области подгрудка легочной лимфой или экссудатом павшего животного в дозе 5–10 см³. При положительном результате телята гибнут на 15–18-й день.

При агалактии мелкого рогатого скота биопробу ставят на лактирующих козах и козлятах. Коз и овец заражают в молочную цистерну. Для этого в молочный канал вводят свежесыведенную бульонную культуру, жидкость из суставов в дозе 5–10 см³ подкожно или в сустав. Для этой цели можно использовать козлят или ягнят 1–2-месячного возраста, которых заражают бульонной культурой или другим жидким материалом, содержащим микоплазмы. Заражение проводят подкожно в дозе 5–10 см³. Гибель козлят и ягнят через 2–14 сут считают положительным результатом. Возбудитель патогенен для кроликов – вве-

дение 3—4-суточной культуры в переднюю камеру глаза на 5—12-е сут вызывает кератит.

При респираторном микоплазмозе кур и индеек биопробу ставят на 9-суточных куриных или индюшиных эмбрионах, которых заражают в аллантоисную полость культурой микоплазм или суспензией из патологического материала в дозе 0,1 см³, обработанной пенициллином или ацетатом таллия(1). При гибели 50 % эмбрионов пробу признают положительной. К культуре чувствительны цыплята и индюшата 20—30-дневного возраста.

При эперитрозоозе свиней биопробу ставят на поросятах 2—4-месячного возраста. Поросят инфицируют кровью или переливанием крови от больного животного здоровому. Клинические признаки заболевания проявляются через 3, максимум через 4 нед. Биопробу считают положительной при характерной клинической картине и обнаружении возбудителя микроскопическим методом. При биохимическом исследовании сыворотки крови отмечают повышенную концентрацию билирубина и гепатоспецифических ферментов: аланин- и аспаратаминотрансфераз вследствие гепатотоксического воздействия на печень метаболитов возбудителей болезни.

Лабораторные животные к *M. hyopneumoniae* невосприимчивы. Постановку биопробы проводят на поросятах 2—2,5-месячного возраста из хозяйств, благополучных по энзоотической пневмонии свиней.

Лабораторный диагноз на микоплазмоз считают установленным при:

выделении из патологического материала культуры со свойствами, характерными для соответствующего возбудителя микоплазмоза и гибели зараженных ею животных, с последующей реизоляцией возбудителя из их органов;

гибели хотя бы одного из зараженных животных исходным материалом и выделении из его органов культуры, характерной для определенного вида микоплазм, если даже в посевах из исходного материала возбудителя не было выделено.

Диагноз на эперитрозооз свиней считают установленным в одном из следующих случаев:

обнаружение микроскопическим методом в мазках крови клинически больных животных эперитрозоонов с характерной морфологией и тинкториальными свойствами;

обнаружение специфических антител в РСК, ИФА;

идентификация возбудителя в ИФА или ПЦР.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет при микоплазмозе изучен недостаточно. Эффективных специфических средств лечения не разработано. С лечебной целью рекомендуют использовать сыворотку крови реконвалесцентов. Для активной профилактики микоплазмозов используют живые и инактивированные вакцины.

Распространение микоплазмоза можно успешно предупреждать мерами общей профилактики. Этими же мерами снижают остроту проявления эпизоотического процесса в эпизоотических очагах.

Глава 36. ВОЗБУДИТЕЛИ ХЛАМИДИОЗОВ

36.1. Общая характеристика хламидий

Хламидии — отдельная морфологическая группа микроорганизмов, объединяющая бактерии с внутриклеточным паразитизмом и особым двухфазным жизненным циклом.

Хламидиоз животных — контагиозная инфекционная болезнь, характеризующаяся ринитом, бронхопневмонией, гастроэнтеритом, полиартритом, кератоконъюнктивитом, энцефаломиелитом, эндометритом, задержанием последа, маститом, абортами, рождением нежизнеспособного приплода. У мужских особей наблюдаются орхиты, баланопоститы, эпидидимиты.

Многообразие клинического проявления хламидиоза свидетельствует о том, что хламидии поражают весь организм. Интенсивность и сочетаемость клинических признаков болезни зависят от возраста животных, иммунобиологического состояния организма, влияния факторов внешней среды.

Первые научные исследования хламидиозов относят к 1892–1895 гг., когда была установлена роль попугаев в заражении людей. Изучением пситтакоза (орнитоза) птиц занимались Т. Левингаль и К. Мейер. Последний в 1942 г. выделил хламидий — возбудителей орнитоза птиц.

Хламидии впервые были обнаружены С. Провачеком и Г. Гальбершдеттером в 1907 г., которые для возбудителей хламидиозных инфекций предложили название «*Chlamydozoon*» (от лат. *Chlamydia* – мантия) – хламидозоа, поскольку в клетке-хозяине они обволакиваются как мантией веществом, продуцируемым клеткой.

В 1966 г. в соответствии с Международным кодексом номенклатуры бактерии этой малоизученной группы микроорганизмов было присвоено название хламидии.

Эволюция хламидий имеет общее родство с другими прокариотами. По-видимому, обособление древнейших хламидий от остальных бактерий началось примерно 2 млрд лет назад, т. е. одновременно с появлением первых эукариотических клеток. Все известные хламидии имеют общего предка, существовавшего в биосфере приблизительно 700 млн лет назад, задолго до появления большинства их современных хозяев. К этому времени предшественник современных хламидий окончательно обособился в бактериальном мире и приобрел характерные отличительные черты: внутриклеточный паразитизм и двухфазный цикл размножения.

Наличие в геноме хламидии генов, специфичных растительному миру, указывает на возможное эволюционное родство с предками цианобактерий и хлоропластов клеток. В процессе эволюции хламидии утратили большую часть своего генома, в основном гены, кодирующие метаболические ферменты. Результатом такой редукции генома стал переход хламидий к эндосимбиотическому, а затем паразитическому существованию с эукариотической клеткой. Современные хламидии являются паразитами большого количества хозяев: от амёб до млекопитающих.

Для всех хламидий характерен редуцированный по сравнению с другими бактериями геном (не более 1000 открытых рамок считывания по сравнению с более чем 4000 у кишечной палочки). Приблизительно две трети генома хламидий кодируют общие для многих видов белки, что отражает их общее эволюционное происхождение. Межвидовые различия в геноме хламидий прослеживаются в так называемой пластичной зоне, кодирующей в основном факторы вирулентности хламидий – цитотоксин, перфорин клеточной мембраны, фосфолипазу D и др. Всего хламидии способны синтезировать большое количество факторов вирулентности, для кодирования которых занято около 10 % генома.

Жизненный цикл хламидий представляет собой смену двух альтернативных фаз – элементарного и ретикулярного тел (рис. 36.1).

Элементарные тела рассматриваются как внеклеточная фаза существования хламидий и характеризуются относительной устойчивостью к воздействию внешних факторов. Высокая резистентность элементарного тела хламидий во многом обусловлена особой композицией протеинов клеточной стенки, стабилизированных дисульфидными мостиками и часто называемых наружным мембранным комплексом. Считалось, что элементарные тела биохимически неактивны, хотя современный анализ установил их высокий биохимический потенциал и активность, источником энергии для которой является D-глюкоза-6-фосфат. В составе элементарных тел обнаружены протеины, необходимые для катаболизма глюкозы и других биохимических реакций, инициирующих метаболическую активность хламидий после проникновения внутрь клетки-хозяина и последующую дифференциацию элементарного тела в *ретикулярное*.



Рис. 36.1. Элементарные и инициальные тельца хламидий в мазке из плаценты abortировавшей коровы, окраска по Стемпу, объектив 90

Во время такой дифференцировки наружный мембранный комплекс распадается, что обеспечивает большую гибкость стенки хламидий. Ретикулярные тела хламидий специализируются на потреблении питательных веществ и репликации. В них отмечают высокую экспрессию протеинов, ответственных за синтез АТФ, транспорт органических молекул и синтез белков. Возможно, хламидии могут использовать АТФ, извлекаемый из клетки, что указывает на альтернативные пути получения энергии для различных фаз развития хламидий. Всего они извлекают и утилизируют большое количество органических веществ, однако способны синтезировать и некоторые собственные компоненты, в частности липиды.

36.2. Систематическое положение хламидий

Систематика хламидий за последнее время подвергалась нескольким ревизиям, наиболее существенная из которых произошла в 1999 г. В частности, на основании генетического анализа к единственному семейству *Chlamydiaceae* были добавлены еще три других, включавших в себя хламидии беспозвоночных животных. В свою очередь род *Chlamydia*, включающий хламидии позвоночных животных, был разбит на два рода – к одноименному роду был добавлен род *Chlamydophila*. С получением детальных данных геномного анализа такое деление на два рода значительной частью научного сообщества не поддерживается.

Благодаря развитию методов генетического анализа от домашней птицы, голубей и ибисов в последнее время были идентифицированы атипичные штаммы хламидии, претендующие на роль новых видов: в частности *Ch. ibidis sp. nov.*, *Ch. avium sp. nov.* и *Ch. gallinacea sp. nov.*

Согласно Справочнику Берджи (2010. Т. 4) все хламидии относятся к домену *Bacteria*, типу *Clamydiae*, классу *Clamydiae*, порядку *Chlamydiales*, семейству *Chlamydiaceae*, роду *Chlamydia*.

В соответствии с современной классификацией род включает девять видов: *Ch. suis*, *Ch. psittaci*, *Ch. pneumoniae*, *Ch. pecorum*, *Ch. muridarum*, *Ch. felis*, *Ch. caviae*, *Ch. abortus*, *Ch. trachomatis*.

Генетический анализ хламидий позволил установить их тесное эволюционное родство. Филогенетическое древо хламидий представлено на рис. 36.2, указывающем на то, что эволюция хламидий взяла свое начало от одного общего предка и развивалась по двум эволюционным ветвям. Одна самостоятельная эволюционная ветвь привела к появлению в биосфере четырех родственных между собой хламидий: *Ch. caviae*, *Ch. felis*, *Ch. abortus*, *Ch. psittaci*. (На рисунке не представлен вид *Ch. suis* из-за отсутствия его полногеномного анализа.) До сих пор таксономическая позиция этих хламидий остается до конца не выясненной. Некоторые авторы относят их к другому роду – *Chlamydophyla*. Близкое эволюционное родство хламидий отразилось на самом широком спектре их патогенности и возможности расширять свою экологическую нишу за счет инфицирования человека.

Различные виды хламидий способны инфицировать сразу несколько видов животных. Из девяти видов хламидий восемь (за исключением *Ch. trachomatis*) имеют ветеринарное значение.

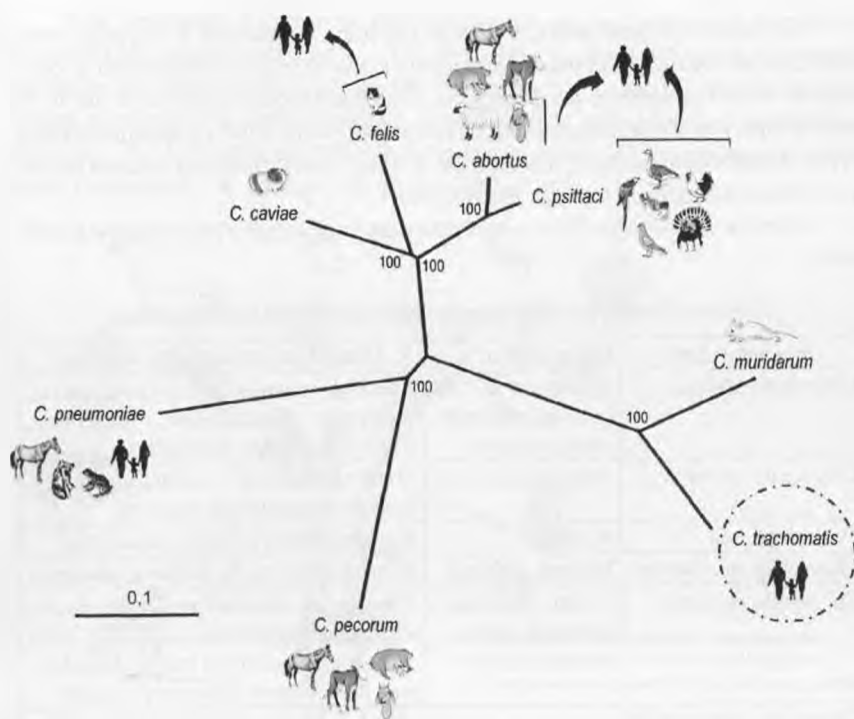


Рис. 36.2. Филогенетическое дерево современных хламидий (по A. Nunes et al.)

Ch. psittaci является наиболее ранее изученным видом хламидий. Вызываемая им болезнь была впервые описана в 1879 г. Я. Риттером в виде пневмонии у человека после его заражения от попугаев. Наиболее тяжелой была вспышка пситтакоза в конце 1929 г., приведшая к смерти 112 человек, вскоре после чего вызывающий его микроорганизм был выделен и идентифицирован. *Ch. psittaci* широко распространен в животном мире. Первичный его хозяин — различные виды птиц, из числа которых по разным данным микроорганизм был обнаружен у 470 видов пернатых. Вызываемая им болезнь у попугаевых называется пситтакоз, а остальных птиц — орнитоз.

Кроме птиц, *Ch. psittaci* широко выделяют от млекопитающих. Наиболее часто им поражается человек; у животных его часто изолируют в бессимптомных случаях (у крупного и мелкого рогатого скота, свиней, лошадей, коала и нильского крокодила).

Ch. abortus представляет собой патоген, опасный в первую очередь для мелкого рогатого скота, инфекция которого приводит к развитию энзоотического аборта овец. По общим оценкам от 44 до 56 % всех аборт овец в европейских странах обусловлено инфекцией овец этим микроорганизмом, а более 60 % маточного овцепоголовья являются серопозитивными к возбудителю.

Спектр патогенности зоопатогенных хламидий представлен в таблице.

Таблица. Патогенность зоопатогенных хламидий для животных

Вид хламидий	Основной хозяин	Описание вызываемой болезни
<i>Chlamydia abortus</i>	Крупный и мелкий рогатый скот, свиньи	Аборты, вагиниты, эндометриты, васкулит семенников, маститы, часто латентные инфекции
<i>Chlamydia caviae</i>	Морские свинки	Фолликулярный конъюнктивит, интерстициальный кератит
<i>Chlamydia felis</i>	Кошки	Конъюнктивит часто с ринитом
<i>Chlamydia muridarum</i>	Мыши, хомяки	Пневмонии, часто латентный илеит
<i>Chlamydia pecorum</i>	Овцы, крупный рогатый скот, свиньи, коала	Энцефалит, полиартрит, пневмония, вагинит, эндометрит, энтерит у овец и крупного рогатого скота; полиартрит, пневмония, энтерит у свиней
<i>Chlamydia pneumoniae:</i> <i>Biovar koala</i> <i>Biovar equine</i>	Коала Лошади	Ринит, пневмония Ринит
<i>Chlamydia psittaci</i>	Птицы	Системные, часто латентные респираторные и кишечные инфекции
<i>Chlamydia suis</i>	Свиньи	Конъюнктивит, пневмония, энтерит, полиартрит

Хламидиозные инфекции у разных видов животных могут быть обусловлены несколькими возбудителями. У крупного рогатого скота хламидиоз может быть вызван инфицированием следующими видами хламидий: *Ch. pecorum*, *Ch. abortus* и *Ch. psittaci*, причем частота выделения того или иного вида зависит от топографии и места выделения, а также от пола животного, например *Ch. psittaci* чаще изолируют в биоматериале из половых органов, а *Ch. pecorum* — из фекалий.

У мелкого рогатого наиболее опасной считается хламидиозная инфекция, вызванная *Ch. abortus*. Кроме того, овцы могут также могут быть инфицированы *Ch. pecorum*.

Для человека основным патогеном из числа хламидий является антропоспецифический вид — *Ch. trachomatis*, вызывающий главным образом урогенитальный хламидиоз и поражения глаз. Кроме того, человек может быть инфицирован некоторыми зоопатогенными видами (рис. 36.3). Наибольшую опасность для человека представляют три вида хламидий: *Ch. psittaci*, *Ch. felis* и *Ch. abortus*.



Рис. 36.3. Антропозооопасный потенциал различных видов хламидий для человека (по Vlahović et al.)

Вид хламидий *Ch. felis* включает в себя все изоляты, выделяемые от кошек. Этот вид способен вызывать клиническую форму болезни у домашних кошек, характеризующуюся острым и хроническим конъюнктивитом по всему миру. Этот вид изолируют от владельцев домашних кошек, однако его патогенность для человека до конца не определена, хотя установлена возможность развития фолликулярного конъюнктивита у человека, функциональных расстройств печени, эндокардита и гломерулонефрита при заражении данным видом хламидий.

Вид *Ch. pneumoniae* изначально рассматривался как специфичный для человека микроорганизм, однако в последнее время изолирован от лошадей, коала и других животных, включая амфибий и рептилий. У человека *Ch. pneumoniae* считается первичным патогеном респираторного тракта, вызывая острый и хронический бронхит и пневмонию. Инфицирование человека этим видом хламидий имеет положительную корреляцию с развитием других патологических состояний

неинфекционного характера у человека: болезни Альцгеймера, артериосклероза, внезапной остановки сердца. Этот микроорганизм рассматривается как один из наиболее широко распространенных в биосфере видов хламидий, так как антитела к нему имеются более чем у 40 % людей во всем мире. Несмотря на одновременную циркуляцию вида *Ch. pneumoniae* как у человека, так и у животных, человеческие и животные изоляты рассматриваются как разные биовары, и возможность его антропозоонозной передачи окончательно не установлена.

Вид *Ch. pecorum* был изолирован только от некоторых видов млекопитающих: крупного и мелкого рогатого скота, коала и свиней. Он считается наименее вирулентным, вместе с тем способен вызывать развитие патологических изменений в репродуктивном тракте, конъюнктивита и полиартрита. Низкая вирулентность *Ch. pecorum* не позволяет ему проникать в кровяное русло, т. е. этот вид не вызывает генерализованные инфекции.

36.3. Биологические свойства хламидий

Хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами шаровидной или овальной формы, неподвижны, спор и капсул не образуют, грамтрицательны.

Морфологически элементарные тела (ЭТ) представляют собой округлые спороподобные образования диаметром 0,25–0,3 мкм с ригидной клеточной стенкой (отсюда родовое название хламидий, гр. *chlamyd* – плотная оболочка), содержащие геном микроорганизма, часто с дополнительным присутствием плазмиды, фермент РНК-полимеразу, необходимую для инициации репликации хламидии внутри клетки, и рибосомы. После контакта с клеткой элементарного тела индуцирует свое проникновение в клетку путем эндоцитоза, во многом подобного вирусной пенетрации. Внутри цитоплазмы ЭТ присутствуют в особой вакуоли, называемой включением. Обычно такое включение содержит от 100 до 1000 элементарных тел.

Оказавшись внутри клетки-мишени, элементарное тело дифференцируется в биохимически активное ретикулярное тело, обычно морфологически большее по размеру (до 0,6 мкм), хотя и не имеющее клеточной стенки. Ретикулярные тела хорошо выявляются внутри цитоплазмы при окраске йодными красителями в виде сетчатых внутриклеточных включений (рис. 36.4).



Рис. 36.4. Внутриклеточные включения, содержащие ретикулярные тела *Chlamydia trachomatis*, в культуре клеток McCoy

Ретикулярные тела представляют собой реплицирующуюся путем многократного бинарного деления форму существования хламидий и не имеют инфекционности. На завершающем этапе размножения вокруг ретикулярного тела формируется клеточная стенка и оно дифференцируется обратно в элементарное тело. Впоследствии внутриклеточное включение разрушается вместе с лизисом инфицированной клетки и хламидии оказываются в форме элементарных тел в межклеточном пространстве.

Долгое время оставался дискуссионным вопрос о наличии в структуре клеточной стенки хламидий пептидогликана — ключевого компонента в построении клетки всех прокариот. Биохимические методы не выявляли его присутствия, хотя в геноме хламидий имеются гены, кодирующие ферменты для его синтеза. Современные методы подтвердили наличие у хламидий пептидогликана, что подтверждает их общую с бактериями эволюцию.

Хламидии имеют сложный биологический цикл развития. Морфогенез хламидий складывается из следующих этапов:

- 1) адсорбция ЭТ на оболочке клетки и их фагоцитоз;
- 2) трансформация элементарных телец (инфекционных) в ретикулярные (инициальные);
- 3) деление ретикулярных (инициальных) телец с образованием промежуточных форм хламидий;
- 4) созревание промежуточных форм хламидий до элементарного тела.

Элементарные тела считаются высокоинфекционной, а ретикулярные — неинфекционной формой хламидий. В биохимическом от-

ношении хламидии проявляют максимальную активность в состоянии ретикулярного тела. Особенности жизненного цикла хламидий и трудности их изучения на стадии ретикулярного тела. Тем не менее анализ генома хламидий указывает на их принадлежность к анаэробной группе бактерий, так как основным источником углерода для них является глутарат и, возможно, глюкоза и 2-оксиглутарат, что подтверждается кодированием геномом соответствующих ферментов. Кроме того, геном хламидий кодирует все необходимые для гликолиза ферменты, за исключением фермента фруктозы-1,6-дифосфата альдозы, возможно, замещаемой в процессе получения энергии другой альдозой. Установлено, что цикл Кребса у хламидий не является полным, так как их гены не кодируют три начальных фермента цикла трикарбоновых кислот (цитратсинтаза, аконитаза и изоцитратдегидрогеназа).

Фильтруемость и внутриклеточный паразитизм сближает хламидии с вирусами. Однако от вирусов они отличаются тем, что:

- хламидии содержат оба вида нуклеиновых кислот — РНК и ДНК, а вирусы — одну кислоту;

- содержат рибосомы, отсутствующие у вирусов;

- хламидии чувствительны к антибиотикам тетрациклинового ряда, пенициллину, сульфаниламидам, что несвойственно вирусам;

- микроорганизм имеют клеточную оболочку, состоящую из муравьиной кислоты, в то время как для вирусов свойственно неклеточное строение;

- хламидии размножаются в клетке бинарным делением, для вирусов характерны совершенно другие принципы репродукции;

- отсутствие у хламидий генетических взаимодействий с геномом клетки, которое часто имеет место у вирусов;

- хламидии грамтрицательны, хорошо окрашиваются при использовании других методов: по Маккиавелло, Стемпу, Морозову и др.

По биологическим свойствам хламидии близки к другим микроорганизмам с внутриклеточным паразитизмом — риккетсиям, однако они отличаются по следующим признакам:

- у хламидий уникальный двухфазный цикл развития, что несвойственно риккетсиям;

- хламидии в отличие от риккетсий не содержат цитохрома;

- у хламидий инфекционностью обладают только элементарные тела, для риккетсий свойственна инфекционность всех форм;

- хламидии расположены внутри клеток в особых вакуолях, а риккетсии размножаются повсюду внутри клетки;

хламидии не передаются членистоногими, что является очень ярким признаком риккетсий.

Культивирование. Поскольку хламидии размножаются только внутри живой клетки, их культивирование возможно только в живой тест-системе, их культивируют в развивающихся куриных эмбрионах, лабораторных животных и культуре клеток.

Антигенная структура. Сложная и недостаточно изученная. Штаммы, выделенные от птиц, имеют гемагглютинирующий антиген. Считают, что хламидии имеют родо- и видоспецифический антиген.

Устойчивость. Хламидии относительно устойчивы во внешней среде. Хорошо сохраняются при низких температурах. В воде остаются жизнеспособными до 17 дней, в непастеризованном молоке — 23 дня. Ультрафиолетовые лучи инактивируют хламидий в течение 3–4 мин. Губительно действуют на хламидии 2–3%-й раствор натрия гидроксида, 3%-й раствор фенола, 2–3%-й раствор формальдегида и др.

Патогенность. Обусловлена тремя главными факторами патогенности. Одним из них является родоспецифический липополисахарид, общий для всех хламидий в пределах рода *Chlamydia*, который одновременно выступает в роли комплементсвязывающего антигена и также индуцирует воспалительную реакцию в организме. Патогенность микроорганизма обеспечивается и фактором повышения активности протеазы хламидий, который позволяет микроорганизму избегать распознавания Т-лимфоцитом. Еще одним важным фактором патогенности хламидий является секреторный аппарат типа III, который способствует образованию пор в мембране вакуоли, где размножаются хламидии, и поступлению других патогенных факторов в клеточную цитоплазму.

Хламидии патогенны для многих видов сельскохозяйственных животных (крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота, свиней), диких животных, домашних и диких птиц (чаще болеют утки, гуси, индейки, реже — куры), болеет и человек. Из лабораторных животных чувствительны белые мыши, морские свинки, кролики.

У человека хламидии способны вызывать сразу несколько форм болезни, из которых наиболее распространен урогенитальный хламидиоз — самая часто регистрируемая болезнь из инфекционных болезней, передающихся половым путем (ИППП). Данная болезнь характеризуется поражением мочеполового тракта, обычно малосимптомным течением, но возможно и развитием тяжелых последствий, в частности бесплодия. Основной путь передачи при этой инфекции — половой

контакт, хотя возможен и контактно-бытовой путь. Восприимчивость к этой болезни очень высокая и по оценкам медиков около 50 % мужчин и женщин земного шара инфицированы возбудителем уrogenитального хламидиоза.

Трахома — антропонозная инфекция, передается от человека человеку контактным путем, характеризуется поражением конъюнктивы и роговицы глаз, приводит к слепоте.

Венерический лимфогранулематоз — характеризуется поражением половых органов и регионарных лимфоузлов, так как возбудитель обладает лимфотропностью. Инфекционный период составляет от 3 до 30 дней. Клиническими признаками поражения при данной болезни являются появление на наружных половых органах папул, эрозий и язвочек.

У животных хламидиоз проявляется более разнообразно, что зависит от вида животного, а также от вида хламидии, который вызывает инфекционный процесс. У животных хламидиоз может протекать остро, подостро и хронически. Различают респираторную, артритную, кишечную, генитальную, энцефаломиелитную и кератоконъюнктивальную формы хламидиоза. Болезнь чаще протекает энзоотически, что обеспечивается частым субклиническим течением инфекции у некоторых животных и делает полную ликвидацию инфекции в поголовье труднодостижимой.

Источником хламидий являются больные и переболевшие животные, а также животные с бессимптомным течением инфекции: у них хламидии могут сохраняться и выделяться во внешнюю среду годами. Заражение возможно различными путями: аэрогенно, алиментарно, половым путем, конъюнктивально. В передаче и распространении инфекции играют роль грызуны, птицы, которые являются резервуаром хламидий.

Патогенез. При попадании в половые пути хламидии локализуются в эпителиальных клетках слизистой оболочки. В период беременности бактерии размножаются в плацентарной ткани, вызывают плацентит, дистрофические и некротические изменения, аборт.

В период генерализации инфекции хламидии с током крови попадают во многие органы, лимфоузлы, селезенку, печень, почки, тимус, суставы, ткани глаз и вызывают их поражение. Это говорит о политропности хламидий. Механизм действия хламидий на клетки изучен плохо. Хламидиозы часто осложняются бактериальными и вирусными инфекциями.

Лабораторная диагностика. При постановке лабораторного диагноза на хламидиоз ветеринарные работники лаборатории должны принимать во внимание патогенность хламидий для человека. Наибольшую опасность представляет патологический материал от птиц в связи с высокой патогенностью хламидии *Ch. psittaci* для микробиолога, а также материал, отбираемый у овец в случае абортирования и кошек с признаками конъюнктивита.

Материалом для исследования служат фекалии, соскобы с конъюнктивы, гениталий, которые берут от больных и подозреваемых в заболевании животных. От абортировавших животных берут кровь дважды: в период клинического проявления болезни и второй раз — спустя 14–21 день после первого взятия крови, получают сыворотку и отправляют в лабораторию. Можно направлять кусочки плаценты, влагалищную слизь, абортированные целые плоды или же их органы и желудок. От павших и вынужденно убитых животных берут кусочки семенников, головной мозг, пораженные суставы. От самцов направляют в лабораторию пробы эякулята, сперму.

Современная лабораторная диагностика хламидиоза включает большой выбор диагностических средств, в частности такие методы, как микроскопический, выделения и культивирования хламидий, серологический метод, идентификации антигена хламидий в патологическом материале и молекулярно-генетический (ПЦР — полимеразная цепная реакция).

Микроскопический метод заключается в обнаружении хламидий в исследуемом материале с помощью световой и люминесцентной микроскопии. При окраске по Стемпу хламидии ярко-красного цвета, а цитоплазма клеток окрашивается в бледно-зеленый цвет, по Маккиавелло, хламидии принимают рубиново-красную окраску, а клеточная цитоплазма светло-синяя. Окраской по Романовскому—Гимзе хламидии выявляются в виде темно-фиолетовых микроорганизмов, в то время как цитоплазма окрашивается в фиолетово-голубой цвет.

При люминесцентной микроскопии тельца хламидий флюоресцируют ярко-зеленым светом, их промежуточные формы могут флюоресцировать от темно-соломенного до оранжевого света. Подобные структуры обнаруживают как внутри, так и вне клеток.

Выделение хламидий из патологического материала является самым трудоемким диагностическим методом из-за сложностей культивирования хламидий. Материал для изоляции хламидии должен

быть только свежесобраный, сохраняемый при 0–4 °С не более 24 ч. Выделение микроорганизма проводят на РКЭ, лабораторных животных, также используют культуру клеток. Для заражения КЭ из патологического материала готовят 10–20%-ю суспензию на изотоническом растворе (рН 7,2–7,4), центрифугируют при частоте вращения 2000 мин⁻¹. Надосадочную жидкость обрабатывают пенициллином (100 ЕД/мл), стрептомицином (500 ЕД/мл), гентамицином (150 мкг/мл) и используют для заражения тест-объекта.

Пробы спермы, эякулята, влагалищной слизи применяют в неразведенном виде или разводят 1:2 физраствором, а также обрабатывают антибиотиками. Высевы материала делают в МПБ, на МПА, среду Китта–Тароцци для исключения бактериального загрязнения.

Развивающиеся куриные эмбрионы шести- и семидневного возраста заражают в желточный мешок в дозе 0,2 мл, используя не менее шести эмбрионов. Их гибель в течение 72 ч считают неспецифической. При отсутствии гибели эмбрионы вскрывают и проводят следующий пассаж. Производят не менее трех последовательных пассажей, используя для заражения центрифугат 10%-й суспензии желточных мешков.

Погибшие на 4–12-й день эмбрионы вскрывают. Аллантоисную жидкость проверяют на бактериальную загрязненность путем посева на обычные среды. Из желточных мешков делают препараты и микроскопируют. Результат считают положительным, если в мазках-отпечатках из желточных мешков эмбрионов, погибших на 4–12-й день, в любом из трех последних пассажей обнаружены хламидии.

У лабораторных животных хламидии выделяют путем внутрибрюшинного, интраназального, интрацеребрального или интраторакального заражения белых мышей и морских свинок, хотя наиболее приемлемым является внутрибрюшинный способ заражения. Мышам вводят 0,3 см³, морским свинкам – 0,5 см³ 10%-й суспензии патологического материала. Лабораторные животные гибнут на 5–10-е сут, а в случае выживания их убивают. Из паренхиматозных органов делают 10%-ю суспензию, которой заражают новую партию белых мышей или морских свинок. Необходимо провести не менее трех последовательных пассажей. Результат считают положительным, если обнаруживаются хламидии в любом из трех последующих пассажей.

На клеточных культурах хламидий выделяют реже, так как не всегда можно наблюдать ярко выраженный цитопатический эффект. На 3–4-е сут культивирования на культуре клеток можно обнару-

жить цитоплазматические включения. Для выявления хламидий и включений монослой окрашивают по Стемпу, Маккиавелло, Романовскому—Гимзе или используют другие методы идентификации антигена.

Серологическое исследование основано на обнаружении специфических антител в сыворотке крови. Постановка лабораторного диагноза на хламидиоз сочетает в себе быстроту и простоту постановки, а также высокую специфичность получаемого результата. Для выявления антител применяют РСК или РДСК, ИФА и непрямой РИФ.

Тем не менее при серодиагностике хламидиоза следует принимать во внимание некоторые обстоятельства. Иммунный ответ при данной болезни вырабатывается с небольшой задержкой, поэтому наиболее приемлемым временем отбора сыворотки крови является пик или предпочтительно завершение инфекционного процесса. При постановке диагноза на хламидиоз серологическим методом в случае проявления репродуктивной патологии получение достоверных результатов возможно только у животных со сроком беременности более 3 мес. в связи с низкими темпами размножения хламидий в клетках половой системы. Кроме того, следует учитывать длительный характер сохранения специфических антител в крови, поэтому их обнаружение в сыворотке может свидетельствовать о предыдущем характере инфекции. Самым главным недостатком серологического метода исследования является непостоянный характер обнаружения специфических антител: считается, что их достоверное выявление наблюдается только в 60 % случаев инфицирования или хламидио-выделения у животных.

Наиболее часто используемой реакцией для серодиагностики хламидиоза является реакция связывания комплемента. При ее применении следует учитывать родоспецифический характер обнаруживаемых антител, так как в качестве антигена используется липополисахарид хламидий, общий для всех хламидий.

Иммуноферментный анализ основан на использовании более специфических антигенов хламидий (в частности, главный наружный мембранный протеин или полиморфный наружный мембранный протеин), поэтому этот метод отличается от РСК большей чувствительностью и специфичностью.

При идентификации антигена хламидий в патологическом материале задействованы в основном серологические способы идентификации — РИФ или ИФА.

Молекулярно-генетический метод диагностики основан на идентификации генов хламидий в исследуемом материале (в частности, гена 16SrRNA хламидий), что обеспечивает высокую специфичность метода.

Диагноз на хламидиоз считают установленным при:
выделении возбудителя из исследуемого материала;
обнаружении возбудителя в исследуемом материале и получении положительных результатов исследований на хламидиоз сывороток крови от этих же животных;

нарастании титра антител в 2 раза и более при исследовании сывороток крови абортировавших животных.

При первичной постановке диагноза в хозяйстве выделение возбудителя обязательно. В дальнейшем при оздоровлении хозяйства больных и переболевших животных выявляют по РСК и РДСК.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Иммунитет формируется у абортировавших животных и у телят, переболевших хламидиозной бронхопневмонией. У птиц иммунитет кратковременный, не предохраняющий от реинфекции. С целью активной вакцинации испытан ряд вакцин для профилактики аборта крупного рогатого скота и свиней. Однако практического применения они не нашли. Для лечения больных телят используют сыворотку реконвалесцентов и антибиотики тетрациклинового ряда.

Глава 37. ВОЗБУДИТЕЛИ РИККЕТСИОЗОВ

37.1. Общая характеристика риккетсий и сходных с ними бактерий

Риккетсиозы — группа болезней многих видов животных и человека, вызываемых внутриклеточными паразитами (риккетсиями), которые передаются в основном трансмиссивно и проявляются у животных лихорадками, пневмониями, ринитами, абортами и

послеродовыми эндометритами, а также поражением лимфатической системы и форменных элементов крови.

Риккетсии названы в честь американского микробиолога Г. Т. Риккетса, открывшего в 1909 г. возбудителя одного из риккетсиозов — пятнистой лихорадки Скалистых гор и умершего после выделения возбудителя сыпного тифа при исследовании причин возникновения эпидемии данной болезни в Мехико (1910).

Риккетсии — условная морфологическая группа микроорганизмов, характеризующихся обязательным внутриклеточным паразитизмом, первичным хозяином которых являются членистоногие животные.

Ветеринарный интерес изучения риккетсий обусловлен тем, что некоторые представители риккетсий и риккетсиеподобных микроорганизмов в качестве вторичного хозяина способны инфицировать высших позвоночных животных, в том числе человека и вызывать развитие у них болезней.

Методами ретроспективного генетического анализа установлено, что естественным хозяином для древних представителей риккетсий были только членистоногие животные, однако около 150 млн лет назад часть из них расширила свой спектр патогенности, приобретая способность инфицировать других представителей животного мира — некоторых протист и позвоночных животных. Тем не менее естественный спектр патогенности риккетсий исторически включает членистоногих животных.

До детального изучения микроорганизмов, принадлежащих к риккетсиозной морфологической группе, все они считались как относящиеся к одной филогенетической группе. При дальнейшем изучении их биологических и генетических особенностей многие из них были реклассифицированы. Тем не менее совокупность инфекций, вызываемых данными микроорганизмами, до сих пор называется риккетсиозами, а вся морфологическая группа бактерий называется риккетсиями.

Все риккетсии формируют отдельную морфологическую группу микроорганизмов, занимающую переходную позицию между бактериями и вирусами. Согласно современной классификации все эти микроорганизмы относятся к классу *Alphaproteobacteria*, поряд-

ку *Rickettsiales*, семейству *Rickettsiaceae*. Внутри данного семейства присутствует несколько родов, один из которых имеет историческое название — род *Rickettsia*. Некоторые другие микроорганизмы, первоначально считающиеся риккетсиями (представители родов *Ehrlichia*, *Wolbachia* и др.), относятся к другому генетически близкому семейству — *Anaplasmataceae*.

Отдельные микроорганизмы данной морфологической группы (различные виды рода *Bartonella*) были выведены из порядка *Rickettsiales* и отнесены к другому порядку — *Rhizobiales*.

Возбудитель Ку-лихорадки, одной из наиболее значимых инфекций животных, исторически относящийся к риккетсиям, после детального генетического анализа был вообще перенесен в другой класс гаммапротеобактерий и сейчас относится к порядку *Legionellales*, семейству *Coxiellaceae*.

Таким образом, риккетсии представляют очень разнородную условную группу микроорганизмов, объединяемых по некоторым общим свойствам: обязательному внутриклеточному паразитизму и распространению в природе через основного хозяина — организм членистоногого животного, а все болезни позвоночных животных, которые являются для них вторичным хозяином, условно объединяют термином «риккетсиозы».

В соответствии с родовой и видовой принадлежностью возбудителя большую часть болезней, вызываемых патогенными риккетсиями, подразделяют на группы: болезни, вызываемые эрлихиями, — эрлихиозы, коудриями — коудриозы, неориккетсиями — неориккетсиозы, анаплазмами — анаплазмозы, бартонеллами — бартонеллезы и др.

Большинство микроорганизмов, относящихся к группе риккетсий, принадлежат к домену *Bacteria*, классу *Alphaproteobacteria*, порядку *Rickettsiales*.

Порядок *Rickettsiales* в свою очередь разделен на три семейства, два из которых (*Rickettsiaceae*, *Anaplasmataceae*) содержат микроорганизмы, считающиеся риккетсиями. Семейство *Rickettsiaceae* включает в себя наибольшее число микроорганизмов-риккетсий, в частности некоторые виды трех родов (*Rickettsia*, *Orientia*, *Wolbachia*). К семейству *Anaplasmataceae* относятся несколько родов, два из которых включают микроорганизмы-риккетсии (*Ehrlichia*, *Neorickettsia*).

Микроорганизмы бартонеллы относятся к другому порядку внутри класса альфапротеобактерий. Их текущее систематическое поло-

жение следующее: домен *Bacteria*, класс *Alphaproteobacteria*, порядок *Rhizobiales*, семейство *Bartonellaceae*, род *Bartonella*.

Отдельные микроорганизмы, традиционно относящиеся и часто до сих пор считающиеся риккетсиями, имеют совершенно другое систематическое положение. К таким бактериям относят возбудителя Ку-лихорадки (*Coxiella burnetii*). Настоящее систематическое положение этого микроба следующее: домен *Bacteria*, класс *Alphaproteobacteria*, порядок *Legionellales*, семейство *Coxiellaceae*, род *Coxiella*.

Таким образом, микроорганизмы, традиционно считающиеся риккетсиями, представляют собой очень разнородную группу и занимают различное систематическое положение, подвергающееся постоянной ревизии. Бартонеллы и коксиеллы по объективным таксономическим признакам уже не могут считаться риккетсиями, однако традиционное их отнесение к данной морфологической группе во многом имеет историческое обоснование.

37.2. Морфология и биологические свойства риккетсий

Морфология. Все микроорганизмы, относящиеся к числу риккетсий, морфологически являются грамтрицательными неподвижными, часто плеоморфными коккобациллами, которые плохо окрашиваются по Граму. Характерной морфологической особенностью является их окрашивание в красный цвет по методам Гимзы и Хименеса (рис. 37.1).

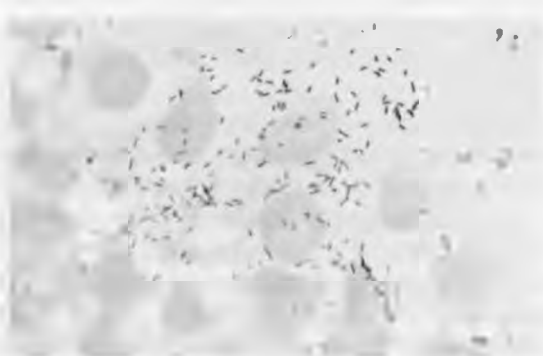


Рис. 37.1. *Rickettsia conorii*

Биологические свойства. Риккетсии занимают промежуточное положение между бактериями и вирусами, во многом аналогичны по биологическим свойствам хламидиям. Основными особенностями риккетсий, имеющими сходство с прокариотическими микроорганизмами, являются следующие:

- наличие трехслойной клеточной стенки;
- содержание двух типов нуклеиновых кислот, рибосом и системы дыхания, сходной с прокариотами;
- способность к окраске анилиновыми красителями;
- чувствительность к антибиотикам тетрациклинового ряда, сульфаниламидам, а в некоторых случаях – к широкому спектру антибиотиков.

Основными особенностями риккетсий, обеспечивающими их сходство с вирусами, являются следующие:

- обязательный внутриклеточный паразитизм;
- фильтруемость через бактериальные фильтры;
- необходимость для культивирования только живой системы (РКЭ, культуры клеток, организм лабораторных животных);
- наличие тканевого тропизма;
- отсутствие строгой хозяиноспецифичности;
- стимуляция выработки интерферона в инфицированном организме.

Общие сравнительные характеристики риккетсий с другими биологическими объектами представлены в табл. 37.1.

Для микроорганизмов порядка *Rickettsiales* свойственны следующие особенности: плеоморфизм, неподвижность, грамтрицательное окрашивание, неспособность к культивированию в бесклеточных средах, патогенность для многих видов сельскохозяйственных животных, человека и членистоногих, невысокая устойчивость во внешней среде (кроме *Cox. burnetii*), особая чувствительность к антибиотикам тетрациклинового ряда.

Антигенная структура. Обусловлена белковым поверхностным слоем, называемым S-слоем, составляющим около 10–15 % всех риккетсиозных белков по массе. Поверхностный белковый слой имеет SPA-антигены двух видов: гOmpA и гOmpB, определяемые у нескольких видов риккетсий.

Устойчивость. Риккетсии являются малоустойчивыми к разным условиям окружающей среды: при нагревании до 50 °С они погибают уже спустя 10 мин, а до 80 °С – в течение одной минуты. К воздействию низких температур они являются более устойчивыми, что способствует

сохранению своей жизнеспособности и вирулентности. Большинство риккетсий чувствительны к антибиотическим веществам широкого спектра действия, особенно к антибиотикам тетрациклинового ряда.

Таблица 37.1. Сравнительная характеристика прокариотных микроорганизмов и вирусов

Дифференцирующий признак	Бактерии	Микоплазмы	Риккетсии	Хламидии	Вирусы
Размер до 0,5 мкм		+	+/-	+	+
Клеточная оболочка	+	-	+	+	-
Два типа нуклеиновых кислот (ДНК и РНК)	+	+	+	+	-
Ядро без ограничивающей мембраны	+	+	+	+	-
Бинарное деление	+	+	+	+	-
Рибосомы прокариотного типа	+	+	+	+	-
Окраска анилиновыми красителями	+	+	+	+	-
Рост на искусственных питательных средах	+	+	-	-	-
Рост в живой клетке (РКЭ, КК, организме лабораторных животных)	-	+	+	+	+
Ингибирование антибиотиками и сульфаниламидами	+	+	+	+	-/+
Образование внутриклеточных включений в пораженной клетке	-	-	-	+	+
Наличие в биологическом цикле членистоногих	-	-	+	-	+/-

Примечание. -/+ — чаще не отмечается; +/- — чаще отмечается.

Патогенность. Микроорганизмы, относящиеся к морфологической группе риккетсий, способны вызывать большое количество инфекций, часто объединяемых под термином «риккетсиозы». Тем не менее к данной группе инфекций относят как истинные риккетсиозы, вызываемые риккетсиями и генетически близкими им микроорганизмами (анаплазмоз, эрлихиоз и др.), так и инфекции, вызываемые некоторыми другими внутриклеточными микроорганизмами-паразитами, исторически считающиеся риккетсиями (Ку-лихорадка).

Многие бактерии данной группы способны вызывать болезни, опасные не только для животных, но и для человека. Многие из них являются причиной зооантропонозных инфекций, общих для человека и животных (табл. 37.2).

Таблица 37.2. Наиболее важные микроорганизмы-рикетсии, вызывающие зооантропозные болезни

Возбудитель	Вызываемая болезнь у человека	Первый хозяин (позвоночное животное)	Резервуар (членистоногое животное)	Пути передачи
<i>Bartonella elizabethae</i>	Эндокардит (синдром хронической усталости)	Норвежская крыса (<i>R. norvegicus</i>)	Неизвестно (предположительно эктопаразиты крыс)	Неизвестно (предположительно эктопаразиты крыс)
<i>Bartonella henselae</i>	Лихорадка кошачьих царапин, эндокардит, бациллярный ангиоматоз, бациллярный пелиоз	Домашние кот и собака	Неизвестно (кошачья блоха)	Укусы кошек, царапины кошек
<i>Bartonella quintana</i>	Классическая траншейная лихорадка, городская траншейная лихорадка, эндокардит, бациллярный ангиоматоз, бациллярный пелиоз	Человек	Человеческая вошь	Экскременты вшей
<i>Coxiella burnetii</i>	Ку-лихорадка, хронический эндокардит	Мелкий рогатый скот, коровы, домашняя кошка, заяц-беляк	Различные виды клещей	Аэрозольно, алиментарно
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Моноцитозный эрлихиоз человека	Белохвостый олень (<i>O. virginianus</i>), енот (<i>Procyon lotor</i>), опоссум (<i>D. virginiana</i>)	Иксодовый клещ (<i>A. americanum</i>)	Укусы клещей
<i>Anaplasma phagocytophila</i>	Гранулоцитозный эрлихиоз человека	Мышь (<i>P. leucopus</i>), другие малые млекопитающие	Черноногий клещ (<i>I. scapularis</i>)	То же
<i>Rickettsia felis</i>	Инфекция агентом ELB	Норвежская крыса, домашняя кошка, опоссум	Кошачья блоха (<i>Ctenocephalides felis</i>)	Блошинный укус
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Пятнистая лихорадка скалистых гор	Мелкие млекопитающие	Клещи Dermacentor (<i>D. variabilis</i> , <i>D. andersoni</i>)	Укус клеща
<i>Rickettsia typhi</i>	Эндемический тиф	Крыса, опоссум, домашняя кошка	Крысиная блоха (<i>Xenopsylla cheopis</i>), кошачья блоха	Блошинный укус

К числу риккетсиозов, имеющих наибольшее ветеринарное значение, относят эрлихиоз, Ку-лихорадку и анаплазмоз. Кроме того, отдельные риккетсии являются агентами некоторых других полиэтиологических болезней, в частности инфекционного кератоконъюнктивита, вызываемого главным образом отдельными видами микоплазм и хламидий с участием других микроорганизмов: родов *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, а также риккетсий (в частности, *Rickettsia (Colesiota) conjunctivae*, систематическое положение которой до конца не установлено).

Эрлихиоз — инфекционная болезнь человека и некоторых животных, в большей степени собак, при которой поражаются белые кровяные клетки и сопровождается общим угнетением, увеличением лимфоузлов, затрудненным дыханием, отеками конечностей. Хроническое течение эрлихоза имеет более тяжелое течение, включая частые периоды лихорадки, кровотечения, анемию, параличи, судороги, воспаление суставов и другие признаки (рис. 37.2). У собак эрлихиоз вызывается двумя микроорганизмами рода *Ehrlichia* — *E. canis* и *E. ewingii*. Резервуаром возбудителя являются два вида клещей, паразитирующих у собак: *Rhipicephalus sanguineus* и *Amblyomma americanum*.



Рис. 37.2. Кожная сыпь у собаки при хроническом эрлихиозе

Анаплазмоз — трансмиссивная болезнь крупного и мелкого рогатого скота, а также других домашних и диких животных, протекающая остро или хронически с признаками остро выраженной анемии, перемежающейся лихорадкой, нарушением работы сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта.

Основными возбудителями, имеющими ветеринарное значение, являются *Anaplasma marginale* и *Anaplasma centrale* (крупный рогатый скот), *Anaplasma ovis* (мелкий рогатый скот), *Anaplasma phagocytophilum* (собаки, кошки, лошади).

Ку-лихорадка — природно-очаговая зооантропонозная болезнь домашних, промысловых и диких млекопитающих и птиц, чаще протекающая бессимптомно, характеризующаяся развитием ринита, бронхита, пневмонии, конъюнктивита, плеврита, мастита (у самцов орхита), а также абортами.

Возбудителем Ку-лихорадки является микроорганизм *Coxiella burnetii*, иногда называемый риккетсиями Бернета. Представляет собой плеоморфный микроорганизм с преобладанием кокко- и палочковидных форм, шириной 0,2–0,4 мкм и длиной 0,4–1 мкм, реже нитевидной формы до 10–12 мкм; расположен одиночно, попарно, иногда короткими цепочками.

Патогенез. На клеточном уровне в основном связан с попаданием риккетсий внутрь клеток путем внутриклеточного эндоцитоза. Для прикрепления к клеткам-мишеням риккетсии используют адгезины, являющиеся наружными мембранными протеинами. В дальнейшем внутриклеточной пенетрации способствуют другие факторы патогенности риккетсий: фосфолипаза D и гемолизин C, которые разрушают мембрану лизосом, препятствуя лизису микроорганизма и обеспечивая высвобождению риккетсий в содержимое цитоплазмы. Оказавшись внутри клетки, они репродуцируются в клеточной цитоплазме.

Органотропные патологические изменения при многих риккетсиозах в основном связаны с поражением эндотелия капилляров различных органов, что сопровождается увеличением проницаемости сосудов, нарушением осмотического баланса в тканях и иногда диссеминированной внутрисосудистой коагуляцией.

Лабораторная диагностика. Риккетсиозы в основном диагностируются по результатам микроскопического исследования, выделения риккетсий на чувствительных тест-объектах или серологической диагностики.

Объектами лабораторного исследования при жизни животного могут быть кровь, взятая из яремной вены (2–1,5 мл), клещи, собранные с животных, на пастбище, мелкие зверьки, грызуны (полевки, крысы) или их свежие трупы, экссудат из матки и влагалища, плацента abortировавшего животного; от погибших или убитых с диагностичес-

кой целью сельскохозяйственных животных отбирают части пораженного легкого, головного мозга, селезенки, регионарных лимфоузлов, паренхимы вымени, кровь. Материал отправляют в специализированную лабораторию в герметизированных контейнерах, поддерживая температуру в контейнерах 4 °С.

Лабораторная диагностика риккетсиозов заключается в:

1) выявлении специфических антител в сыворотке крови сельскохозяйственных животных и грызунов в реакции связывания и длительного связывания комплемента;

2) обнаружении и идентификации возбудителя в исследуемом материале грызунов и сельскохозяйственных животных, а также от клещей, собранных в природном очаге, и от животных путем постановки биологической пробы и микроскопии препаратов-мазков.

Микроскопическое исследование препаратов-мазков на наличие риккетсий проводят с использованием окраски по методам Здрововского, Гимзе, Хименеса. В первом случае высушенные на воздухе мазки фиксируют обычным способом на пламени и окрашивают основным фуксином Циля, разведенным бидистиллированной водой из расчета 15–18 капель фуксина на 10 мл воды. Мазки окрашивают в течение 5 мин, затем фуксин смывают водой, препарат погружают на 2–3 с в 0,5%-й раствор лимонной кислоты и промывают водой. Затем в течение 15–30 с окрашивают 0,5%-м водным раствором метиленового синего и снова промывают водой. Мазок высушивают на воздухе и микроскопируют в иммерсионной системе при увеличении $\times 630$ и выше. При этом риккетсии имеют вид палочек или кокков красного цвета на синем фоне.

При окраске по Гимзе риккетсии окрашиваются метакроматически в розовый цвет.

Суть окраски по Хименесу заключается в способности клеток риккетсий и некоторых других бактерий (хламидий) к избирательному удерживанию краски (основной фуксин) с последующим контрастированием малахитовым зеленым. Для ее осуществления приготовленный и фиксированный над пламенем спиртовки мазок обрабатывают в течение 2–3 мин реактивом Хименеса, представляющего собой водный раствор основного фуксина с добавлением фенола и этилового спирта. После этого мазок промывают, высушивают и докрашивают раствором малахитового зеленого в течение 2 мин. Риккетсии окрашиваются в красно-пурпурный цвет, а окружающие ткани – в сине-зеленый.

Выделение риккетсий проводят на живых тест-объектах, так как все они являются облигатными внутриклеточными паразитами.

В условиях лаборатории риккетсии культивируют в РКЭ, организме лабораторных животных (белые мыши, морские свинки, хомячки, кролики), реже — в иксодовых клещах, а также в культурах клеток (фибробласты, клетки L и др.).

Патогенность. Определяют по биопробе на лабораторных животных, РКЭ и культурах клеток. Биопробу проводят на морских свинках с живой массой 300–400 г, или на белых мышах с живой массой 8–10 г, или на 6–7-дневных куриных эмбрионах (КЭ).

Для каждого образца исследуемого материала берут по четыре морские свинки. Приготовленный материал вводят внутрибрюшинно по 2,5 мл. Продолжительность инкубационного периода может колебаться от 3–5 дней до 2–4 нед. Морских свинок ежедневно термометрируют. Болезнь характеризуется повышением температуры до 40,5 °С и выше, угнетением общего состояния и потерей аппетита. Для получения четкой реакции проводят 3–5 «слепых» пассажей. На 2–3-й день после повышения температуры проводят диагностический убой морских свинок. Из паренхиматозных органов готовят препараты-отпечатки и исследуют микроскопическим методом. Патологоанатомические изменения характеризуются признаками пневмонии, дегенеративными изменениями печени, на селезенке обнаруживают фибринозный налет.

В случае отсутствия клинических признаков заболевания у морских свинок через 30 дней после введения исследуемого материала берут сыроворотку и исследуют на наличие специфических антител.

При выделении риккетсий на белых мышах также берут по четыре лабораторных животных. Исследуемый материал вводят внутрибрюшинно по 0,5–1,0 мл. Наблюдение ведут в течение 12 дней. Мыши, павшие в течение 3 дней после введения материала, утилизируются. Мышей, павших через 4 дня и более и оставшихся в живых, по истечении 12 дней убивают под эфирным наркозом и вскрывают с соблюдением асептики. Для микроскопии готовят препараты-отпечатки из селезенки. При патологоанатомическом исследовании обнаруживаются признаки пневмонии, увеличение селезенки и печени.

В качестве лабораторных животных можно использовать белых крыс, хомячков, сусликов и кроликов.

При использовании развивающихся куриных эмбрионов (КЭ) исследуемый материал вводят в желточный мешок не менее четырех эмбрионов 6–7-дневного, по 0,3–0,5 мл и наблюдают в течение 12 дней. Гибель эмбрионов на 1–3-е сут после введения материала считается неспецифической, и они утилизируются. Погибших эмбрионов

через 4 дня и более, оставшихся в живых через 12 дней, вскрывают в асептических условиях, извлекают желточные мешки и из них готовят препараты-отпечатки и препараты-мазки для микроскопии.

Лабораторный диагноз на риккетсиозы считают установленным при получении одного из следующих результатов:

выявление специфических антител в сыворотке крови сельскохозяйственных животных и грызунов в реакции связывания и длительного связывания комплемента (ретроспективная диагностика);

обнаружение и идентификация возбудителя в исследуемом материале от грызунов и сельскохозяйственных животных, а также от клещей, собранных в природном очаге, и от животных путем постановки биологической пробы и микроскопии препаратов-мазков.

Иммунитет, средства специфической профилактики и лечения животных. Особенности формирования иммунитета при риккетсиозах обусловлены внутриклеточным характером паразитирования риккетсий. Эндотелиальные клетки, представляющие собой основную мишень для возбудителя, являются инициальным звеном в выработке адаптивного иммунного ответа. В частности, при инфицировании эндотелиальных клеток ими вырабатываются несколько типов цитокинов: ИЛ-1 α , ИЛ-6, различные типы адгезинов и простагландины. Выступая в роли сигнальных молекул, они привлекают иммунокомпетентные клетки в место инфекции. Одними из таких клеток являются нормальные киллеры (НК) – активные продуценты γ -интерферона. В качестве активного элемента адаптивного иммунитета активную роль играют клеточные факторы: Т-хелперы-1 (Th1) и цитотоксические лимфоциты (субпопуляция CD8+ клеток).

В связи с тем что сыворотка крови переболевших животных способна защищать от инфекции, важная роль при риккетсиозных инфекциях принадлежит также гуморальному иммунитету. Механизм протективного действия и характер антител при риккетсиозных инфекциях до конца не установлен. Однако основным антигеном, стимулирующим их выработку, являются наружный белок *rOmpB* (*Sca5*), который проявляет свою идентичность в пределах определенной серологической группы риккетсий, часто объединяющей несколько их видов.

История создания вакцин против риккетсиозных инфекций отсчитывает свое начало практически с момента открытия риккетсий. Первые инактивированные вакцины против инфекций, вызываемых *R. rickettsii* и *R. prowazekii*, характеризовались низкой эффективностью и высокой реактогенностью. В 50-е гг. XX в. впервые была создана

эффективная вакцина против риккетсиозной инфекции, в частности против эпидемического тифа. Она представляла собой живую вакцину на основе аттенуированного штамма. Аттенуация была обусловлена точечной мутацией в гене, кодирующем фермент S-аденозинметионинзависимую метилтрансферазу. Тем не менее применение этой вакцины было исключено после установления факта реверсии вакцинного штамма в вирулентный вариант в связи с единичным характером мутации.

Ведутся работы по созданию безопасной аттенуированной вакцины (эрлихиоз собак), субъединичной вакцины на основе антигена гOmpB (риккетсиоз человека) и инактивированной вакцины (Кули-хорадка).

Литература

Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: учеб. пособие / под ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова. – М.: Мед. информ. агентство, 2003. – 236 с.: ил.

Ветеринарная микробиология и иммунология / Н. А. Радчук [и др.]; под ред. Н. А. Радчука. – М.: Агропромиздат, 1991. – 383 с.

Воробьев, А. А. Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Ширококов. – 2-е изд., стер. – М.: Академия, 2006. – 462 с.

Диагностика респираторного микоплазмоза свиней и меры борьбы с ним: метод. рекомендации / Н. Н. Андросик [и др.] // РНИУП «Ин-т эксперимент. ветеринарии им. С. Н. Вышелеского НАН Беларуси». – Минск, 2006. – 40 с.

Кисленко, В. Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: учебник: в 2 ч. / В. Н. Кисленко, Н. М. Колычев; под ред. Е. В. Ярных. – М.: Колос, 2006. – Ч. 1: Общая микробиология. – 183 с.

Классификация возбудителей инфекционных болезней бактериальной этиологии: учеб.-метод. пособие / В. Н. Алешкевич [и др.]. – Витебск: Витебск. гос. акад. вет. медицины, 2013. – 84 с.

Клостридии (*Clostridium*) [Электронный ресурс]. – <http://www.gastroscan.ru/handbook/118/3308>. – Дата доступа: 12.12.2016.

Клостридии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://med-stud.narod.ru/med/infect/clostridium.html>. – Дата доступа: 12.12.2016.

Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и иммунология: учебник / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов; под ред. Т. С. Молочаева. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 2006. – 432 с.

Костенко, Т. С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии: учеб. пособие / Т. С. Костенко, Е. И. Скаршевская, С. С. Гительсон. – М.: Агропромиздат, 1989. – 272 с.

Иммунология: учеб. пособие / П. А. Красочко [и др.]; под ред. П. А. Красочко, Н. Д. Лисова. – Минск: Аверсев, 2005. – 126 с.

Лысак, В. В. Микробиология: учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 426 с.

Медицинская микробиология: учебник / О. К. Поздеев, В. И. Покровский; под ред. акад. РАМН В. И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 778 с.

Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник / под ред. А. А. Воробьева. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2012. – 704 с.

Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник: в 2 т. / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – Т. 1. – 448 с.

Межгосударственный стандарт. ГОСТ 33675-2015 «Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Бактериологические методы». – М.: Стендартинформ, 2016. – 18 с.

Микробиология: учебник / А. В. Воробьев [и др.]. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2003. – 336 с.

Микробиология и иммунология: учеб. пособие: в 2 ч. / А. А. Солонко [и др.]; под общ. ред. А. А. Гласкович, П. А. Красочко. – Минск: НПООО «Пион», 2002. – Ч. 1. Общая микробиология и иммунология. – 248 с.

Павленко, В. И. Клетки и органы иммунной системы: учеб. пособие / В. И. Павленко, И. Ю. Саяпина. – Благовещенск: Без изд., 2017. – 126 с.

Павлович, С. А. Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб. пособие / С. А. Павлович. – Минск: Вышэйш. шк., 2005. – 799 с.

Песнякевич, А. Г. Основы иммунологии: курс лекций / А. Г. Песнякевич. – Минск: БГУ, 2008. – 194 с.

Пособие по иммунологии / Д. К. Новиков [и др.]. – Витебск, 1996. – 125 с.

Санитарные и ветеринарно-санитарные правила «Состояние здоровья населения в связи с влиянием микробиологического фактора среды обитания человека. Бруцеллез», утвержденные Министерством здравоохранения и Министерством сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 26.03.2010 № 32/20.

Сидоров, М. А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов / М. А. Сидоров, Д. И. Скородумов, В. Ю. Федотов. – М.: Колос, 1995. – 319 с.

Справочник по бактериологическим методам исследований в ветеринарии / сост. А. Э. Высоцкий, З. Н. Барановская. – Минск: Белтаможсервис, 2008. – 824 с.

Хайтов, Р. М. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учеб. пособие / Р. М. Хайтов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 280 с.

Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель; пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – 567 с.

Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 749 с.

A review on actinomycetes and their biotechnological application / Chavan [et al.] // IJPSR. – 2013. – Vol. 4(5). – P. 1730–1742.

Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications / Gina R. Lewin [et al.] // Annu. Rev. Microbiol. – 2016. – Vol. 70. – P. 235–254.

Diversity and Versatility of Actinomycetes and its Role in Antibiotic Production / Chaudhary [et al.] // Journal of Applied Pharmaceutical. – 2013. – S. 3 (8 Suppl 1). – P. 83–94.

Genome beginnings: rooting the tree of life / James A. Lake [et al.] // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2009. – Vol. 364. – P. 2177–2185.

Prescott, L. Microbiology / L. Prescott, J. P. Harley, D. A. Klein. – Dubuque: Iowa, 2000. – 912 p.

Paraclostridium benzoelyticum gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment and reclassification of *Clostridium bifermentans* / T. S. Sasi Jyothsna [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – N 6. – P. 1268–1274.

Gupta, R. S. The natural evolutionary relationships among prokaryotes / R. S. Gupta // Clinical Reviews in Microbiology. – 2000. – N 26(2). – P. 111–131.

Оглавление

Предисловие	3
ВВЕДЕНИЕ В МИКРОБИОЛОГИЮ	5
В.1. Предмет и история развития микробиологии	5
В.2. Положение микроорганизмов в природе	12
В.3. Задачи ветеринарной микробиологии	13
В.4. Методы лабораторной диагностики инфекционных бо- лезней	14
Раздел 1. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	16
Глава 1. СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ.....	16
1.1. Прокариоты и эукариоты.....	16
1.2. Единство и эволюция бактериального мира.....	18
1.3. Систематика микроорганизмов и основные таксономи- ческие категории.....	23
1.4. Современная классификация бактерий по Берджи.....	26
Глава 2. МОРФОЛОГИЯ И СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ.....	28
2.1. Общее представление о морфологии и строении бакте- риальной клетки.....	28
2.2. Основные структурные компоненты бактериальной клет- ки, их характеристика и биологическая роль.....	30
2.3. Необязательные и временные структурные компоненты бактериальной клетки, их характеристика и назначение.....	36
Глава 3. МОРФОЛОГИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП БАКТЕРИЙ	42
3.1. Морфология и структура шаро- и палочковидных и извитых форм микроорганизмов	42

3.2. Морфология и структура микоплазм, риккетсий, хламидий, актиномицетов	49
---	----

Глава 4. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

4.1. Химический состав прокариотной клетки	55
4.2. Питание бактерий	57
4.3. Дыхание бактерий	60
4.4. Рост и размножение микроорганизмов.....	63
4.5. Ферменты микроорганизмов.....	66
4.6. Основные принципы культивирования микробов	70

Глава 5. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

5.1. Влияние физических факторов на микроорганизмы	73
5.2. Действие химических веществ.....	79
5.3. Действие биологических факторов	81

Глава 6. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ.....

6.1. Понятие о генетике, краткая история ее развития	87
6.2. Генетика микроорганизмов и ее значение	89
6.3. Строение и функции генетического аппарата	91
6.4. Понятие о наследственности и изменчивости	94
6.5. Фенотипическая и генотипическая изменчивость.....	98

Глава 7. РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРИРОДЕ

7.1. Микробиота почвы.....	105
7.2. Микробиота воды.....	106
7.3. Микробиота воздуха.....	108
7.4. Микробиота организма животных	109
7.5. Микробиота кормов.....	113
7.6. Микробиота молока и молочных продуктов.....	115
7.7. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе... ..	118

Глава 8. ОСНОВЫ УЧЕНИЯ ОБ ИНФЕКЦИИ

8.1. Общие представления об инфекции, инфекционном процессе, инфекционной болезни	121
8.2. Пути проникновения микробов в организм и их распространение	124

8.3. Классификация инфекций	125
8.4. Факторы, влияющие на возникновение инфекций.....	128
Раздел 2. ИММУНОЛОГИЯ.....	134
Глава 9. ВВЕДЕНИЕ В ИММУНОЛОГИЮ.....	134
9.1. Предмет и история развития иммунологии	134
9.2. Задачи иммунологии. Иммунитет и его виды.....	137
Глава 10. ИММУННАЯ СИСТЕМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ПТИЦ.....	141
10.1. Иммунная система и ее органы	141
10.2. Лимфоидная ткань слизистых оболочек. Лимфа и кровь...	144
10.3. Клетки иммунной системы.....	146
10.4. Механизмы взаимодействия клеток в ходе иммунного ответа	167
Глава 11. КОНСТИТУТИВНЫЕ (ВРОЖДЕННЫЕ) И ИНДУЦИБЕЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА.....	173
11.1. Антигены	173
11.2. Конститутивные (врожденные) факторы защиты ор- ганизма	178
11.3. Фагоцитоз	184
11.4. Апоптоз, его роль в развитии и функционировании клеток иммунной системы	192
11.5. Индуцибельные факторы защиты организма (факторы адаптивного иммунитета).....	197
11.5.1. Механизм иммунного ответа. Генетический конт- роль и регуляция	197
11.5.2. Гуморальный иммунитет.....	204
11.5.2.1. Природа, физико-химические свойства и функции антител.....	204
11.5.2.2. Синтез и динамика образования антител.....	214
11.5.2.3. Взаимодействие клеток при гуморальном иммун- ном ответе.....	217
11.5.3. Клеточный иммунитет	218
11.5.4. Феномен иммунного фагоцитоза.....	220
11.5.5. Иммунологическая память	221
11.5.6. Иммунологическая толерантность.....	222

11.5.7. Идиотип-антиидиотипическое взаимодействие.....	223
11.5.8. Аллергия.....	223
11.5.8.1. Гиперчувствительность немедленного типа.....	228
11.5.8.2. Гиперчувствительность замедленного типа	229
11.5.8.3. Механизмы развития гиперчувствительности немедленного и замедленного типов	230
11.5.9. Особенности противои инфекционного иммунитета.....	233

Глава 12. ИММУНОДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ .. 235

12.1. Понятие об иммунодиагностике	235
12.2. Понятие об иммунном статусе и критерии его оценки	236
12.3. Серологические реакции.....	237
12.4. Клеточные реакции	242

Глава 13. БИОПРЕПАРАТЫ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЖИВОТНЫХ..... 244

13.1. Ветеринарные биологические препараты и их классификация	244
13.1.1. Биопрепараты для активной иммунизации животных	245
13.1.2. Биопрепараты для пассивной иммунизации и лечения животных.....	250
13.1.3. Биопрепараты для диагностики инфекционных болезней животных.....	252
13.2. Принципы изготовления ветеринарных биологических препаратов и контроль их качества	253
13.3. Хранение препаратов и их применение.....	255

Раздел 3. ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 14. ВОЗБУДИТЕЛИ КОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

14.1. Общие сведения о кокках.....	257
14.2. Возбудители стафилококкозов	258
14.3. Возбудители стрептококкозов	264

Глава 15. ЭНТЕРОБАКТЕРИИ.....

15.1. Общая характеристика энтеробактерий.....	271
15.2. Возбудитель колибактериоза	273
15.3. Возбудители сальмонеллезов	281

15.4. Возбудитель кишечного иерсиниоза	287
15.5. Возбудители протеоза.....	294
15.6. Возбудители ассоциированной кишечной инфекции молодняка животных	301
Глава 16. ВОЗБУДИТЕЛЬ РОЖИ СВИНЕЙ	311
Глава 17. ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛИСТЕРИОЗА.....	316
Глава 18. ВОЗБУДИТЕЛЬ ГЕМОФИЛЕЗНОГО ПОЛИ- СЕРОЗИТА СВИНЕЙ	321
Глава 19. ВОЗБУДИТЕЛЬ АКТИНОБАЦИЛЛЯРНОЙ ПЛЕВРОПНЕВМОНИИ СВИНЕЙ	326
Глава 20. ВОЗБУДИТЕЛИ ПАСТЕРЕЛЛЕЗОВ	332
Глава 21. ВОЗБУДИТЕЛЬ БОРДЕТЕЛЛЕЗА СВИНЕЙ	338
Глава 22. ПСЕВДОМОНАДЫ.....	342
22.1. Общая характеристика псевдомонад	342
22.2. Возбудители псевдомоноза животных.....	343
Глава 23. ВОЗБУДИТЕЛЬ САПА ЛОШАДЕЙ	348
Глава 24. ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУЛЯРЕМИИ	353
Глава 25. ВОЗБУДИТЕЛЬ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ	360
Глава 26. ПАТОГЕННЫЕ АНАЭРОБЫ.....	367
26.1. Общая характеристика анаэробов	367
26.2. Возбудитель анаэробной энтеротоксемии сельскохозяй- ственных животных и дизентерии ягнят.....	370
26.3. Возбудители злокачественного отека	375
26.4. Возбудитель брадзота овец	382
26.5. Возбудитель эмфизематозного карбункула.....	384
26.6. Возбудитель ботулизма.....	388
26.7. Возбудитель столбняка.....	393
Глава 27. ВОЗБУДИТЕЛЬ НЕКРОБАКТЕРИОЗА.....	398
Глава 28. ВОЗБУДИТЕЛИ БРУЦЕЛЛЕЗА	404
Глава 29. МИКОБАКТЕРИИ	418
29.1. Общая характеристика микобактерий.....	418

29.2. Возбудители туберкулеза животных	422
29.3. Возбудитель паратуберкулеза.....	432
Глава 30. ВОЗБУДИТЕЛЬ ДИЗЕНТЕРИИ СВИНЕЙ.....	437
Глава 31. ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛЕПТОСПИРОЗА	442
Глава 32. ВОЗБУДИТЕЛИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА	452
Глава 33. ВОЗБУДИТЕЛЬ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА	458
Глава 34. АКТИНОМИЦЕТЫ	462
34.1. Общая характеристика актиномицет.....	462
34.2. Возбудитель актиномикоза	465
Глава 35. МИКОПЛАЗМЫ	471
35.1. Общая характеристика микоплазм	471
35.2. Возбудители микоплазмозов.....	474
Глава 36. ВОЗБУДИТЕЛИ ХЛАМИДИОЗОВ	489
36.1. Общая характеристика хламидий	489
36.2. Систематическое положение хламидий	492
36.3. Биологические свойства хламидий.....	496
Глава 37. ВОЗБУДИТЕЛИ РИККЕТСИОЗОВ	504
37.1. Общая характеристика риккетсий и сходных с ними бактерий	504
37.2. Морфология и биологические свойства риккетсий.....	507
Литература.....	516

Учебное издание

Вербицкий Анатолий Анатольевич,
Алешкевич Виталий Николаевич,
Медведев Александр Петрович и др.

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

Учебное пособие

Редактор *Р. В. Михновец*
Дизайн обложки *Н. П. Засулевич*
Компьютерная верстка *Е. А. Титовой*

Подписано в печать 18.07.2019. Формат 60x84/16.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 31,16.
Уч.-изд. л. 31,00. Тираж 300 экз. Заказ № 259.

Республиканское унитарное предприятие
«Информационно-вычислительный центр
Министерства финансов Республики Беларусь».
Свидетельства о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

ДЛЯ ЗАМЕТОК



ВЕТЕРИНАРНАЯ
МИКРО
БИОЛОГИЯ
И ИММУНОЛОГИЯ

ISBN 978-985-7224-45-6



9 789857 224456

