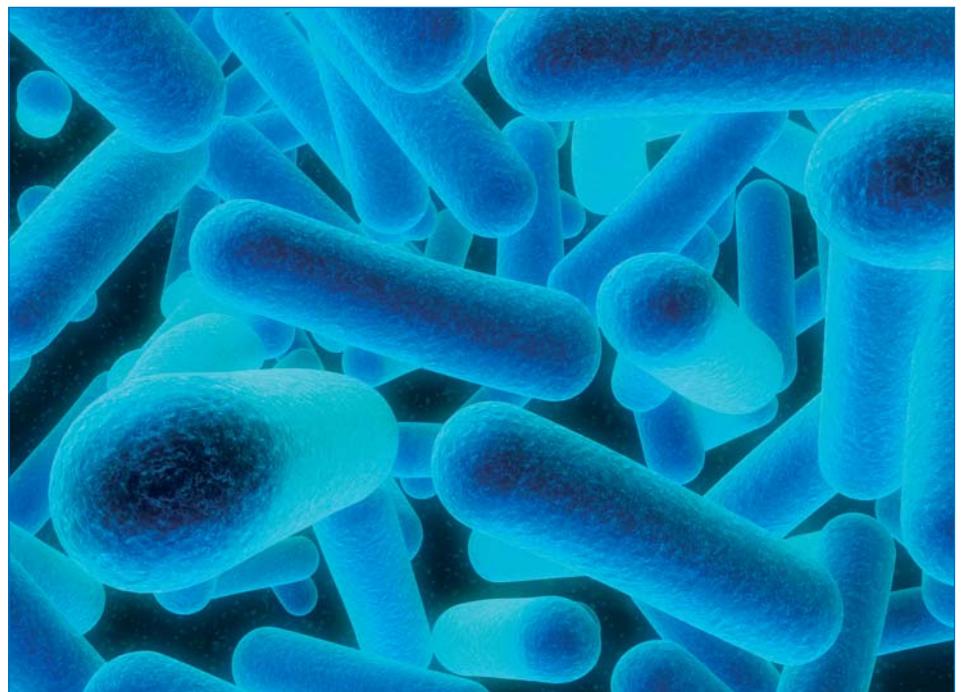


В.А. Галынкин, В.И. Кочеровец, А.Э. Габидова

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ



АРНЕБИЯ

Современные пробиотики из Германии Эффективная помощь микрофлоре кишечника

Нормализация состояния и состава микрофлоры пищеварительного тракта является неотъемлемой частью терапии многих патологий, от иммунных дисфункций до сердечно-сосудистых заболеваний. Сочетанное применение немецких пробиотиков Симбиолакт Комп. и Про-Симбиофлор позволяет оказать выраженное воздействие на все отделы пищеварительного тракта, тем самым купируя патологические процессы различной локализации.

Пробиотик Симбиолакт Комп. является самым назначаемым пробиотиком в Германии и используется в качестве дополнительного источника 6 штаммов лакто- и бифидобактерий в концентрации $4-8 \times 10^8$ КОЕ/г. Устойчивые к прохождению через желудок штаммы и их способность продуцировать витамины, жирные кислоты и перекись водорода делают его важным этапом в коррекции дисбиозов.

Действие лекарственного препарата Про-Симбиофлор обусловлено иммунологической активностью бактериального липополисахарида (аутолизат штамма *E. coli*), воздействующего на выработку специфических и неспецифических, в том числе местных, факторов защиты. Препарат также способствует нормализации микробиоценоза.



В.А. Галынкин, В.И. Кочеровец, А.Э. Габидова

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Под редакцией проф. В.А. Галынкина, проф. В.И. Кочеровца

Москва, Арнебия
2015

ББК 52.81я73

УДК 615.281:579(075.8)

Г15

Галынкин В.А., Кочеровец В.И., Габидова А.Э. Фармацевтическая микробиология. М.: Арнебия. 2 издание, дополненное и переработанное. 2015. — 240 с., 83 рис., 62 табл

Современные сведения о микроорганизмах – продуцентах БАВ, контаминациях фармацевтического производства, возбудителях инфекционных заболеваний, а также о биоцидных агентах – химиотерапевтических веществах и антисептиках, механизме их действия и проблемах микробной резистентности представлены в свете применимости этих знаний для специалистов в области промышленного производства, аптечного изготовления, контроля качества и использования лекарственных средств. Основы иммунитета изложены в связи с особенностями производства иммунопрепараторов. В разделе «Микробиологические аспекты фармацевтического производства» рассматриваются требования к качеству лекарственных средств и проблемы повышения качества путем борьбы с микробами-контаминациями и соблюдения принципов GMP.

Для студентов, микробиологов, провизоров, технологов по производству фармпрепаратов и широкого круга специалистов, занятых в сфере лекарственного обращения.

ISBN 978-5-9244-0082-2

© 2015 Галынкин В.А., Кочеровец В.И., Габидова А.Э.

© 2015 ООО «Арнебия»

© 2015 Иллюстрации — commons.wikimedia.org

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме и какими бы то ни было средствами без письменного разрешения обладателей авторских прав.

Оглавление

Предисловие ко второму изданию	10
Введение	11
Часть I. БИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	13
Глава I. ПРОКАРИОТЫ (БАКТЕРИИ).....	15
1.1 Строение прокариотической клетки	15
1.2 Морфология	17
1.3 Актиномицеты	20
1.4 Классификация прокариотических микроорганизмов	20
1.5 Строение клетки	21
1.6 Генетический аппарат	26
1.7 Индивидуальный рост и бесполое размножение клеток	26
1.8 Половое размножение или генетическая рекомбинация	28
Глава 2. ГРИБЫ	30
2.1 Положение грибов в системе живой природы	30
2.2 Морфология и ультраструктура грибов	32
2.3 Организация клеточного цикла дрожжей	32
2.4 Особенности деления ядра	38
2.5 Ультраструктура грибной клетки	38
2.6 Экологические группы грибов	39
2.7 Использование грибов в промышленности	40
2.8 Грибы — возбудители болезней человека и животных	40
Глава 3. МИКРОФЛОРЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ, ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ	45
3.1 Микробно-растительные взаимодействия при росте и развитии растений	48
3.2 Фитопатогенные грибы	50
3.3 Бактерии — возбудители болезней растений	51
3.4 Бактериальная пятнистость, бактериальный ожог, сосудистый бактериоз	53
3.5 Микоплазмы (фитоплазмы)	54
Глава 4. НАДЛЕЖАЩАЯ ПРАКТИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И СБОРА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (GACP)	56
4.1 Микробиологический контроль лекарственных средств	57
Глава 5. ВИРУСЫ	59
5.1 Структура вирусов	59
5.2 Взаимодействие вируса с клеткой хозяина	61
5.3 Культивирование вирусов	63
5.4 Действие химических и физических факторов на вирусы	63
5.5 Принципы создания антивирусных препаратов	63
5.6 Устойчивость вирусов к химиотерапевтическим препаратам	65
5.7 Интерфероны	65
5.8 Возбудители вирусных болезней человека	66

5.8.1 ДНК-содержащие вирусы	66
5.8.2 РНК-содержащие вирусы	66
5.8.3 Неклассифицированные вирусы	67
5.9 Вирусы — возбудители болезней растений.	67
5.9.1 Строение и размножение вирусов.	68
5.9.2 Симптомы вирусных болезней растений	68
5.9.3 Способы распространения фитопатогенных вирусов	68
5.9.4 Защита растений от вирусных болезней	69
5.9.5 Вироиды — возбудители болезней растений	69
5.10 Прионы	70
Глава 6. ПРОСТЕЙШИЕ	72
6.1 Споровики	72
6.2 Саркодовые	73
6.3 Жгутиконосцы	74
6.4 Инфузории	75
Глава 7. ОСНОВЫ ПАТОГЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ. ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ.	76
7.1 Патогенность и вирулентность	76
7.2 Факторы защиты и агрессии	76
7.3 Инфекционные болезни	78
ЧАСТЬ II. АНТИМИКРОБНЫЕ АГЕНТЫ	81
Глава 8. АНТИБИОТИКИ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ	83
8.1 Антибиотики	83
8.1.1 β -лактамные антибиотики	83
8.1.2 Цефалоспорины	84
8.1.3 Тетрациклины	85
8.1.4 Рифапицины	86
8.1.5 Аминогликозидные антибиотики	86
8.1.6 Макролиды	86
8.1.7 Полипептидные антибиотики	87
8.1.8 Другие антибактериальные антибиотики	87
8.1.9 Антифунгальные антибиотики	88
8.1.10 Синтетические химиотерапевтические препараты	88
Глава 9. ПРОИЗВОДСТВО ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ	90
9.1 Общие представления о промышленном производстве лекарственных препаратов	90
9.2 Производство антибиотиков	91
Глава 10. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ	95
10.1 Рекомбинантные ДНК	95
10.2 Методы генетического конструирования микроорганизмов <i>in vitro</i>	95
10.3 Источники ДНК для клонирования	95
10.4 Рестриктазы	96
10.5 Методы воссоединения фрагментов ДНК	97
10.6 Векторы	98

10.6.1 Плазмиды	98
10.6.2 Векторы на основе бактериофага λ	98
10.6.3 Космиды	99
10.6.4 Фазмиды	99
10.6.5 Векторы на основе бактериофагов, содержащих одноцепочечную ДНК	99
10.6.6 Клетка-реципиент	99
10.7 Введение молекул ДНК в клетки	99
10.8 Методы идентификации клонов, содержащих рекомбинантные молекулы.	100
10.9 Клеточная инженерия	101

**Глава 11. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ
В ПРОИЗВОДСТВЕ МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ
И В ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ** 103

11.1 Медицинские препараты, производимые микроорганизмами.	103
11.2 Витамины, аминокислоты и органические кислоты	103
11.3 Железохелирующие агенты.	104
11.4 Ферменты	104
11.5 Микробная трансформация лекарственных веществ.	105
11.5.1 Микробная трансформация	105
11.5.2 Инсектициды	105
11.6 Использование микроорганизмов и их продуктов в лабораторных исследованиях	106
11.6.1 Определение витаминов и аминокислот	106
11.6.2 Фенилкетонурия.	106
11.6.3 Определение канцерогенов и мутагенов	106
11.6.4 Использование микробных ферментов при определении стерильности	106
11.6.5 Применение иммобилизованных ферментов	107
11.6.6 Использование микроорганизмов как модельных систем при исследовании метаболизма лекарственных веществ.	107

Глава 12. ПРИМЕНЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ 108

12.1 Химиотерапия инфекционных заболеваний	108
12.2 Микробиологический фактор	108
12.3 Фармакологический фактор	109
12.4 Токсикологический фактор и побочное действие.	109
12.5 Эпидемиологический фактор и резистентность	109
12.6 Профилактическое использование химиотерапевтических препаратов	109
12.7 Комбинированное применение химиотерапевтических препаратов	110
12.8 Применение антибиотиков для лечения инфекционных заболеваний	110
12.9 Применение синтетических химиотерапевтических препаратов.	110
12.10 Применение антибиотиков в сельском хозяйстве.	110

**Глава 13. ПРИНЦИПЫ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
АНТИБИОТИКОВ И ДРУГИХ ХИМИОТЕРАПЕТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ** 112

13.1 Микробиологические методы.	112
13.2 Определение активности антибиотиков методом серийных разведений.	112
13.3 Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар	113
13.4 Ферментные методы	113
13.4.1 Ускоренный метод определения чувствительности микроорганизма к антибиотику	113
13.4.2 Определение способности микроорганизмов продуцировать β -лактамазу	114
13.4.3 Определение способности микроорганизмов продуцировать β -лактамазу	114
13.4.4 Хроматографические методы	114
13.4.5 Спектрофотометрические методы	115
13.4.6 Иммунологические методы	115

Глава 14. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ХИМИОТЕРАПЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.....	116
14.1 Ингибиторы биосинтеза компонентов клеточной стенки	116
14.1.1 Биосинтез пептидогликана	116
14.1.2 Ингибиторами биосинтеза пептидогликана	117
14.2 Ингибиторы синтеза миколовых кислот и арабиногалактана у микобактерий.....	117
14.3 Ингибиторы синтеза белка	117
14.4 Препараты, нарушающие функции хромосомы	118
14.5 Антагонисты фолатов	118
14.6 Антимикробные агенты, воздействующие на цитоплазматическую мембрану	119
14.6.1 Мембранные бактерии	119
14.6.2 Полиены	119
14.6.3 Имидазолы	119
14.6.4 Катионные пептиды	120
Глава 15. УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К ХИМИОТЕРАПЕТИЧЕСКИМ ВЕЩЕСТВАМ	121
15.1 Клеточные и молекулярные механизмы устойчивости	121
15.1.1 Различия в проницаемости клеточных мембран	121
15.1.2 Ферменты, инактивирующие антибиотики	121
15.2 Генетические основы устойчивости	122
15.3 Пути и способы предотвращения развития микробной резистентности к ХТВ.....	123
Глава 16. ДЕЗИНФЕКТАНТЫ, АНТИСЕПТИКИ И КОНСЕРВАНТЫ.....	124
16.1 Наименование антимикробных агентов	124
16.2 Факторы, определяющие выбор антимикробного агента	124
16.4 Влияние факторов окружающей среды	124
16.5 Группы химических соединений дезинфектантов	125
16.5.1 Фенолы	125
16.5.2 Спирты	127
16.5.3 Альдегиды	128
16.5.4 Бигуаниды	128
16.5.5 Поверхностно-активные вещества	129
16.5.6 Галогены	129
16.5.7 Кислоты и эфиры	130
16.5.8 Окислители	130
16.5.9 Красители	131
16.6 Применение антимикробных химических веществ в качестве антисептиков.....	131
16.7 Применение антимикробных химических веществ в качестве консервантов.....	131
Глава 17. МЕТОДЫ ДЕЗИНФЕКЦИИ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ, АНТИСЕПТИКОВ И КОНСЕРВАНТОВ.....	134
17.1 Методы дезинфекции	134
17.1.1 Паровой способ	136
17.1.2 Ультрафиолетовое излучение	136
17.1.3 Ионизирующее излучение	136
17.1.4 Биологический метод	136
17.1.5 Химический метод	136
17.2 Динамика дезинфекции	137
17.3 Методы испытания антимикробной активности антисептиков и дезинфектантов	137
17.4 Определение эффективности консервантов лекарственных средств	138

Глава 18. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ И АНТИСЕПТИКОВ	142
18.1 Действие антисептиков на микробную клетку	142
18.2 Резистентность микроорганизмов к антисептикам и дезинфектантам	142
18.3 Проницаемость клеточных оболочек и резистентность	143
Глава 19. ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА	145
19.1 Неспецифические факторы защиты	145
19.1.1 Воспаление	145
19.1.2 Система комплемента	146
19.1.3 Система пропердина	146
19.1.4 Интерфероны	146
19.1.5 Фагоцитоз	147
19.2 Характеристика фагоцитирующих клеток	147
19.3 Иммунитет	147
19.4 Антигены	148
19.5 Антитела	149
19.6 Иммунная система	150
19.7 Иммунокомпетентные клетки	151
19.8 Цитокины	152
19.9 Формирование иммунного ответа	152
19.10 Аллергия	154
19.10.1 Аллергический реакции I типа	154
19.10.2 Аллергические реакции II типа	154
19.10.3 Аллергические реакции III типа	155
19.10.4 Аллергические реакции IV типа	155
19.10.5 Аллергические реакции V типа	155
19.11 Толерантность и аутоиммунитет	156
Глава 20. ИММУНОПРЕПАРАТЫ: ПРОИЗВОДСТВО И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	157
20.1 Вакцины	157
20.2 Иммуноглобулины	159
20.3 Биологически активные пептиды	160
20.4 Гормоны	160
20.5 Иммуномодуляторы	161
20.6 Иммуномодуляторы микробного происхождения	161
20.7 Синтетические иммуномодуляторы	162
20.8 Диагностические препараты	162
ЧАСТЬ III. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА	163
Глава 21. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И ЕЕ СВЯЗЬ С ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТЬЮ	165
21.1 Нормальная микробиота	
человека	165
21.2 Микробиота кожных покровов	166
21.3 Микробиота полости рта	166
21.4 Микробиота верхних дыхательных путей (ВДП)	167
21.5 Микробиота желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)	167
21.6 Микробиота мочеполовой системы	167
21.7 Значение нормальной микробиоты	167

21.8 Дисбактериоз (дисбиоз)	168
21.9 Микробиота окружающей среды. Санитарно-показательные микроорганизмы.	169
21.9.1 Основные требования, предъявляемые к санитарно-показательным микроорганизмам	170
21.9.2 Принципы и методы проведения санитарно-микробиологических исследований	170
21.10 Характеристика основных групп СПМ	170
21.10.1 Колiformные бактерии	171
21.10.2 Энтерококки	171
21.10.3 Клостридии	171
21.10.4 Стреptококки и стафилококки	172
21.10.5 Бактериофаги	172
21.11 Санитарная микробиология воды	172
21.12 Санитарная микробиология почвы	173
21.13 Санитарная микробиология воздуха	174
Глава 22. ИСТОЧНИКИ И ПУТИ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ	175
22.1 Общая характеристика типовых источников микробной контаминации в фармацевтическом производстве	175
22.2 Зависимость микробной контаминации от качества эксплуатации технологического оборудования	175
22.3 Зависимость микробной контаминации от сырья и вспомогательных материалов	176
22.3.1 Микробиота животного сырья	176
22.3.2 Микробиота лекарственного растительного сырья	177
22.4 Вода как один из видов сырья и вспомогательных материалов	178
22.5 Зависимость микробной контаминации объектов производства от воздуха	179
22.6 Вспомогательные вещества в производстве ГЛС	180
22.7 Упаковочный материал и его роль в контаминации ГЛС	180
22.8 Карантин	180
22.9 Зависимость микробной контаминации от персонала	180
Глава 23. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К КАЧЕСТВУ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ	182
23.1 Микробиота нестерильных лекарственных средств	182
23.2 Роль микроорганизмов-контаминаントов лекарственных средств в патологии человека	182
23.3 Микробиологические требования к качеству ГЛС	183
23.4 Оценки качества лекарственных препаратов	183
23.5 Определение антимикробного действия	185
23.6 Определение антимикробного действия в условиях испытания на микробиологическую чистоту	185
23.7 Отбор образцов лекарственных средств для анализа качества по показателю «Микробиологическая чистота»	186
23.7.1 Для лекарственных средств в форме аэрозолей	187
23.7.2 Для трансдермальных пластырей	187
23.7.3 Для лекарственных растительных средств (ЛРС)	188
23.8 Методы количественного определения аэробных микроорганизмов	188
23.8.1 Чашечные агаровые методы	188
23.8.2 Глубинный метод	188
23.8.3 Двухслойный метод	188
23.8.4 Поверхностный метод	188
23.8.5 Модифицированный глубинный метод	188
23.9 Учет и интерпретация результатов чашечных агаровых методов	189
23.10 Метод мембранный фильтрации	189
23.10.1 Условия проведения испытания	189

23.10.2 Жидкости для промывания фильтров	190
23.11 Метод наиболее вероятных чисел (НВЧ).	190
23.12 Определение отдельных видов микроорганизмов, недопустимых и ограниченных количественно в лекарственных средствах	191
23.12.1 Испытание на отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи.	191
23.12.2 Количественное определение энтеробактерий, устойчивых к желчи	191
23.12.3 Испытание на отсутствие бактерий <i>E. coli</i>	192
23.12.4 Количественное определение бактерий <i>E. coli</i>	192
23.12.5 Испытание на отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i>	192
23.12.6 Испытание на отсутствие бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	193
23.12.7 Испытание на отсутствие бактерий <i>Staphylococcus aureus</i>	193
23.12.8 Испытание на отсутствие грибов <i>Candida albicans</i>	193
23.13 Морфологические и тинкториальные свойства микроорганизмов	194
23.13.1 Повторение испытания	194
23.14 Возбудители бактериальных заболеваний человека.	194
Глава 24. БОРЬБА С МИКРОБАМИ-КОНТАМИНАНТАМИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ	198
24.1 Действие физических и химических факторов на микроорганизмы	198
24.1.1 Физические факторы, благоприятные для роста микроорганизмов.	198
24.1.2 Чувствительность микроорганизмов к повреждающим факторам	198
24.1.3 Воздействие на микроорганизмы высоких температур	199
24.1.4 Влияние на микроорганизмы лучистой энергии	199
24.1.5 Воздействие на микроорганизмы химических веществ с неспецифической антимикробной активностью	200
24.2 Асептика. Антисептика. Стерилизация.	200
24.2.1 Термическая стерилизация	200
24.2.2 Стерилизация газами и химическими растворами	201
24.2.3 Радиационная и УФ стерилизация	201
24.2.4 Стерилизующая фильтрация жидкостей	201
24.3 Контроль эффективности работы стерилизующих устройств	202
24.4 Стерилизация в аптеках	202
24.5 Промышленная дезинфекция	202
24.6 Методы дезинфекции	204
24.7 Основные группы дезинфектантов и цели их использования	205
24.8 Микробная контаминация растворов антисептиков и дезинфектантов	206
24.9 Дезинфекция в аптеках	206
Глава 25. ПРИНЦИПЫ GMP И GPP В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ	208
25.1 Правила GMP в обеспечении качества лекарственных средств	208
25.2 Общие представления о системе правил GMP	208
25.3 Микробиологические требования к организации производства фармацевтической продукции	210
25.4 Управление рисками для качества	211
25.5 Принципы GPP в обеспечении качества лекарственных средств	212
25.6 Хранение в аптечных учреждениях лекарственных средств	213
Литература	216
Предметный указатель	218
Указатель латинских названий	233

Предисловие ко второму изданию

Прошло 15 лет с момента, когда у нас возникла идея написать первое отечественное целевое издание по фармацевтической микробиологии. Инициатива была обусловлена тем, что в учебной литературе для студентов фармацевтических вузов, рекомендованной Минздравом России, материал по фармацевтической микробиологии был представлен только разделом «Микрофлора растительного лекарственного сырья, фитопатогенные микроорганизмы, микробиологический контроль лекарственных средств». Объем раздела составлял 5 страниц. Этого было недостаточно, чтобы раскрыть практические цели и задачи фармацевтической микробиологии как одного из прогрессивных прикладных направлений микробиологии, имеющего отношение к различным аспектам современной фармации.

Многолетний опыт преподавания в медицинских и фармацевтических ВУЗах убедил нас в необходимости самостоятельного позиционирования фармацевтической микробиологии и актуализации всех ее разделов. Однако творческий энтузиазм авторов — сотрудников Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова и Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии существенно сдерживался отсутствием самостоятельной учебной программы по фармацевтической микробиологии, необходимой для выпуска бюджетной учебной литературы. Процедура утверждения федеральных и отраслевых учебников является многолетним и не всегда успешным для авторов процессом. В этих условиях мы приняли решение инициативно и за короткий срок выполнить эту работу.

В 2003 г. издательство «Арнебия» (Москва) выпустило в свет первый вариант книги «Фармацевтическая микробиология» тиражом в 1000 экз. В издании были представлены современные материалы по наиболее известным сферам применения фармацевтической микробиологии - разработке, производству и контролю качества лекарственных средств. Со временем книга стала заглавной в тематической серии изданий, так как была дополнена словарем терминов, руководством по методам исследования, справочником по питательным средам и учебными пособиями. Эти источники оперативно актуализировали базовое издание на протяжении десяти лет.

Инициатива подготовить второе издание книги «Фармацевтическая микробиология» была продик-

тована существенными изменениями в сфере отечественного лекарственного обращения. Произошло усиление правовой базы. В июле 2015 г. вступил в силу Федеральный закон Российской Федерации от 22 декабря 2014 г. N 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств». Активно реализуются этапы «Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года» и «Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации до 2025 года».

Заметно повысился уровень профессионального образования специалистов фармацевтической отрасли. Стартовал процесс гармонизации российских стандартов по разработке и производству лекарственных средств с международными требованиями. Значительное число европейских фармацевтических компаний организовали промышленный выпуск лекарственных препаратов в Российской Федерации. Все это было учтено при подготовке второго издания книги «Фармацевтическая микробиология».

В связи с завершением издательского проекта считаем своим долгом поблагодарить профессора Н.А. Заикину и доцента Т.С. Потехину за активное участие в написании первой книги и других совместных тематических изданий. Мы признательны профессорам Бунятиян Н.Д., Одеговой Т.Ф. и докт. фарм. наук Гунар О.В. за консультативную помощь и профессиональную поддержку. Выражаем искреннюю благодарность издателям в лице Рабиновича С.А. и Серебрякова С.О. за экспертизу и содействие в реализации проекта.

Задача настоящей книги — познакомить студентов фармацевтических, медицинских и биотехнологических ВУЗов и специалистов, работающих в сфере лекарственного обращения, с современным уровнем развития и практического применения фармацевтической микробиологии в Российской Федерации.

Мы надеемся, что второе издание «Фармацевтической микробиологии» удовлетворит запросы не только студентов, но и станет доступным материалом на постдипломном этапе образования аптечных провизоров, технологов фармацевтических предприятий и микробиологов контрольных лабораторий.

профессор Галынкин В.А.
профессор Кочеровец В.И.

Введение

В учебнике сведения о морфологии, ультраструктуре, физиологии и генетике бактерий, грибов, вирусов и простейших представлены в свете применимости этих знаний для специалистов, работающих в области лекарственного обращения. Освещены проблемы биотехнологии, генетической и клеточной инженерии. Изложены основы патогенности микроорганизмов, этиологии и химиотерапии инфекционных заболеваний. Основы иммунитета представлены в связи с особенностями производства иммунопрепараторов. В разделе «Микробиологические аспекты фармацевтической деятельности» рассматриваются требования к качеству лекарственных средств и проблемы повышения качества путем борьбы с микробами-контаминантами и соблюдения принципов GMP. За последнее время в фармации значительно расширилась номенклатура фитосырья и фитопрепараторов. Лекарственное растительное сырье (ЛРС), составляющее основу фитопрепараторов, по своему происхождению контаминировано микрофлорой и является наиболее вероятным переносчиком спор микроорганизмов. В биосфере циркулирует огромное количество чужеродных живых организмов и синтетических химических веществ. Микробная контаминация растений зависит от окружающей среды (почва, воздух, вода). Изучение взаимодействий между растениями и микроорганизмами — одно из увлекательных и бурно развивающихся направлений современной биологии. Эти взаимодействия играют исключительно важную роль в жизни растений, обеспечивая их питание, защиту от патогенов и вредителей. В настоящее время устойчивость к антибиотикам стала международной проблемой, ежегодно в странах Европейского союза свыше 25 тысяч человек умирают от инфекций, обусловленных антибиотикорезистентными бактериями. Возможность преодоления резистентности связывают с разработкой антибиотиков следующего поколения на основе новых антимикробных веществ, натуральных и синтетических — антимикробные пептиды (АМП). Антимикробные пептиды системы врожденного иммунитета составляют основу противоинфекционной защиты организма человека, животных и растений. В настоящее время изучаются возможности их практического применения и создания антимикробных средств с оптимальными свойствами. Среди антимикробных веществ естественного происхождения интенсивно изучаются в последние годы антибиотические пептиды человека, животных и растений, являющиеся основными факторами противоинфекционной защиты системы врожденного иммунитета. АМП обладают высокой антимикробной, противовирусной, противоопухолевой активностью. Антимикробное действие АМП обусловлено, как правило, их быстрым мембранолитическим эффектом.

В последние годы управление рисками становится все более востребованным в условиях возрастающей конкуренции, повышения ответственности руководителей не только за качество выпускаемой продукции, но и в целом за принятие решений. Проблемы безопасности и управления рисками в фармацевтической и биотехнологической отраслях нужно рассматривать во взаимосвязи и с разных сторон. Фармацевтический продукт может быть опасен как бизнес-продукт, как социальный продукт и как информационный продукт. Стандарты управления рисками, разработанные FERMA, в скором времени планируется принять как международные стандарты ISO. В настоящее время фармацевтические предприятия активно работают над внедрением системы GMP в производство ЛС. В действительности, приведение производства лекарственных препаратов в соответствие со стандартами GMP призвано создать необходимые предпосылки для выпуска высококачественных и безопасных ЛС. Система анализа риска (НАССР) является первым шагом в переходе к работе по правилам надлежащей практики. Возможность немедленного внедрения системы анализа риска и контроля критических точек (НАССР — Hazard Analysis and Critical Control Point) в практику фармацевтического производства позволяет со значительной степенью надежности гарантировать высокое качество и безопасность конечного фармацевтического продукта. Во втором издании первого в России учебника для Высшей школы внесены новые разделы, которые подготовила Габитова А.Э.:

- GAP — Система выращивания растений;
- Микрофлора растительного лекарственного сырья;
- Микробно-растительные взаимодействия при росте и развитии растений:
 - Микробная обсемененность растений;
 - Микоризные микроорганизмы;
 - Эпифитная микрофлора;
 - Фитопатогенные грибы;
 - Бактерии — возбудители болезней растений;
 - Симптомы заболевания и типы бактериозов;
 - МИКОПЛАЗМЫ (ФИТОПЛАЗМЫ) Вирусы — растений.

Внесены в ряд разделов учебника проблемы микробиологического риска и риск — менеджмента в системе GMP и НАССР.

Книга предназначена для микробиологов, провизоров, технологов по производству фармпрепаратов и студентов профессиональных Высших учебных заведений, обучающихся по специальности 060108 Фармация, 240901 Биотехнология, 240902 Пищевая биотехнология, 020209 Микробиология и широкого круга специалистов, занятых в сфере лекарственного обращения.

ЧАСТЬ I

БИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1.1 Строение прокариотической клетки

Все живые организмы распределяются в трех сферах обитания: животный мир, растительный мир и мир простейших. На нашей планете насчитывается до 3 млн. видов животных и около полумиллиона видов растений. В 1886 г. немецкий биолог Э. Геккель предложил выделить все одноклеточные микроорганизмы (простейшие, грибы, бактерии), у которых отсутствует дифференцировка на органы и ткани, в отдельное царство — Protista (протисты, первосущества), включив в него организмы, во многих отношениях занимающие промежуточное положение между растениями и животными. В дальнейшем с учетом строения клеток протисты были подразделены на две четко разграниченные группы — низшие (прокариоты) (рис. 1) и высшие (эукариоты) (рис. 2).

Размеры отдельных представителей живого мира

Таблица 1.

Организм	Размер, мкм
Нанобактерии	$d < 0,05$
Поксвирусы	$d \sim 0,3$
Микоплазмы	$d = 0,3$
<i>Nanochlorum eukaryotum</i>	$d \sim 1,0-2,0$
<i>E. coli</i>	$1,1-1,5 \times 2,0-6,0$
Спирохеты	$1,5 \times 50,0$
<i>Oscillatoria</i> sp.	$d \sim 7,0$
Эритроцит	$d \sim 7,0$
<i>Epulopiscium fishelsoni</i>	$100,0 \times 600,0$
<i>Thiomargarita namibiensis</i>	$d \sim 750,0$

Величина клеток большинства прокариот находится в пределах 0,2-10,0 мкм (Таблица 1). Самыми крупными из до сих пор выделенных прокариот являются клетки *Epulopiscium fishelsoni*, обитающие в кишечнике глубоководной рыбы-хирурга, — до 600 мкм в длину и до 100 мкм в диаметре, и клетки *Thiomargarita namibiensis*, найденные в прибрежных водах Чили и Намибии, — от 400 до 750 мкм в диаметре. В то же время есть очень маленькая морская водоросль *Nanochlorum eukaryotum*, имеющая, однако, настоящее ядро, хлоропласти и митохондрии. Резюмируя эти данные, можно сказать, что на сегодняшний день размеры известных прокариотических микроорганизмов колеблются от 0,05 до 750 мкм.

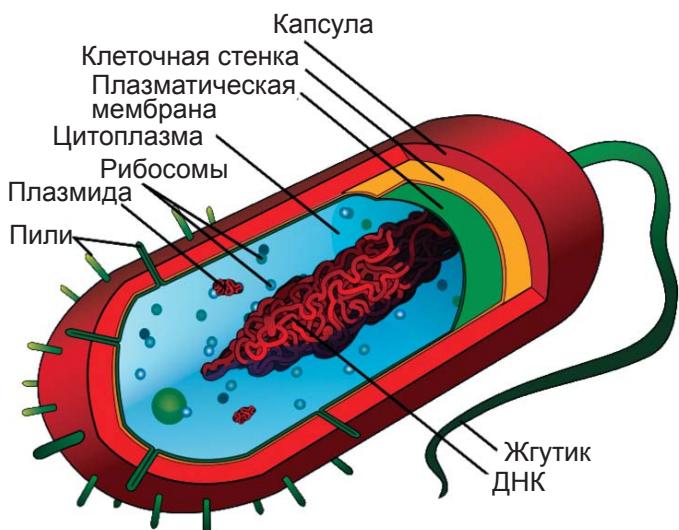


Рис. 1. Схема строения прокариотической клетки [1].

К низшим отнесены протисты, клетки которых по строению существенно отличаются от всех других организмов (бактерии и сине-зеленые водоросли), это — прокариоты (доядерные).

У высших протистов клетки сходны с растительными и животными клетками, это — эукариоты, т.е. микроорганизмы, имеющие истинное ядро (от греч. эу — истинный, карио — ядро). Ядро отделено от окружающей его цитоплазмы двухслойной ядерной мембраной с порами. В ядре находятся 1...2 ядрышка — центры синтеза рибосомальной РНК и хромосомы — основные носители наследственной информации, состоящие из ДНК и белка. При делении хромосомы распределяются между дочерними клетками в результате сложных процессов — митоза и мейоза. Цитоплазма эукариот содержит митохондрии, а фотосинтезирующих организмов — хлоропласти. Цитоплазматическая мембрана, окружающая клетку, переходит внутри цитоплазмы в эндоплазматическую сеть; имеется также мембранные органеллы — аппарат Гольджи, как компонент цитоплазмы (рис. 2).

К эукариотам отнесены микроскопические водоросли (кроме сине-зеленых), микроскопические грибы (плесени и дрожжи).

Бактерии освоили самые разнообразные среды обитания: они живут в почве, пыли, воде, воздухе, на внешних покровах животных и растений и внутри

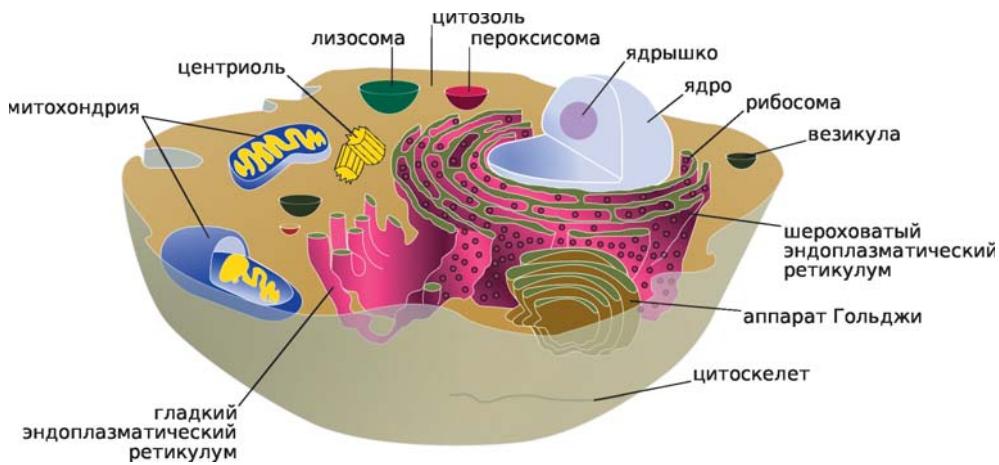


Рис. 2. Модель организации эукариотической клетки [1].

организма. Их можно обнаружить даже в горячих источниках, где они живут при температуре около 60°С или выше. Численность бактерий трудно определить: в 1 г плодородной почвы может находиться до 100 млн., а в 1 см³ парного молока — 3000 бактерий. Жизнедеятельность микроорганизмов имеет важное значение для всех остальных живых существ, т. к. бактерии и грибы разрушают органическое вещество и участвуют в круговороте веществ в природе. К тому же бактерии приобретают все большее значение в жизни людей, и не потому, что они вызывают различные заболевания, а потому, что их можно использовать для получения многих необходимых продуктов.

Прокариотические клетки устроены проще, чем эукариотические клетки. В них нет четкой границы между ядром и цитоплазмой, отсутствует ядерная мембрана; ДНК не образует структур, похожих на хромосомы эукариот, поэтому у прокариот происходят только процессы митоза. У большинства прокариот отсутствуют внутриклеточные органеллы, ограниченные мембранами, а также митохондрии и хлоропласты; рибосомы свободно лежат в цитоплазме.

К прокариотическим организмам отнесены синезеленые водоросли, бактерии, риккетсии, актиномицеты и микоплазмы [2, 3].

В настоящее время описано более 3,5 тыс. видов бактерий, но их число постоянно возрастает. Разобраться в этом поразительном многообразии возможно благодаря систематике. Систематика (от греч. *systema* — целое, составленное из частей; *systematicus* — упорядоченный) — наука о классификации организмов, их эволюционном родстве и взаимоотношениях друг с другом.

Классификация (от лат. *classis* — разряд, группа) — это распределение множества организмов на основе учета их общих признаков на классы, группы (таксоны); составная часть систематики.

Таксономия (от греч. *taxis* — расположение по порядку, закон) — теория классификации, систематизации живой природы.

Термины «систематика» и «таксономия» часто употребляют как синонимы, однако систематика представляет собой более широкое понятие.

Систематика включает в себя три самостоятельные составные части: классификацию, идентификацию и номенклатуру. Классификация, как уже упоминалось, — это распределение организмов на таксономические группы.

Идентификация — это определение принадлежности изучаемого организма к тому или иному таксону (классу, порядку, семейству, роду, виду и пр.).

Номенклатура — это свод правил присвоения названий таксонам и список этих названий. Номенклатура — это заключительный этап систематики после классификации, выполняет функции «информационного языка» и до некоторой степени независима от классификации.

До второй половины XIX в. классификация основывалась на внешних проявлениях организма — фенотипах (морфология, подвижность, окраска по Граму, наличие капсулы, способность образования эндоспор, культурально-биохимические свойства и некоторые другие признаки), так как наследственная структура организмов — генотипы — была еще недоступна для исследования.

Следовательно, традиционная, или классическая, систематика, основанная на изучении внешних, проявляющихся в процессе жизнедеятельности признаков, — целиком фенотипическая систематика (феносистематика). Расширение доступной исследователю информации о фенотипе и использование вычислительной техники для ее обработки привело к появлению нового направления — численной (числовой, или нумерической) таксономии.

Возникновение (в 50-х гг. XX в.) и успешное развитие молекулярной биологии способствовали становлению нового направления в систематике, названного отечественными учеными геносистематикой. Геносистематика, в отличие от феносистематики, занимающейся изучением множества признаков, базируется на исследовании только одного вещества — наследственного материала (ДНК) клетки, в котором запрограммировано индивидуальное развитие организма. Иначе говоря, геносистематика — это раздел систематики, предметом исследования которого

являются генотипы, или генетические программы, созданные в процессе биологической эволюции на Земле. Разница между феносистематикой и геносистематикой заключается в том, что они принципиально отличаются объектами исследования.

В классификации родственных микроорганизмов используют следующие таксономические категории: царство (*regnum*), отдел (*divisio*), секция (*section*), класс (*classis*), порядок или отряд (*ordo*), семейство (*familia*), род (*genus*), вид (*species*). Название микроорганизмам присваивают в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий.

В микробиологии, как и в биологии, для обозначения видов бактерий принята двойная (бинарная) номенклатура, предложенная еще в XVIII в. К. Линнеем. Согласно номенклатуре название рода пишется латинскими буквами с прописной: первое слово обозначает родовую принадлежность микробы (какой-либо морфологический признак, фамилию ученого, открывшего этот микроб, и др.); второе слово — название вида — пишется со строчной буквы. Видовое название микроорганизма, как правило, представляет собой производное от существительного, дающего описание либо цвета колонии, либо источника обитания микроорганизма, вызываемого им процесса или болезни и других отличительных признаков. Например, *Escherichia coli* указывает, что микроб открыл Эшерих, *coli* — обитатель кишечника; *Bacillus anthracis* — микроб образует споры, *anthracis* — возбудитель сибирской язвы; *Azotobacter* — микроорганизм, фиксирующий атмосферный азот.

Основной номенклатурной единицей служит *вид*. В. Д. Тимаков (1973) дает ему следующее определение: «Вид — это совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходных по морфологическим и биологическим свойствам, обладающих наследственно закрепленной способностью вызывать в среде естественного обитания качественно определенные специфические процессы». Вид подразделяют на подвиды или варианты. Если при изучении выделенных бактерий обнаруживают отклонение от типичных видовых свойств, то такую культуру рассматривают как подвид. Существуют также и инфраподвидовые подразделения, обусловленные отклонением какого-либо небольшого наследственного признака: антигенного — *серовар*, биохимического — *биовар*, отношения к фагам — *фаговар*, патогенности — *патовар* и др. Введение в слова общей части «вар» (вариант) рекомендовано во избежание возможных недоразумений, ранее применявшийся термин «тип» использован для обозначения номенклатурного типа.

В микробиологии используют следующие термины: «чистая и смешанная культура», «клон» и «штамм». Под термином «культура» понимают микроорганизмы, выращенные на плотной или в жидкой

питательной среде в условиях лаборатории. Культуру микроорганизмов состоящую из особей одного вида называют *чистой культурой*. *Смешанной культурой* называют смесь неоднородных организмов, выросших в питательной среде при посеве исследуемого материала (молока, почвы, воды, патологического материала) или при попадании в питательную среду, засеянную одним видом микробы, еще и другого вида микробы из внешней среды. *Клон* — это культура, полученная из одной популяции клетки определенного вида микробы. *Штамм* — чистая культура определенного вида микробы, выделенная из того или иного объекта и отличающаяся от эталонного штамма незначительными изменениями свойств (например, чувствительностью к антибиотикам, ферментацией углеводов и др.).

Следовательно, прокариоты составляют отдельную классификационную группу микроорганизмов, они существенно отличаются от эукариотных микроорганизмов, к которым принадлежат грибы, растения, животные и человек (табл. 2). В литературе традиционно принято называть представителей прокариот «бактериями» [4]. В зависимости от особенностей клеточной оболочки бактерии подразделяют на четыре основные категории: (1) грамотрицательные бактерии, (2) грамположительные бактерии, (3) бактерии, лишенные клеточных стенок, (4) архебактерии. Первые две группы имеют ригидные клеточные стенки, жесткий каркас которых составляет пептидогликан муреин, содержащий мурамовую кислоту. К ним относится большинство возбудителей инфекционных заболеваний и сапротрофных микроорганизмов. Бактерии, лишенные ригидной клеточной стенки и поэтому не имеющие постоянной формы клеток, называют микоплазмами. Среди них имеются виды, патогенные для человека (*Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans*), животных и растений.

Архебактерии не содержат муреина в клеточной стенке, что делает их устойчивыми к β -лактамным антибиотикам. По особенностям молекулярного строения они значительно отличаются от других прокариот. Преимущественно это почвенные или водные микроорганизмы, обитающие в экстремальных условиях (в среде с высоким содержанием солей, сильно-кислой, при высокой температуре). Кроме того, среди них имеются симбионты в пищеварительном тракте теплокровных.

1.2 Морфология

Прокариоты — это одноклеточные микроорганизмы, диаметр клеток которых обычно составляет от 0,2 до 2 мкм (рис. 1). По форме клеток их подразделяют на три основные группы: сферические (кокки), цилиндрические (бактерии, бациллы) и спиралевидные (спириллы, спирохеты) (рис. 3).

Морфология прокариотов и эукариотов

Таблица 2.

Признак	Прокариоты	Эукариоты
1. Цитологические свойства		
Нуклеоид (нуклеоплазма, генофор) отделен от цитоплазмы мембраной	—	+
Диаметр клетки:		
обычно 0,2-2 мкм	+	—
обычно > 2 мкм	—	+
Митохондрии	-	+
Хлоропласти (у фототрофов)	-	+
Вакуоли, если присутствуют, окружены мембраной	-	+
Аппарат Гольджи	-	D
Лизосомы	-	D
Эндоплазматический ретикулум	-	+
Локализация рибосом:		
рассеяны в цитоплазме	+	—
прикреплены к эндоплазматическому ретикулуму	—	+
Ток цитоплазмы, эндоцитоз, экзоцитоз	-	D
Диаметр жгутиков (если присутствуют):		
0,01-0,02 мкм	+	—
около 0,2 мкм	—	+
Эндоспоры	D	-
2. Химические признаки		
Полигидроксибутират как запасное вещество в виде включений в цитоплазму	D	—
Тейхоевые кислоты в клеточной стенке	D	-
Полиненасыщенные жирные кислоты в составе мембран	Редко	Обычно
Стеролы в составе мембран	D	Обычно
Диаминопимелиновая кислота в составе клеточных стенок	D	-
Пептидогликан, содержащий муравовую кислоту, в составе клеточных стенок	D	-
3. Метаболические свойства		
Клетка поглощает питательные вещества в виде малых молекул Крупные молекулы или частицы должны быть предварительно гидролизованы внеклеточными ферментами	+	D
Компоненты систем дыхания и фотосинтеза (у фототрофов) локализованы в цитоплазматической мемbrane или ее инвагинатах	+	-
Хемолитотрофный тип метаболизма	D	-
Фиксация N ₂	D	-
Способность к диссимиляционному восстановлению N ₂ O ₃ до N ₂ O или N ₂	D	-
Метаногенез	D	-
Аноксигенный фотосинтез	D	-
Особенности размножения		
Деление клеток без образования системы веретена	+	—
Деление клеток путем митоза с участием системы веретена	-	+
Мейоз	-	D
Молекулярно-биологические свойства		
Число хромосом в одном нуклеоиде или ядре	Обычно 1	Обычно > 1
Хромосомы кольцевые	+	-
Хромосомы линейные Рибосомы:		
70 S	+	—
80 S	—	+
Рибосомальные РНК:		
16 S, 23 S, 5 S	+	—
18 S, 28 S, 5,85 S, 5 S	—	+

По форме клеток их подразделяют на три основные группы: сферические (кокки), цилиндрические (бактерии, бациллы) и спиралевидные (спироиллы, спирохеты) (рис. 4). Кокки по своей форме могут быть сферическими, эллипсовидными, бобовидными и ланцетовидными. По расположению клеток различают

диплококки, стрептококки, тетракокки, сардины, стафилококки.

Микрококки (*micrococcus*) характеризуются одиночным, парным или беспорядочным расположением клеток. Род включает условно-патогенные (*M. luteus*) и сапротрофные виды.

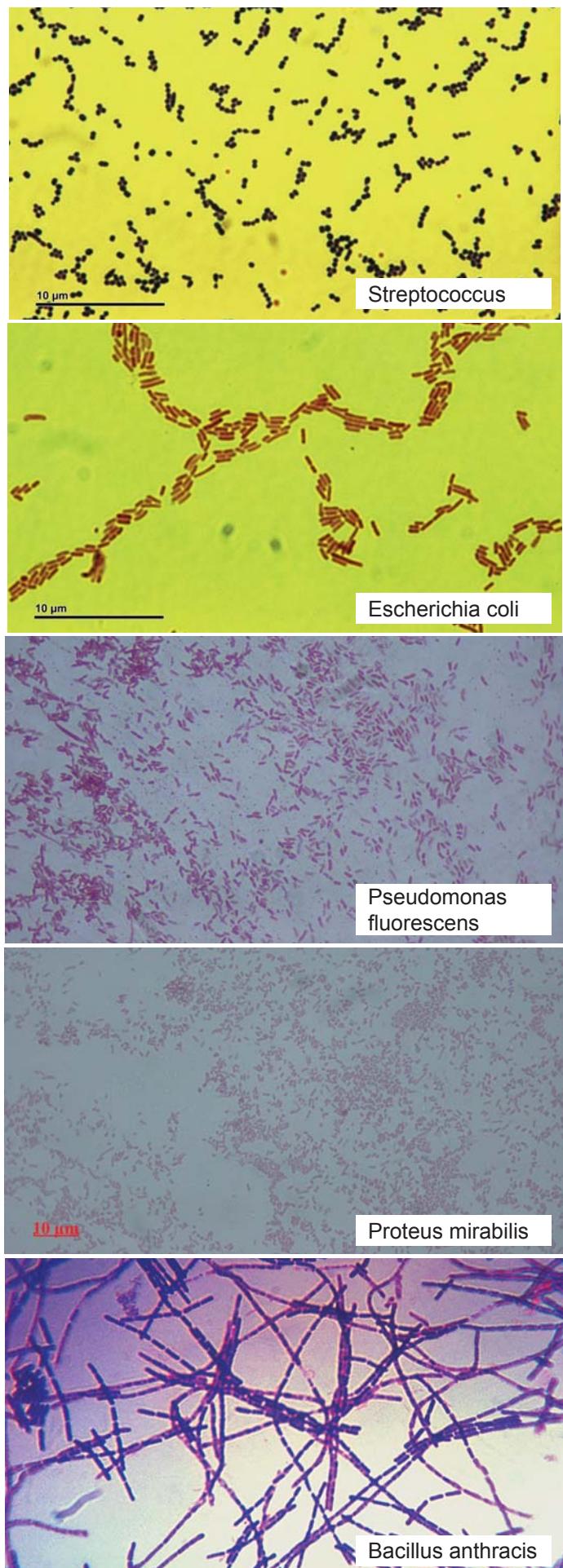


Рис. 3. Представители мира прокариот.

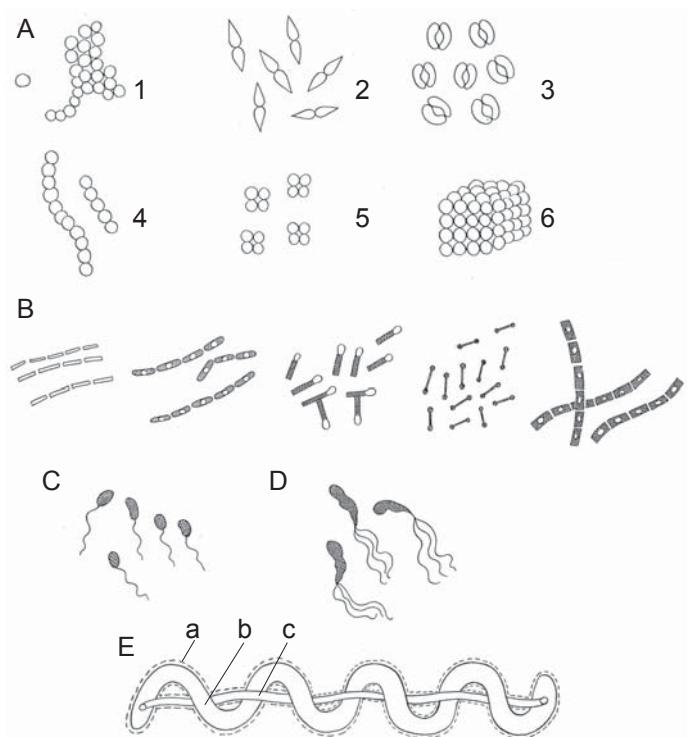


Рис. 4. Морфология бактерий. А. Сферические клетки, располагающиеся группами (1 — *Staphylococcus*), парами (2, 3 — *Neisseria*), цепочками (4 — *Streptococcus*), тетрадами (5 — *Micrococcus*), кубическими пакетами (6 — *Sarcina*). В. Цилиндрические (палочковидные) клетки. С. Вибрионы. Д. Спироиллы. Е. Спирохета — схема строения: а — наружная мембрана, б — протоплазматический цилиндр, в — периплазматические жгутики [2].

Диплококки образуют пары. К ним относятся возбудители менингита и гонореи.

Стрептококки (*streptos* — извитой) располагаются цепочками. Среди них имеются патогенные виды (*S. pyogenes*).

Тетракокки располагаются по четыре, сарцины (*sarcio* — соединяю) образуют пакеты по 8, 16 и более клеток. В основном это сапротрофные виды.

Стафилококки (*staphylos* — гроздь) образуют скопления в виде виноградной грозди. Среди них имеются патогенные (*S. aureus*) виды.

Цилиндрические (палочковидные) формы микробов включают бактерии (палочки, не образующие споры), бациллы и клостридии (спорообразующие формы). Они различаются по размерам, форме и расположению клеток. Среди них имеются представители нормальной микробиоты человека (*Escherichia coli*) и патогенные виды (возбудители кишечных инфекций, столбняка, сибирской язвы, анаэробной инфекции и др.).

Спиралевидные формы включают спироиллы, имеющие жесткую клеточную стенку, и спирохеты, клеточная стенка которых эластична и обеспечивает их подвижность. *Spirillum minor* — возбудитель содо-

ку — болезни, передающейся через укус грызунов. Спирохеты — возбудители многих инфекционных заболеваний (см. ниже).

Кроме указанных основных форм, среди прокариот имеются виды, отличающиеся более сложным строением. Это *актиномицеты*, к которым относится большинство продуцентов антибиотиков и некоторые патогенные виды.

1.3 Актиномицеты

Актиномицетов относят к грамположительным бактериям. С бактериями их сближает отсутствие настоящего ядра (прокариоты), их относят к мицелиальным прокариотам. Однако по морфологическим, физиологическим, биологическим и экологическим признакам актиномицеты составляют самостоятельную группу. Вегетативное тело актиномицетов (мицелий) представлено очень тонкими (в 5-7 раз тоньше, чем грибные, ветвящимися гифами (рис. 5).

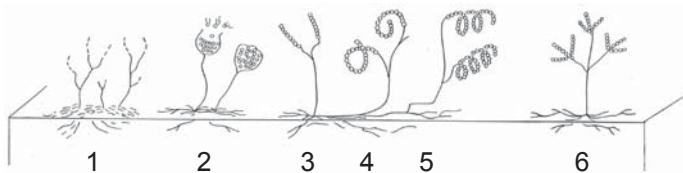


Рис. 5. Актиномицеты. Схема роста воздушного и субстратного мицелия родов: 1 — *Nocardia*, 2 — *Actinoplanes*, 3-5 — *Streptomyces*, 6 — *Streptoverticillium* [2].

Размножаются актиномицеты участками мицелия или спорами. На питательных средах актиномицеты образуют сначала кожистые колонии (субстратный мицелий), которые затем покрываются воздушным мицелием. Сама колония врастает в агар субстратным мицелием. Питание актиномицетов не специализировано. Они используют различные животные и растительные остатки.

Большинство актиномицетов ведут сапротрофный образ жизни, и только некоторые из них приспособились к паразитическому существованию на растениях.

Среди патогенных актиномицетов наибольший интерес представляют виды рода *Streptomyces*, вызывающие паршу у растений. Наиболее известны обыкновенная парша клубней картофеля и парша корнеплодов свеклы, моркови.

Паршу картофеля вызывает *Streptomyces scabies*. Заболевание развивается на клубнях во время вегетации растения. В местах заражения появляются трещины, небольшие бородавки, происходит опробкование пораженной ткани, образуются язвы.

Оксигенные фототрофные бактерии (цианобактерии) — обитатели воды и почвы, вызывают цветение водоемов, некоторые виды образуют токсины, опасные при употреблении цветущей воды. Могут

служить источником биологически активных веществ (фикоцианин) или употребляться как пищевая добавка (*Spirulina maxima*).

В микробиологии существуют два различных подхода к систематике, обусловливающие два вида классификации. В основе первого лежит идея создания естественной (филогенетической) классификации прокариот, т. е. построения единой системы, объективно отражающей родственные отношения между разными группами микробов и историю их эволюционного развития. Второй подход к систематике преследует практические цели и служит для идентификации, т. е. установления принадлежности микроорганизма к определенному виду. Это искусственная классификация (традиционная). Современные системы классификации микроорганизмов, по существу, все искусственные. На их основе созданы определители для идентификации того или иного микроорганизма: «Определитель бактерий и актиномицетов» Н. А. Красильникова (1949).

1.4 Классификация прокариотических микроорганизмов

В определителе бактерий Д. Х. Берджа [3] все прокариотические микроорганизмы объединены в царство *Prokaryotae*, которое подразделяется на четыре отдела, которые делятся на секции, классы, порядки, семейства, роды, виды.

Отдел I. *Gracilicutes* (от лат. *gracilis* — тонкий, стройный, *cutes* — кожа). Включает в себя грамотрицательные микроорганизмы. В отделе девять секций.

Секция 1. Спирохеты. Порядок *Spirochaetales*. Включает в себя два семейства: *Spirochaetaceae* (четыре рода), *Leptospiraceae* (один род).

Секция 2. Спиралевидные и изогнутые аэробы (микроаэрофилы). Одно семейство — *Spirillaceae*, в котором шесть родов. Патогенны для человека и животных микроорганизмы рода *Campylobacter*.

Секция 3. Грамотрицательные неподвижные изогнутые бактерии. Одно семейство — *Spirosomonaceae*, в котором патогенных три рода.

Секция 4. Аэробные грамотрицательные палочки, округлые и кокки. Восемь семейств, два из которых имеют патогенные микроорганизмы. Семейство *Pseudomonadaceae* включает в себя четыре рода, более 25 видов, среди которых имеются патогенные (*A. mallei* и др.). Семейство *Neisseriaceae* имеет 16 родов. Роды *Neisseria* и *Moraxella* содержат патогенные для человека и животных микроорганизмы.

Роды *Bordetella*, *Brucella* и *Francisella* не внесены в семейства: содержат патогенные для человека и животных микроорганизмы.

Секция 5. Грамотрицательные факультативные анаэробы. Три семейства: *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* и *Pasteurellaceae*. Семейство

Enterobacteriaceae имеет 14 родов (*Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia* и др.). Семейство *Vibrionaceae* имеет два рода. В род *Vibrio* включены патогенные микроорганизмы. Семейство *Pasteurellaceae* имеет три основных рода: *Pasteurella*, *Haemophilus* и *Actinobacillus*. Содержат патогенные виды микроорганизмов.

Секция 6. Строгие анаэробы. Изогнутые грамотрицательные палочки. Одно семейство — *Bacteroidaceae*, в котором 13 родов, среди которых имеются патогенные.

Секция 7. Диссимилирующие и разлагающие сульфат бактерии. Семь непатогенных родов.

Секция 8. Анаэробные грамотрицательные кокки. Одно семейство — *Vellonellaceae*, в котором три рода.

Секция 9. Риккетсии и хламидии. Два порядка: *Rickettsiales* и *Chlamydiales*. Порядок *Rickettsiales* имеет три семейства: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* и *Anaplastaceae*. Семейство *Rickettsiaceae* имеет три трибы, в которые внесено восемь родов. Семейство *Bartonellaceae* содержит два рода, а *Anaplastaceae* — четыре. Порядок *Chlamydiales* имеет одно семейство *Chlamydiaceae* и один род — *Chlamydia*. Все семейства содержат патогенные микроорганизмы.

Отдел II. *Firmicutes* (от лат. *firmis* — крепкий, *cutes* — кожа). В отдел включены главным образом грамположительные бактерии.

Секция 12. Грамположительные кокки. Два семейства: *Micrococcaceae* и *Deinococcaceae*. Семейство *Micrococcaceae* имеет четыре рода: *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*.

В секцию кроме указанных двух семейств внесены десять самостоятельных родов: *Streptococcus*, *Leuconostos*, *Pedicoccus*, *Sarcina* и др.

Секция 13. Спорообразующие грамположительные палочки и кокки. Шесть родов: *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* и др. Первые два рода имеют патогенные виды.

Секция 14. Неспорообразующие грамположительные палочки. Семь родов: *Lactobacillus*, *Listeria*, *Erysipetrix* и др. Имеются патогенные.

Секция 15. Неспорообразующие внутриклеточные грамположительные палочки. 21 род: *Corynebacterium*, *Micobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Asotobacterium*, *Bifidobacterium*, *Actinomices* и др.

Секция 16. Микобактерии. Одно семейство *Mycobacterioceae*. Семейство имеет один род *Mycobacterium*, в котором 49 видов: *Myc. tuberculosis*, *Myc. bovis*, *Myc. avium*, *Myc. paratuberculosis*, *Myc. lepra* и др.

Секция 17. *Nocardioforms*. Девять родов: *Nocardia*, *Pseudococcus*, *Pseudonocardia* и др.

Отдел III. *Tenericutes*. Объединены грамотрицательные прокариоты без клеточной стенки, но имеющие цитоплазматическую мембрану. В отделе десятая секция — микоплазмы, класса *Mollicutes* (от лат. *mollis* — мягкий, *cutes* — покров, кожа). В классе один порядок — *Mycoplasmatales* — и три семейства: *Mycoplastaceae*, *Acholeplastaceae*, *Spiroplastaceae*. В основном патогенные микоплазмы включены в семейство *Mycoplastaceae*.

Секция 11. Эндосимбионты.

Отдел IV. *Mendosicutes*. Прокариоты, среди которых нет патогенных бактерий; метанобразующие, сероокисляющие, галофилы, микоплазмоподобные, термоацидофильные и другие наиболее древние по происхождению бактерии (архебактерии).

1.5 Строение клетки

Клеточная стенка обеспечивает поддержание жесткости структуры клетки, постоянства ее формы и механической прочности. Кроме того, она является осмотическим барьером, имеющим зоны избирательной проницаемости для веществ различной химической природы. В качестве опорного каркаса она содержит пептидогликан муреин. Основу муреина (рис. 6) составляют цепи чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенные β -1,4-гликозидными связями. Остатки мурамовой кислоты соединены полипептидными цепочками, в состав которых входят α -аланин, D-аланин, лизин, D-глутаминовая и мезодиаминопимелиновая кислоты.

Аминокислоты D-ряда и мурамовая кислота уникальны для прокариот, своеобразие структуры клеточной стенки служит основой избирательного действия некоторых антибиотиков, например пенициллина и других β -лактамов. Клеточные стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий существенно отличаются по своей структуре.

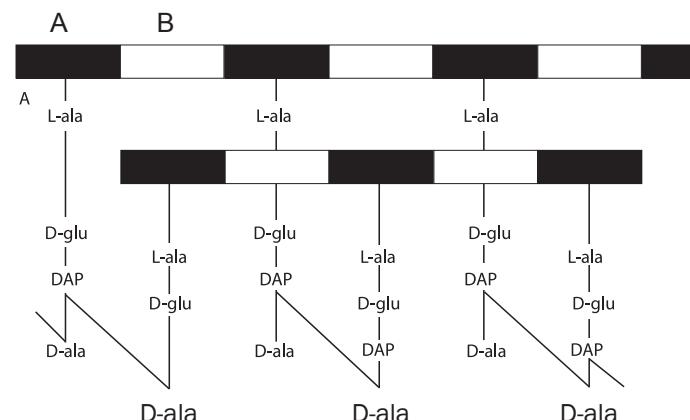


Рис. 6. Пептидогликан *E. coli*: A-N-ацетилмурамовая кислота; B-N-ацетил-глюкозамин; ala — аланин; glu — глутаминовая кислота; DAP — диаминопимелиновая кислота.

У грамотрицательных бактерий муреиновая сеть однослойная, иногда двуслойная и составляет не более 10% сухой массы клеточной стенки. На ней располагаются белки, липопротеиды, липополисахариды и фосфолипиды, входящие в состав внешней мембраны (рис. 7). Стабилизация этих компонентов обеспечивается ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} . Существенное значение для структуры и функции внешней мембраны имеет липид A. Его скелет содержит дисахарид, состоящий из остатков D-глюкозамина, соединенных β -1,6-связью, имеющих в положении 1 и 4 фосфатные группы. Скелет этерифицирован жирными кислотами C_{12} , C_{14} и C_{16} . Липид A имеет уникальную конформацию — компактную и высокоупорядоченную, благодаря чему создает в мембране вязкую структуру, которая затрудняет диффузию желчных кислот, дегрентов и некоторых антибиотиков. Липид A обеспечивает токсичность и пирогенность липополисахарида. Антигенная специфичность грамотрицательных бактерий, главным образом, определяется углеводами O-замещенных боковых цепей, выступающих наружу с поверхности клетки. Внешняя мембрана определяет высокую устойчивость грамотрицательных бактерий по сравнению с грамположительными к антимикробным агентам.

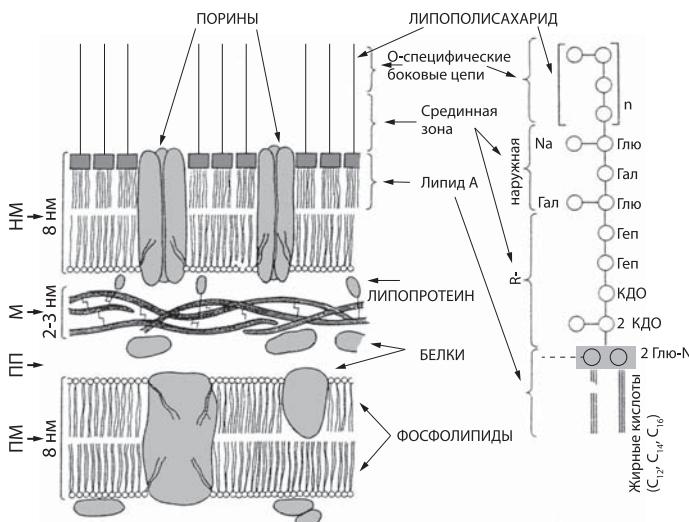


Рис. 7. Модель строения цитоплазматической мембраны грамотрицательных бактерий: Справа представлена липополисахаридная молекула. Глю — глюкоза; Глю-Н — глюкозамин; НА = N-АцГлю-N-ацетилглюкозамин; Гал — галактоза; Геп — гептоза; КДО — 2-кето-3-дезоксиоктоновая кислота; М — муреин; НМ — наружная мембрана; ПМ — плазматическая мембрана; ПП — периплазматическое пространство [7].

Антибиотики широкого спектра, например беталактамы, вызывают освобождение липополисахаридов из внешней мембраны, что может привести к эндотоксическому шоку у больного.

У грамположительных бактерий внешняя мембрана отсутствует, а муреиновая сеть составляет 30-70% сухой массы клеточной стенки и достигает 40 слоев. Характерно наличие тейхоевых и тейхуроновых кислот (рис. 8), обеспечивающих отрицательный заряд клетки и способствующих сорбции катионов из окружающей среды. У некоторых микроорганизмов могут присутствовать добавочные компоненты — липиды, воска, миколовые кислоты, протеины, полисахариды.

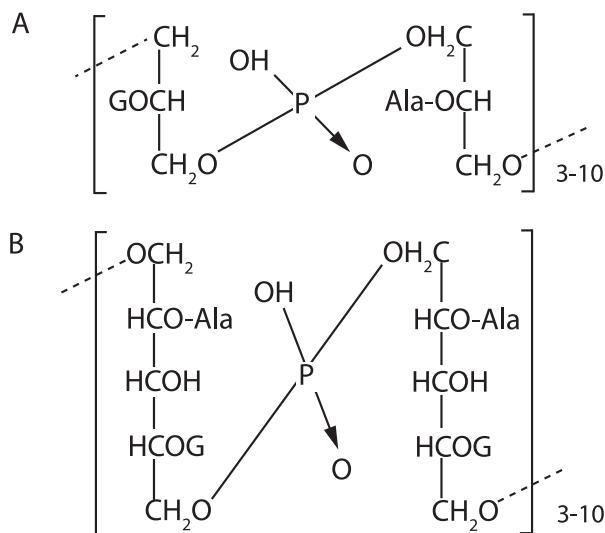


Рис. 8. Модель строения цитоплазматической мембраны Гр+ бактерий. А — глицеролтейхоевая кислота; В — рибitolтейхоевая кислота G — гликозил, Ala — аланил.

Различие в структуре клеточной стенки двух групп микроорганизмов выявляют с помощью окрашивания по Граму. Препарата обрабатывают раствором кристаллического фиолетового, затем йода. Образующийся комплекс красителя с йодом располагается на протоплазме. При обработке препарата спиртом он удерживается клеточной стенкой грамположительных бактерий и вымывается — у грамотрицательных. Способность окрашиваться по Граму — важный таксономический признак, с которым коррелируют другие свойства бактерий.

S-слой (surface — поверхность) располагается на поверхности клеток всех прокариот и покрывает целиком всю клетку. Он состоит из структурных единиц — протеинов или гликопротеинов, образующих монослои, структура которого типична для двухмерных кристаллов (решетка гексагональной, косой или квадратной симметрии). Взаимодействие между субъединицами и подлежащими структурами происходит за счет нековалентных связей. *S-слой* обеспечивает защиту клетки от внешних воздействий, однако при продолжительном культивировании он может быть утрачен без потери жизнеспособности штамма.

Капсулы и *слизы* образуются у некоторых бактерий снаружи от клеточной стенки, как ее внешний слой. Способность к их формированию не является видовым признаком: могут существовать капсулные и бес-

капсулные штаммы. У патогенных микроорганизмов капсула обеспечивает защиту от фагоцитоза, повышая вирулентность штамма (у пневмококков). У микробов, обитающих в почве и на растениях, капсула защищает клетки от высыхания, солнечной радиации, биоцидов. Капсулы и слизь создают для микробных клеток осмотические условия, благоприятствующие сорбции питательных веществ из субстрата, способствуют адгезии клеток между собой и субстратом. Многие экзоферменты локализуются в капсule, где происходят превращения веществ, поступающих в клетку (рис. 9).

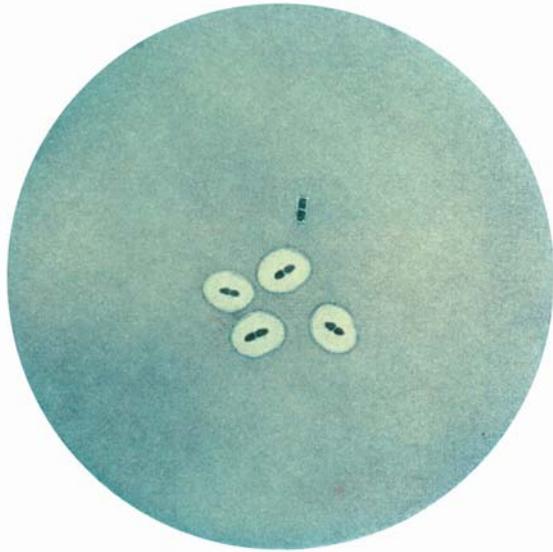


Рис. 9. Капсулы вокруг клеток *Clostridium*.

У большинства бактерий капсулы и слизь имеют полисахаридную природу. У некоторых бацилл это полипептиды в основном D- и L-глутаминовой кислоты.

Капсулные полисахариды обладают антигенной специфичностью и используются для изготовления вакцин (у пневмококков, менингококков), для идентификации и классификации (у сальмонелл). Растворимые слизи (декстран *Leuconostoc dextranicum*, *L. mesenteroides*, ксантан *Xanthomonas campestris*) получают в промышленных масштабах и широко используют в фармации и других областях.

Протопласти и сферопласти — это структуры, полностью (протопласти) или частично (сферопласти) утратившие клеточную стенку, например, под действием лизоцима или пенициллина. Это осмотически лабильные элементы, которые могут существовать только в гипертонических растворах. Они сохраняют биологическую активность и способны в специальных условиях revertirовать в нормальные клетки. Используются в клеточной инженерии для получения гибридных форм микроорганизмов.

L-формы, получившие свое название в честь института Листера в Лондоне, образуются в условиях, приводящих к нарушению синтеза клеточной стенки; например, у большого туберкулезом возбудитель под влиянием лекарственных веществ может превратиться в L-форму.

При этом микобактерии теряют характерную кислотоустойчивость, что затрудняет их выявление и диагностику заболевания. Для таких клеток характерны неправильные формы, иногда нитевидные, способные проходить через поры бактериальных фильтров. Лабильные L-формы способны revertirовать в нормальные клетки. Стабильные формы не образуют клеточной стенки, поскольку ее потеря связана с изменением генотипа (мутацией).

Периплазматическое пространство располагается между слоем муреина и цитоплазматической мембраной. В нем находятся ферменты гидролазы, расщепляющие вещества, поступающие в клетку, и полимеразы, участвующие в синтезе клеточной стенки и капсул, а также белки, принимающие участие в транспорте субстратов в цитоплазму, и белки — рецепторы хемотактических стимулов.

Цитоплазматическая мембрана располагается под клеточной стенкой и отделяет от внешней среды цитоплазму. Имеет толщину 6-8 нм и составляет 8-15% сухого вещества клетки. Ее структура соответствует общему принципу организации мембран про- и эукариотических клеток. Она состоит из двух слоев молекул липидов, у которых гидрофобные цепочки жирных кислот ориентированы перпендикулярно ее плоскости, а гидрофильные полярные части молекул соединены с молекулами белков за счет полярного, электростатического и гидрофобного взаимодействия. Молекулы липидов и белков не сохраняют фиксированной ориентации, но находятся в постоянном движении внутри остова данной мембраны (рис. 10)

Структура грамположительной клеточной стенки. Клеточная стенка содержит до 40 слоев пептидогликана. Молекулы тейхоевых кислот ковалентно связаны с пептидогликаном (ПГ). Липотеихоевые кислоты (ЛТК) содержат липидные «хвостики», закрепленные в гидрофобной области ЦПМ. Клеточные стенки могут иметь белковые слои на поверхности. Белковые структуры располагаются или островками (как показано на схеме), или тесно упаковываются, образуя S-слой.

Структура грамотрицательной клеточной стенки. Тонкий слой пептидогликана сверху покрыт внешней мембраной (ВМ), прикрепленной к нему липопротеидами (ЛП). Между двумя мембранами — периплазматическое пространство со слоем пептидогликана (ПГ) внутри него. Внешняя мембрана на внутренней поверхности содержит фосфолипиды, на внешней — липополисахариды (ЛПС). ЛПС состоят из липидной части, обращенной внутрь внешней мембраны, формируя ее гидрофобную область, и полисахаридной части, обращенной во внешнюю среду.

Липиды, в основном, полярные фосфолипиды, составляют около 40% массы мембраны. Они выполняют структурные функции и обеспечивают конформационные изменения молекул ферментов, необходимые для проявления их активности.

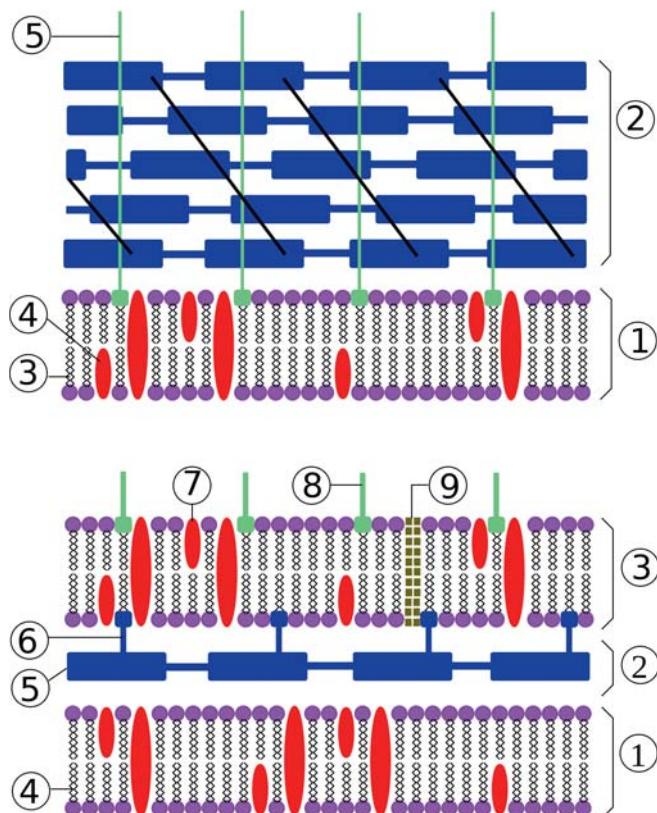


Рис. 10. Структура бактериальной клеточной стенки.

Вверху: грамположительная клеточная стенка. 1. Цитоплазматическая мембрана, 2 — ПГ, 3 — фосфолипид, 4 — протеин, 5 — липотефоевая кислота. Внизу: грамотрицательная клеточная стенка. 1 — внутренняя мембрана, 2 — периплазматическое пространство, 3 — внешняя мембрана, 4 — фосфолипид, 5 — ПГ, 6 — ЛП, 7 — протеин, 8 — ЛПС, 9 — порины.

Белки мембран подразделяют на периферические и интегральные. Первые находятся на поверхности, вторые погружены в толщу мембраны. Белки-порины выстилают поры мембран, обеспечивая ее проницаемость. Определенные белки мембран выполняют катализитические функции или являются рецепторами, связывающими вещества, необходимые для клетки.

Цитоплазматическая мембрана служит осмотическим барьером, в ней локализуются системы активного транспорта веществ в клетку и из клетки.

Мезосомы — особые структуры, образуемые путем инвагинации (впячивания) мембраны, содержат ферменты системы окислительного фосфорилирования и выполняют у прокариот функции митохондрий.

Цитоплазма составляет внутреннюю среду клетки. Это сложная высокогетерогенная система, в ней располагается генетический материал клетки (нуклеоид, плазмиды), 70 S рибосомы, ферментные системы, выполняющие метаболические функции, резервные вещества (полисахариды, липиды, полигидроксимасляная кислота, полифосфаты, сера у серобактерий). Основная часть метаболических процессов осуществляется в цитоплаз-

ме. Мембранные структуры, располагающиеся в цитоплазме, наиболее развиты в клетках эукариот, у бактерий имеются их аналоги (мезосомы, вакуоли, лизосомы).

Жгутики предназначены для передвижения бактерии (рис. 11).

Перемещаться без жгутиков способны цианобактерии, скользящие бактерии и спирохеты. Число жгутиков и их расположение на клетке — таксономический признак, характерный для определенных видов.

Монотрихи — бактерии с одним жгутиком на конце (*Vibrio cholerae*); амфитрихи имеют полярно расположенные жгутики на двух концах (*Spirillum volutans*); лофотрихи — пучок жгутиков на одном конце (*Alcaligenes faecalis*); у перитрихов жгутики расположены по всей поверхности клетки (*E. coli*, *Salmonella* spp.) (рис. 12).

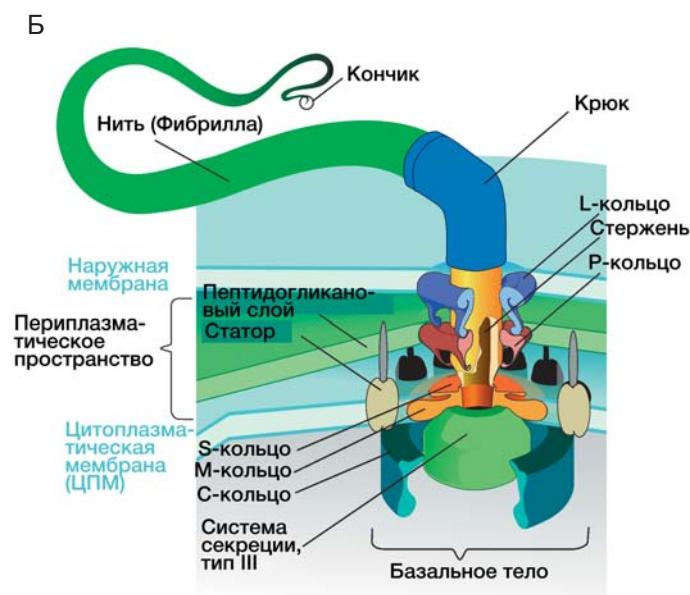
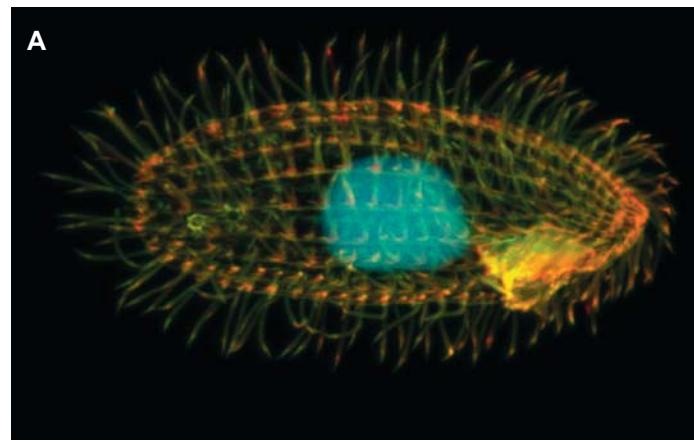


Рис. 11. Органоиды движения у микроорганизмов: А — *Tetrahymena thermophila*; Б — строение жгутика бактерий.

Жгутики построены из белка — флагеллина, их диаметр 10-20 нм, длина до 20 мкм. Жгутик закреплен в цитоплазматической мембране и клеточной стенке с помощью базального тельца, состоящего

из центрального стержня и двух пар (у грамотрицательных бактерий) и одной пары (у грамположительных) дисков. Жгутики врачаются благодаря тому, что через диски проходит поток заряженных частиц (H^+ , OH^- , Na^+) за счет разности потенциалов внутри и вне клетки. Жгутики находятся под контролем системы, воспринимающей информацию о состоянии окружающей среды. Поэтому они позволяют клеткам перемещаться в область с оптимальными условиями (таксис). Существует около 35 генов, участвующих в сборке и функционировании базального тельца и еще более 20 генов, определяющих направление движения в ответ на внешние стимулы. Вся система находится под контролем главного оперона, который регулируется системой цАМФ — белок-активатор.

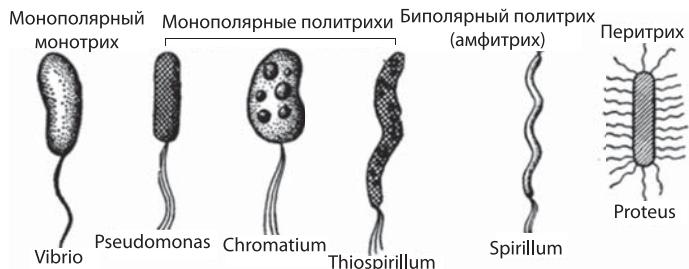


Рис. 12. Основные типы расположения жгутиков бактерий [4]

Фимбрии (пили или волоски) располагаются на поверхности клеток многих бактерий. Их число на клетке может доходить до 10 000. Их диаметр 3-25 нм, длина около 12 мкм. Они обеспечивают сцепление клеток, например при конъюгации, их адгезию к субстрату. Белки фимбрий служат рецепторами, обеспечивающими биологическое узнавание. Некоторые фимбррии являются капиллярами, связанными с мезосомами, и участвуют в водно-солевом обмене.

F-волоски (F-пили) по структуре напоминают фимбррии, однако на клетке их не более одного-двух. Они находятся лишь у клеток, способных к передаче генетического материала при конъюгации, и принимают участие в этом процессе как рецепторы и связывающие структуры. Кроме того, они являются рецепторами специфических фагов.

Споры прокариот — это особая структура, предназначенная для сохранения в неблагоприятных условиях. Споры по сравнению с вегетативными клетками намного устойчивее к воздействию высокой температуры, радиации, химических агентов. Споры образуются внутри бактериальной клетки обычно при истощении в культуральной среде питательных веществ и накоплении продуктов обмена. Биохимическим сигналом для спорообразования служит снижение концентрации в клетке гуаниловых нуклеотидов — ГТФ и ГДФ. Спорообразование зависит от плотности популяции: при малой концентрации клеток споры

не образуются. Спорообразование восстанавливается, если к такой культуре добавить фильтрат поздней экспоненциальной фазы культуры, в которой клетки начали спорулировать (см. чувство кворума). Образование спор требует синтеза ДНК: блокада репликации прекращает экспрессию ранее индуцированных генов споруляции. Образование споры начинается с накопления белкового материала, при этом расходуются запасные питательные вещества. Белки споры содержат значительно больше цистина, чем вегетативные клетки. Предполагают, что многочисленные дисульфидные связи в белке обеспечивают высокую механическую прочность оболочек спор. На ранней стадии споруляции образуются особые белки, которые связываются с ДНК, слегка раскручивая ее, что изменяет геометрию пиримидиновых оснований и повышает их устойчивость к ультрафиолетовому излучению. В период споруляции образуется специфическое вещество — дипиколиновая (пиридин-2,6-дикарбоновая) кислота, которая в виде соли кальция входит в состав оболочки споры.

Морфологические изменения клетки в процессе споруляции (рис. 13) начинаются с образования асимметрично расположенной септы. Подобно обычной септе, образующейся при делении клеток, она состоит из двух мембран с тонким слоем пептидогликана между ними. Большая часть клетки является материнской, а меньшая — проспорой, содержащей нуклеоид. Далее септа деградирует, а мембрана материнской клетки обволакивает проспору, которая таким образом получает двойную мембрану. Между этими мембранами располагается слой пептидогликана, формирующий кортекс споры. На следующей стадии спорообразования происходит сборка белковых элементов оболочки споры. По окончании созревания споры материнская клетка лизируется. Зрелая спора содержит минимальное количество свободной воды и повышенное по сравнению с вегетативной клеткой количество липидов. На долю ее оболочки приходится до 50% сухой массы. Все эти особенности обеспечивают ее устойчивость к факторам внешней среды.

Спорообразование присуще преимущественно палочковидным микроорганизмам (бациллам, клостридием). К ним относятся возбудители сибирской язвы, столбняка, анаэробной инфекции, ботулизма и некоторые сапротрофные виды. Помимо этого споры образуют виды родов *Thermoactinomyces*, *Sporosarcina*, *Sporomusa*. Все они за исключением последнего по Граму окрашиваются положительно.

Спора — это покоящаяся форма. В благоприятных условиях споры прорастают. При этом спора набухает, поглощая воду, возрастает ее метаболическая активность, выделяется дипиколиновая кислота, спора утрачивает свою устойчивость. Наконец, оболочка споры разрывается, и из нее выходит вегетативная клетка (рис. 13).

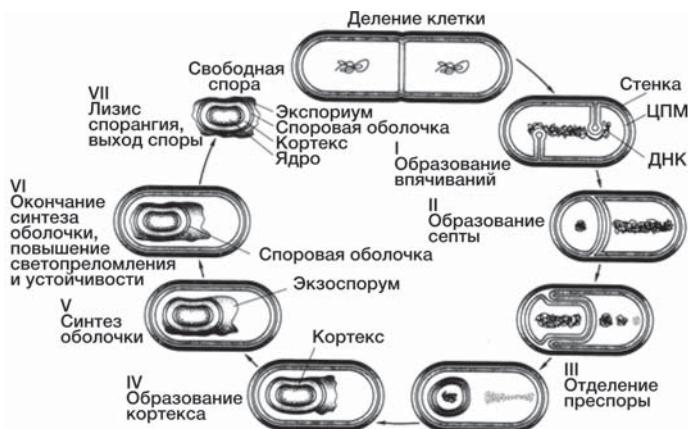


Рис. 13. Цикл развития *Bacillus subtilis*: 1 — вегетативная клетка; 2 — образование септы споруляции; 3-4 — образование двойной мембранны споры; 5 — формирование кортекса (а); 6 — формирование белковой оболочки (б); 7 — зрелая спора; 8 — прорастание споры [2].

Способность микроорганизмов к спорообразованию учитывают при выборе методов дезинфекции и стерилизации, имея в виду высокую устойчивость спор к биоцидным агентам. Наиболее устойчивые виды используют в качестве тест-культур для оценки эффективности стерилизации: *Bac. stearothermophilus* — паром под давлением, некоторые виды *Bac. subtilis* — сухим паром, *Bac. ruminis* — радиационной.

Клетки прокариот (от греч. *pro* — до, *karion* — ядро) не имеют оформленного ядра. Иными словами, генетический материал (ДНК) прокариот находится прямо в цитоплазме и не окружен ядерной мембраной.

1.6 Генетический аппарат

Бактериальная хромосома представляет собой замкнутую кольцевую ДНК длиной около 1,3 м.

ДНК бактерий представлена одиночными кольцевыми молекулами длиной около 1 мм. Каждая такая молекула состоит примерно из 5×10^6 пар нуклеотидов. Суммарное содержание ДНК (геном) в бактериальной клетке намного меньше, чем в эукариотической, а следовательно, меньше и объем закодированной в ней информации. В среднем, такая ДНК содержит несколько тысяч генов, что примерно в 500 раз меньше, чем в клетке человека.

Плазмиды и эписомы

Плазмиды и эписомы — это небольшие фрагменты ДНК, отличающиеся от основной массы ДНК. Они часто реплицируются вместе с ДНК хозяина, но не нужны для выживания его клетки.

Сначала было принято различать эписомы и плазмиды: эписомы внедряются в ДНК хозяина, а плазмиды — нет. К эписомам относятся F-факторы и так называемые умеренные фаги. Сейчас обе группы называют одним общим термином «плазмиды». Плазмидыши-

роко распространены в природе, и в последние годы их считают внутриклеточными паразитами или симбионтами, устроенные еще проще, чем вирусы. Вопрос о том, можно ли вирусы считать живыми организмами, будет подробно рассмотрен далее. Что касается плазмид, то здесь дело обстоит еще сложнее — ведь они представляют собой только молекулы ДНК. Плазмиды контролируют свою репликацию и число копий в клетке, которое у разных плазмид может колебаться от 1 до 100. Для плазмид характерно явление несовместимости, т. е. неспособности близкородственных плазмид существовать в одной клетке; на этом основана их классификация. Основная таксономическая единица у плазмид — Inc-группа (incompatibility — несовместимость). Плазмиды, относящиеся к одной Inc-группе, обладают многими общими свойствами: сходной молекулярной массой, высокой степенью гомологии ДНК — и контролируют сходные фенотипические признаки.

Механизм несовместимости состоит в угнетении репликации проникшей в клетку плазмиды специфическим белком или РНК, вырабатываемым под контролем плазмиды, имеющейся в клетке. Кроме того, под контролем последней на поверхности клетки синтезируется специфический белок или липопротеин, препятствующий входению в клетку родственной плазмиды.

Плазмиды придают своим клеткам-хозяевам целый ряд особых свойств. Некоторые плазмиды являются «факторами резистенции» (R-плазмиды, или R-факторы: от англ. *R* = *resistance* — устойчивость), т. е. факторами, придающими устойчивость к антибиотикам. Примером может служить пенициллиназная плазмиды стафилококков, которая трансдуцируется различными бактериофагами. В этой плазмиде содержится ген, кодирующий фермент пенициллиназу, которая разрушает пенициллин и, таким образом, придает устойчивость к пенициллину. Передача и распространение таких факторов среди бактерий (в результате полового размножения) очень мешают врачам. Другие плазмидные гены определяют устойчивость к дезинфицирующим средствам, способствуют таким заболеваниям, как стафилококковая импетиго; помогают молочнокислым бактериям превращать молоко в сыр; придают способность усваивать такие сложные вещества, как углеводороды, что можно использовать для борьбы с загрязнениями океана или для получения кормового белка из нефти.

1.7 Индивидуальный рост и бесполое размножение клеток

Отношение поверхность/объем у бактериальных клеток очень велико. Это способствует быстрому поглощению питательных веществ из окружающей среды за счет диффузии и активного транспорта. В благоприятных условиях бактерии растут очень быстро.

Рост прежде всего зависит от температуры и pH среды, доступности питательных веществ и концентрации ионов. Облигатным аэробам обязательно нужен еще и кислород, а облигатным анаэробам, наоборот, нужно, чтобы его совсем не было.

Достигнув определенных размеров, бактерии переходят к бесполому размножению (бинарному делению), т. е. начинают делиться с образованием двух дочерних клеток. Переход к делению диктуется отношением объема ядра к объему цитоплазмы. Перед клеточным делением происходит репликация ДНК, во время которой мезосомы удерживают геном в определенном положении (см. рис. Строение клетки). Мезосомы могут прикрепляться и к новым перегородкам между дочерними клетками и таким образом участвовать в синтезе веществ клеточной стенки. У самых быстрорастущих бактерий деление происходит через каждые 20 мин.; интервал между делениями называется временем генерации.

Образование перегородки (рис. 14) начинается после прекращения репликации ДНК, а затем до самого деления проходит время 20 мин (так называемый D-период). Нормальный период времени, необходимый для полной репликации хромосом, составляет около 40 мин. независимо от скорости роста. Эти величины определяют момент инициации репликации ДНК в клетках, растущих с любой данной скоростью. Например, если время удвоения клетки равно 30 мин., то репликация ДНК заканчивается за 20 мин. до деления, а инициация происходит за 40 мин. до этого, так что инициация репликации хромосом, разделенных между дочерними клетками, совпадает с делением, приведшим к образованию их прародителей. Очевидно, инициации должны происходить в клетках такой культуры каждые 30 мин.

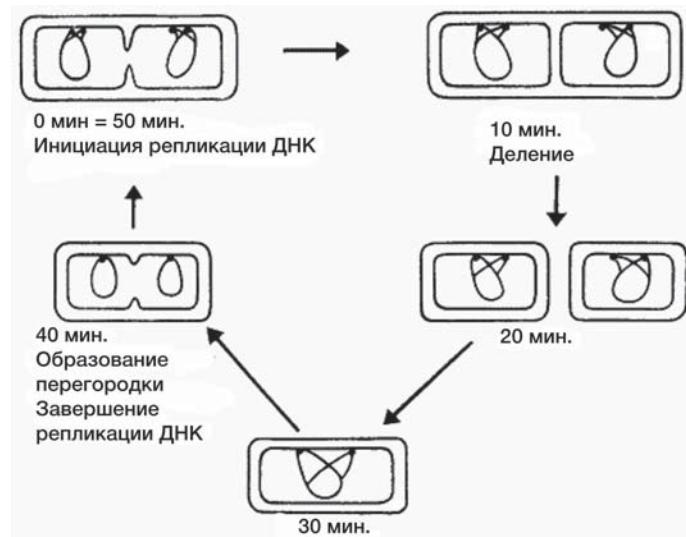


Рис. 14. Схематическое изображение клеточного цикла бактерий, показывающее распределение во времени процессов инициации репликации ДНК, возникновения перегородки и деления клетки в 50-минутном цикле.

Если время генерации изменяется до 50 мин. (рис. 14), то инициация репликации ДНК для дочерних клеток происходит за 60 мин. до их разделения, т. е. за 10 мин. до деления, приводящего к образованию родительской клетки. Таким образом, мы видим, что репликация ДНК может инициироваться в любой момент клеточного цикла, но этот момент для любого заданного времени генерации будет фиксирован. Клетка в своей жизни проходит разные состояния: фазу роста и фазы подготовки к делению и деления. Клеточный цикл — переход от деления к синтезу веществ, составляющих клетку, а затем опять к делению — можно представить на схеме в виде цикла, в котором выделяют несколько фаз (рис. 15).

После деления клетка вступает в фазу синтеза белков и роста, эту фазу называют G_1 .

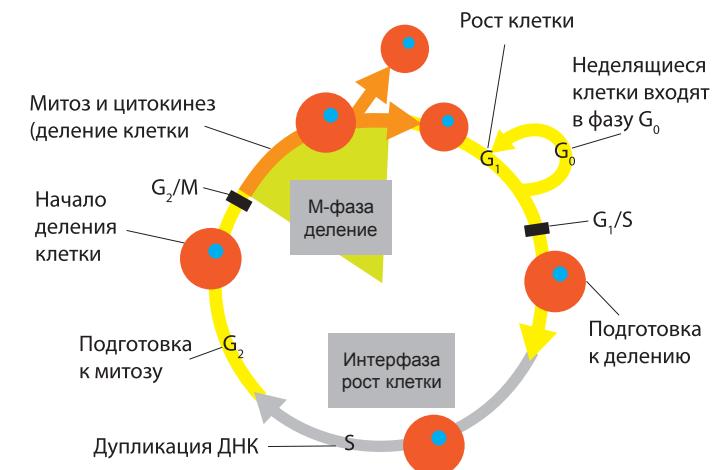


Рис. 15. Клеточный цикл прокариот.

Для того чтобы вступить в митоз, клетка должна достичь определенной массы: размеры вновь образованных дочерних клеток вначале варьируют гораздо сильнее, чем на более поздней стадии, когда эти клетки снова вступают в митоз. Так происходит из-за того, что меньшие клетки остаются в фазе G_1 , пока не достигнут примерно той же величины, что и более крупные клетки. По-видимому, существует механизм регулирования массы клеток, вступающих в митоз, хотя он и работает с большими допусками:

Часть клеток из этой фазы переходит в фазу G_0 , эти клетки функционируют и потом погибают без деления (например, эритроциты). Но большинство клеток, накопив необходимые вещества и восстановив свой размер, а иногда и без изменения размеров после предыдущего деления, начинают подготовку к следующему делению. Эта фаза называется фаза S — фаза синтеза ДНК, затем, когда хромосомы удвоились, клетка переходит в фазу G_2 — фазу подготовки в митоз. Затем происходит митоз (деление клетки), и цикл повторяется заново. Фазы G_1 , G_2 , S вместе называются **интерфазой** (т. е. фазой между делениями клетки).

Жизнь клетки и переход от одной фазы клеточного цикла к другой регулируется изменением кон-

центраций белков **циклинов**, как это показано на рисунке 16.

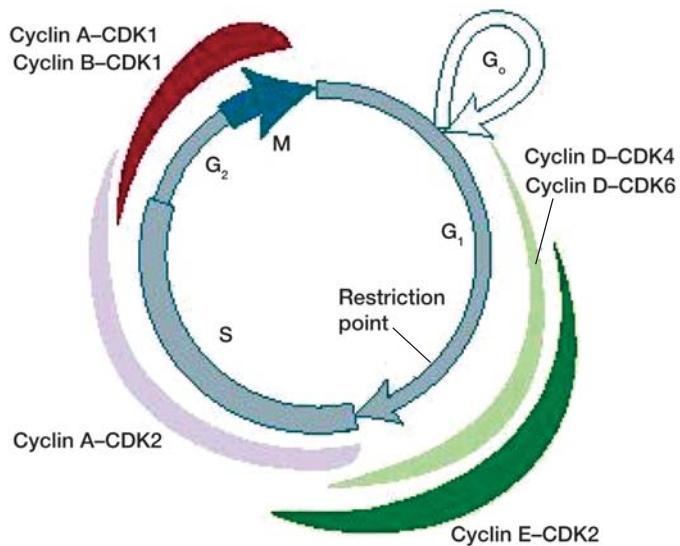


Рис. 16. Жизненный цикл клетки регулируется белками циклином, концентрация которых меняется на разных фазах цикла. Толщина цветных секторов соответствует концентрации циклинов.

1.8 Половое размножение или генетическая рекомбинация

У бактерий наблюдается и половое размножение, но в самой примитивной форме. Половое размножение бактерий отличается от полового размножения эукариот тем, что у бактерий не образуются гаметы и не происходит слияния клеток. Однако главное событие полового размножения, а именно обмен генетическим материалом, происходит и в этом случае. Этот процесс называется генетической рекомбинацией. Часть ДНК (очень редко вся ДНК) клетки-донора переносится в клетку-реципиент, ДНК которой генетически отличается от ДНК донора. При этом перенесенная ДНК замещает часть ДНК реципиента. В процессе замещения ДНК участвуют ферменты, расщепляющие и вновь соединяющие цепи ДНК. При этом образуется ДНК, которая содержит гены обеих родительских клеток. Такую ДНК называют рекомбинантной. У потомства, или рекомбинантов, наблюдается заметное разнообразие признаков, вызванное смешением генов. Такое разнообразие признаков очень важно для эволюции и является главным преимуществом полового размножения.

Известны три способа получения рекомбинантов. Это — в порядке их открытия — трансформация, конъюгация и трансдукция.

При трансформации клетки донора и реципиента не контактируют друг с другом. Этот процесс открыл в 1928 г. Гриффит (*Griffith*), работая с пневмококками — бактериями, вызывающими пневмонию. У пневмококков имеются колонии двух типов, кото-

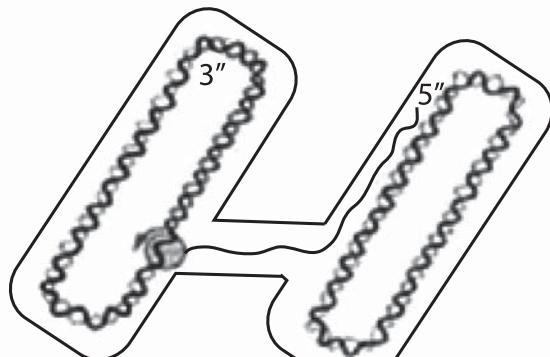
рые различаются по внешнему виду. Одни колонии — шероховатые (R — от англ. *rough* — шероховатый), другие — гладкие (S — от англ. *smooth* — гладкий, ровный). R-штаммы не патогенны и не образуют капсулы; S-штаммы патогенны, и у них имеются толстые капсулы. Гриффит обнаружил, что если мышам ввести живые R-клетки и мертвые (убитые нагреванием) S-клетки, то мыши погибают через несколько дней, а в крови у них можно обнаружить живые S-клетки. На этом основании Гриффит сделал вывод, что из мертвых S-клеток высвобождается какой-то фактор, который придает R-клеткам способность образовывать капсулу и предохраняет их от разрушения в организме животного-хозяина. Оказалось, что такая «трансформация» наследуется. Поскольку молекулы «наследственности» в то время еще не были известны (хотя, правда, и предполагали, что это белки), очень много усилий было потрачено на то, чтобы идентифицировать трансформирующий фактор.

В заключение следует сказать, что половое размножение (в любой форме) — довольно редкое событие у бактерий. Но поскольку число бактерий в каждой колонии огромно, половое размножение наблюдается сравнительно часто. Такое размножение более примитивно, чем у эукариот; полный обмен геномами (суммарной ДНК) происходит только при конъюгации, что действительно встречается лишь изредка. Половое размножение бактерий имеет особое значение потому, что именно таким путем передается устойчивость к антибиотикам и дезинфицирующим средствам. В середине двадцатого века был описан половой процесс у бактерий. Это процесс, при котором бактерии обмениваются своей генетической информацией. На рисунке 17 представлена схема этого процесса. Он называется конъюгацией. Во время конъюгации образуется цитоплазматический мостик, по которому происходит перенос молекулы ДНК из одной клетки в другую. У кишечной палочки имеется молекула ДНК, которая называется F-фактор (fertility factor — фактор плодовитости). Молекула F-фактора способна встроиться в геномную ДНК. В F-факторе кодируется специальный белок, который образует половые ворсинки, они называются F-пили. Эти самые ворсинки прикрепляются к другой клетке, которые F-фактор не содержит, и F-фактор инициирует репликацию. В процессе репликации образуется две копии молекулы ДНК, причем одна копия остается в исходной клетке, а вторая копия переносится в другую клетку. То есть, генетическая информация из одной клетки попадает в другую.

Донорная хромосома содержит такие же гены, как и тот кусок ДНК, который был перенесен в клетку. Однако варианты генов в исходной, донорной клетке, и в клетке-реципиенте могут отличаться. Например, в исходной клетке ген кодировал синтез фермента лактазы (расщепляет молочный сахар лактозу), а в реципиенте такой же ген испорчен, то есть лактазу не ко-

дирует из-за какой-то мутации. При этом бактерия не способна использовать сахар лактозу в среде.

F-фактор



«Male»
E. coli
«Female»
E. coli

Схематическое изображение
конъюгации у *E. coli*

Рис. 17. Половой процесс у бактерий (Бидл и Тейтум, 1946; У. Хейс, 1952)

ДНК реципиента и хозяйская ДНК обмениваются гомологичными (то есть содержащими одинаковые гены) кусками. Образуется новое сочетание генов в хозяйской клетки. Среди ее старых генов оказывается встроен кусок с новым геном, прибывшим из клетки-донора. Этот процесс обмена кусками ДНК называется рекомбинацией. Та ДНК, которая в процессе рекомбинации оказалась не включенной в хромосому, деградирует и исчезает. Новый ген проявляется — клетка оказывается способной расщеплять тот сахар, который раньше использовать не могла. В такой ситуации ген лактазы называют генетическим «маркером», он маркирует участок хромосомы, связанный с определенным свойством бактерии (способностью расщеплять сахар, которую может детектировать исследователь). Процесс репликации у кишечной палочки продолжается 20 минут, а процесс конъюгации длится 3-5 ми-

нут. За это время успевает перейти не вся хромосома, а только ее кусочек. Чем дольше длится конъюгация, тем больший кусочек успевает перейти из одной клетки в другую. Этот процесс позволяет определить какие маркеры поступили в клетку, если исходно клетки различались по некоторым генам. F-фактор способен встраиваться в разные участки хромосомы, и когда начинается передача, разные маркеры попадают в другую клетку. После конъюгации клетки встряхивали, и мостики между ними разрывались. Это встряхивание проводили через 2, 3, 5 минут, и смотрели, какие маркеры (и, соответственно, какой фрагмент хромосомы) за это время войдут. По этим данным строили генетическую карту (расположение друг относительно друга генетических маркеров). Генетическая карта кишечной палочки была построена в 60-х годах. На этой карте были гены-маркеры, расположенные по всей кольцевой хромосоме, а координаты генов на карте обозначались в минутах. Итоговая карта, построенная в 60-х годах, имела координаты в промежутке от 0 до 90 минут. Поэтому один известный микробиолог шутил, что кишечная палочка — это удивительный организм, у которой жизнь длится 20 минут, а половой процесс — 90 минут.

При *трансдукции* небольшой двухцепочечный фрагмент ДНК попадает из клетки-донора в клетку-реципиент вместе с бактериофагом (одна из групп вирусов). Возможный механизм трансдукции изображен на рисунке 18 ниже:

Некоторые вирусы способны встраивать свою ДНК в ДНК бактерий; такая встроенная ДНК реплицируется одновременно с ДНК хозяина и передается от одного поколения бактерий к другому. Время от времени такая ДНК активируется и начинает кодировать образование новых вирусов. ДНК хозяина (бактерии) разрывается, а высвобожденные фрагменты иногда захватываются внутрь новых вирусных частиц, порой даже вытесняя ДНК самого вируса. Такие новые «вирусы», или *трансдукционные частицы*, затем переносят ДНК в клетки других бактерий.



Рис. 18. Механизм трансдукции

Глава 2. ГРИБЫ

2.1 Положение грибов в системе живой природы

Грибы — многочисленная широко распространенная в природе группа организмов, включающая в себя около 100 тыс. видов. Они обитают в почве, воде, на растительных и животных остатках [9].

Грибы составляют особое царство *Fungi* (*Mycota*), они обладают признаками, характерными как для растений, так и для животных. Грибы (*Fungi*) (рис. 19) — бесхлорофильные низшие эукариотические организмы, использующие для питания только органические вещества. Вегетативное тело грибов — *грибница*, или *мицелий*, состоит из ветвящихся нитей, называемых *гифами*. У низших одноклеточных грибов гифы не разделены поперечными перегородками (септами) на отдельные участки. У высших грибов мицелий септирован. Мицелий может развиваться на поверхности субстрата, в толще субстрата, проникая внутрь. Толщина (поперечник) гиф составляет 5...50 мкм и более. Своеобразие грибов проявляется не только в сочетании признаков, присущих растениям и животным, но и в наличии специфических черт и свойств, характерных только для членов царства *Mycota*: мицелиальной структуры вегетативного тела; сложных ядерных циклов и плеоморфизма; многоядерности и гетерокариоза (разнокачественность ядер в одной клетке); дикариоза (длительное существование в одной клетке двух ядер, одновременно делящихся и имитирующих диплоидное ядро).

Признаки растений: голофитный способ питания (поглощение питательных веществ через клеточную стенку), способность к синтезу витаминов, наличие ригидной клеточной стенки, вакуолей, поперечных перегородок в мицелии, полярность клетки, способность к неограниченному росту, размножение спорами. Признаки животных: отсутствие хлорофилла, гетеротрофный тип питания, образование мочевины в ходе азотистого обмена и гликогена — в процессе углеводного обмена, наличие хитина в клеточной стенке, формирование лизосом в цитоплазме, особенности первичной структуры цитохромов и тРНК. Классификация грибов построенная на основании структурно-химических и морфологических признаков представлена в табл. 3. Истинные грибы разделяют на шесть классов: хитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскоми-

цеты, или сумчатые, базидиомицеты, дейтеромицеты, или несовершенные грибы.

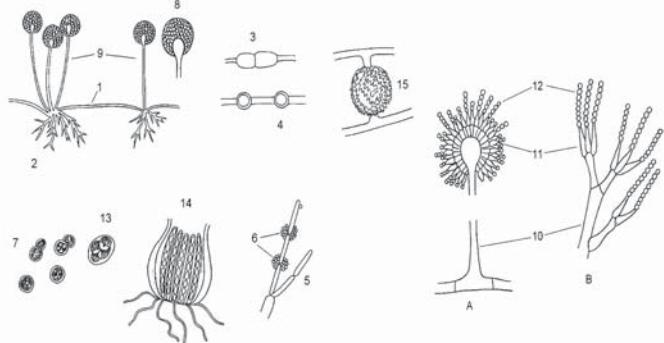


Рис. 19. Морфология грибов. Вегетативные структуры: столоны (1) и ризоиды (2) *Mucor nigricans*; оидии (3) и хламидоспоры (4) *Mucor chibinensis*; псевдомицелий (5) и бластоконидии (6) *Candida spp.*; почкующиеся клетки (7); *Saccharomyces cerevisiae*. Анаформы: спорангий со спорами (8), спорангеноносец (9), кониденоносец (10), стеригмы (11), конидии (12); *Aspergillus spp.* (A) и *Penicillium spp.* (B). Телеоформы: сумки с аскоспорами (13) *S. Cerevisiae* (*Endomycetes*), перитектий, содержащий сумки с аскоспорами (14) *Sordaria sp.* (*Ascomycetes*), зигоспора (15) *Mucor spp.* (*Zygomycetes*).

Хитридиомицеты. Примитивные низшие одноклеточные организмы. Мицелий отсутствует или в зародышевом состоянии. Клеточная оболочка содержит хитин и не имеет целлюлозы. Размножение бесполое и половое. Преимущественно обитают в водоемах. Некоторые виды вызывают болезни сельскохозяйственных растений.

Оомицеты. Одноклеточные (низшие) мицелиальные грибы. Функцию скелетного вещества оболочки выполняют целлюлоза и глюкан. Размножение бесполое. Обитают в водоемах; наземные формы — паразиты высших растений.

Зигомицеты. Мицелий хорошо развит, многоядерный, несептированный (низшие грибы). Клеточная оболочка содержит хитин, иногда глюкан. Размножаются спорангиспорами, реже конидиями или половым путем. Широко распространены в верхнем слое почвы, развиваются на органических остатках растений. Используют в микробиологической промышленности с целью получения соевого сыра, спирта из картофеля, антибиотика рамицина и др.

Классы грибов [10].

Таблица 3.

Порядок	Класс	$(\Gamma + \Ц)$ %	Биосинтез триптофана	Клеточная стенка		Ядерная фаза	Ана-морфа	Телео-морфа
				Хитин, %	Маннан, %			
Chytridio-mycota	Chytridio-mycetes	44 — 46	Ia	>5	<5	Гаплоидная или гаплодиплоидная	Зооспорангий с зооспорами	Покоящаяся спора, первичный спорангий
Zygomycota	Zygo-mycetes	28 — 54	Ib	>5	<5	Гаплоидная	Спорангий со спорангиспорами	Зигоспора, первичный спорангий
Ascomycota	Endo-mycetes	26 — 54	II	<5	>5	Гаплоидная, диплоидная или гаплодиплоидная	Почкующиеся клетки, конидии	Сумка с эндогенными аскоспорами
	Asco-mycetes	46 — 60				Гаплоидная или гаплоидно-дикариотическая	Конидии	
Basidio-mycota	Ustomy-cetes	48 — 70	Ib	>5	<5	Гаплоидно-дикариотическая	Почкующиеся клетки	Промицелий с экзогенными споридиями
	Basidio-mycetes	44 — 65	Ia, Ib, Ic	>5	>5		Конидии, почкующиеся клетки	Базидии с экзогенными базидиоспорами

Типичными представителями этого класса являются грибы рода мукор (головчатая плесень). У мукора (рис. 19) от одноклеточного мицелия отходят бесцветные спорангии, на верхушке которых развивается по одному спорангии. При наличии влаги оболочка зрелого спорангия легко растворяется, освобождая несколько тысяч спорангиспор, которые затем прорастают. У животных и человека могут вызывать мукомикозы.

Аскомицеты, или сумчатые грибы. Высшие грибы с разветвленным многоклеточным мицелием. Размножение вегетативное, бесполое (при помощи конидий) и половое (сумчатая стадия). В результате полового процесса возникают аски, или сумки, внутри которых после слияния ядер половых клеток (гамет) образуются аскопоры — обычно восемь в одном аске. Аскомицеты широко распространены в природе, известно около 30 тыс. видов. Обитают в почве, органических субстратах, кормах, пищевых продуктах, вызывая их порчу. Паразитируют на растениях, животных, разрушают целлюлозу. Токсические виды способны вызвать микотоксикозы. Используют как продуценты антибиотиков, алкалоидов, ростовых веществ (гипереллинов), ферментов. К аскомицетам относятся некоторые съедобные грибы — сморчок, трюфель.

Базидиомицеты. Высшие грибы с многоклеточным мицелием. Специальным органом плодоношения служит базидия. Базидии образуют наружные споры на концах гиф в результате полового процесса. Сапропфиты и факультативные паразиты хлебных злаков (головня, ржавчина). К базидиомицетам относятся также съедобные и ядовитые шляпочные грибы.

Дейтеромицеты, или несовершенные грибы. Высшие грибы с многоклеточным, сильно разветвленным мицелием. Весь жизненный цикл их проходит в гаплоидной стадии, без смен ядерных фаз. Размножаются вегетативным и бесполым путем при помощи конидий. Конидии различаются по форме, окраске и образуются на специализированных ветвях мицелия — конидиеносцах или пикнидах (плотных органах конидиального спороношения).

Это самый многочисленный класс, включающий в себя грибы родов аспергилл, пеницилл, стахиботрис, фузариум и др. (см. рис. 19). У аспергилл, или леечной плесени, мицелий септирован, конидиеносцы одноклеточные; на их вершине формируется расширение в виде головки, от которой отходят ответвления — стеригмы — с отшнуровывающимися от них конидиями. Конидии могут быть окрашены в различные цвета, чаще черный, располагаются радиально и напоминают струйки воды, вытекающие из лейки.

У грибов рода пеницилл (кистевик) мицелий и конидиеносцы многоклеточные. В верхней части конидиеносцы разветвлены в виде кисти руки, их последние сегменты — стеригмы — заканчиваются конидиями. Образуют зеленый, белый и другие пигменты. Обитают в почве, сырых помещениях, кормах, пищевых продуктах.

К несовершенным грибам относят и дерматофиты — возбудители микоспории, трихофитии, фавуса (парши) животных, а также дрожжеподобные грибы родов *Candida* и *Cryptococcus*, вызывающие кандидоз и криптококкоз.

Дрожжи. Безмицелиальные, не образующие хлорофилла одноклеточные грибы (15). Филогенетически

гетерогенная группа организмов, часть из которых типичные аскомицеты, другие — базидиомицеты, третьи — дейтеромицеты.

Это крупные сферические или палочковидные клетки размером 3...7 мкм; удлиненные формы могут быть более 20 мкм.

В специальной литературе часто встречается собирательный термин «плесени» («плесневые грибы»). Это нитчатые, микроскопические грибы разных классов, способные образовывать субстратный и воздушный мицелий, например мукор, аспергиллы, пенициллы и др.

Клетки микроскопических грибов разнообразны по форме, размерам, но имеют общие структурные элементы. Клетка всех грибов состоит из клеточной стенки, цитоплазмы с цитоплазматической мембраной и эндоплазматической сетью, митохондриями, рибосомами, включениями, вакуолями, ядром или несколькими ядрами (рис. 2).

2.2 Морфология и ультраструктура грибов

В ходе жизненного цикла грибов происходит образование вегетативных и репродуктивных структур. Вегетативная структура — это мицелий и его видоизменения. Любая часть мицелия в благоприятных условиях может дать начало новой особи.

Репродуктивными называют структуры, специально предназначенные для размножения.

У грибов встречаются три типа размножения: вегетативное, бесполое и половое. У многих видов они последовательно сменяют друг друга в цикле развития.

Вегетативное размножение обычно осуществляется неспециализированными частями мицелия, которые дают начало новому мицелию. Мицелий большинства грибов обладает высокой способностью к регенерации, что и лежит в основе этого способа размножения и широко используется, например, при приготовлении грибницы для искусственного выращивания съедобных грибов, таких как шампиньон двуспоровый, вешенка обыкновенная и др., а также при получении биомассы грибов в пищевых и кормовых целях.

К специализированным структурам вегетативного размножения относятся **оидии**, тонкостенные клетки, и **хламидоспоры**, толстостенные клетки, на которые распадается мицелий и которые дают начало новому мицелию. Хламидоспоры выполняют и функцию перенесения неблагоприятных условий (рис. 19, 20). У большинства дрожжей вегетативное размножение происходит путем почкования клеток.

Бесполое размножение осуществляется при помощи разнообразных специализированных клеток или многоклеточных структур, **спор**. У грибов известны

эндогенные и экзогенные споры бесполого размножения. Эндогенные подвижные споры, **зооспоры**, развиваются в **зооспорангиях** разной формы. Это голые клетки, снабженные жгутиками, число, расположение и строение которых различно в разных систематических группах грибов. Зооспоры разного строения характерны для представителей отделов оомикота, гифохитридиомикота и хитридиомикота, т. е. в основном для водных и реже наземных грибов. Для осуществления размножения с помощью зооспор нужна вода, хотя бы в виде отдельных капель на поверхности почвы или растений, в которой зооспоры могут передвигаться с помощью жгутиков. Эндогенные неподвижные споры, **спорангииоспоры**, одеты оболочкой и образуются внутри **спорангииев**, развивающихся на специализированных гифах, **спорангииносцах**, обычно поднимающихся над субстратом. Спорангииоспорами осуществляется бесполое размножение у зигомикот.

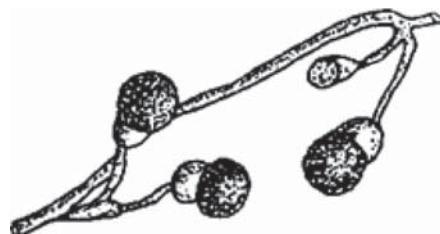


Рис. 20. Хламидоспоры грибов в чистой культуре: хламидоспоры *Muscogone perniciosa* — возбудителя мягкой гнили шампиньона [9].

Экзогенные споры бесполого размножения грибов, **конидии**, неподвижны, образуются на специализированных, обычно морфологически отличных от вегетативного мицелия, дифференцированных спороносцах, **конидиеносцах**. Типичные конидии характерны для сумчатых, базидиальных и аноморфных грибов. Как и у зигомикот, это в основном наземные грибы, и распространение неподвижных спор бесполого размножения, спорангииоспор и конидий у таких грибов осуществляется, в основном пассивно токами воздуха или воды. Иногда распространение спор может осуществляться с помощью животных, например, при поедании плодовых тел шляпочных грибов. Специализированные структуры, связанные с вегетативным и бесполым размножением у грибов, называются **анаморфами**.

2.3 Организация клеточного цикла дрожжей

Наиболее исследован клеточный цикл у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, хотя многие положения являются общими для всех эукариотических клеток (рис. 21).

Клеточный цикл эукариотов разделен на четыре фазы: G₁, S, G₂, M. Синтез ядерной ДНК занимает лишь

некоторую часть интерфазы — период, называемый *S-фазой* клеточного цикла. Между концом *M-фазы* и началом синтеза ДНК имеется интервал, известный как *фаза G₁* (от англ. gap — промежуток). Другой интервал, называемый *фазой G₂*, отделяет конец синтеза ДНК от начала *M-фазы*. Таким образом, интерфаза состоит из последовательности фаз: *G₁*, *S*, *G₂* и обычно занимает не меньше 90% всего времени клеточного цикла. В клеточном цикле выделяют три особых критических точки: в фазе *G₁*, в фазе *S* и в фазах *G₂+M* (*G₂/M*-точка), которые контролируются внутриклеточными процессами. Продолжительность фаз клеточного цикла неодинакова; в среднем фаза *G₁* составляет 30-40% от всей продолжительности клеточного цикла, фаза *S* — 30-50%, фаза *G₂* — 10-20% и фаза *M* 5-10%. Эти параметры могут достаточно сильно варьироваться в зависимости от биологического вида, но достаточно неизменны для конкретного типа клеток. Существует особая критическая точка в фазе *G₁* называемая *точкой старта* (Start). При прохождении этой точки (для высших эукариотов — точка рестрикции) в клетке происходят изменения, после которых она должна уже пройти все последующие этапы клеточного цикла. Такое детерминирование клеточного цикла предполагает внутриклеточный контроль завершения каждой из фаз клеточного цикла (Hartwell L.H., 1974). Иными словами, после точки старта клетка детерминирована в завершении цикла и выходы из него невозможны (но не остановки) в любой другой фазе (*S*, *G₂*, *M*). Такое детерминирование клеточного цикла предполагает внутриклеточный контроль завершения каждой из фаз клеточного цикла. События, происходящие, например, в фазе *G₂*, не могут разворачиваться при прохождении фазы *S*, и наоборот.

Если после окончания клеточного цикла не имеется условий для входления в новый цикл, клетки переходят в состояние *G₀*. По своему определению это состояние просто характеризует клетки, не включенные в клеточный цикл. В этом состоянии могут находиться клетки, которые подготавливаются к входу в клеточный цикл (например, увеличивают свой размер до критического, необходимого для прохождения точки Старта), в этом случае тестируется (как бы) временное увеличение фазы *G₁*. Иногда, такими добавочными условиями для входления в клеточный цикл, является синтез не конституционных ферментных систем, необходимых для специфического субстрата (например, для роста дрожжей на н-алканах необходима индукция системы Р-450 (Галынкин В. А. и др., 1990)). С другой стороны, в состоянии *G₀* находятся и клетки, осуществляющие синтез целевого продукта (например, биосинтез антибиотиков), в этом случае мы имеем дело с физиологической дифференцировкой. В состоянии *G₀* находятся клетки, осуществляющие морфологическую дифференцировку (например, образование спор). В некоторых случаях морфологическая и физиологическая дифференцировка совпадают (синтез некото-

рых антибиотиков и переход к споруляции совпадает по времени). Наконец, морфологически дифференцированные клетки могут войти в клеточный цикл в этом статусе. В этом случае наблюдается рост не отдельных клеток, а в виде мицелия, что также приводит к среднему увеличению времени деления клеток. По существу, из *G₀* состояния клетки либо возвращаются в клеточный цикл (иногда в новом морфологическом статусе), либо переходят к программированной клеточной гибели (автолизная программа).

Для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 21) один из генов, контролирующих прохождение точки старта, был выявлен и назван *cdc28* (аналог *cdc2*). Белок *CDC28*, кодируемый этим геном, представляет собой протеинкиназу, но для функционирования этого белка требуется наличие другого белка, названного *циклином*. Именно *циклин* и является тем белком, который периодически синтезируется в ходе клеточного цикла и исчезает к его окончанию (Э. У. Мюрей, 1991).

Дальнейшие исследования показали, что уместно говорить не об одном циклине, а о целом семействе циклинов. Были найдены три группы циклинов: циклины фазы *G₁* (*G₁ cyclins*), контролирующие входление в цикл (точка старта); циклины фазы *S* (*S-phase cyclins*), контролирующие прохождение фазы *S*; циклины фазы *M* (*M-phase cyclins*), контролирующие завершение цикла. Причем циклины, ответственные за каждую из фаз цикла, синтезируются в своей фазе, а затем ферментативно деградируют (распадаются) (Dirick L. 1995, Nasmyth K., 1996). Было показано, что фазы цикла инициируются растворимыми цитоплазматическими факторами. Активатор *M*-фазы был назван *M-стимулирующим фактором* (*M-phase-promoting factor*; MPF), а активатор *S*-фазы назван *S-стимулирующим фактором* (*S-phase-promoting factor*). MPF имеет универсальное значение для эукариотических клеток и в эволюции высококонсервативен.

Механизм регуляции цикла построенный на активации циклинзависимых протеинкиназ (cyclin-dependent kinases — CDK), выполняется для всех эукариотов, но его детали сильно различаются для конкретного типа эукариотической клетки.

На рисунке 22 показано бесполое размножение дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с одновременным прохождением биохимических процессов и изменением генетического статуса клетки.

Половое размножение у грибов, связанный с ним процесс смены ядерных фаз, строение половых органов — всё это отличается у разных групп грибов. Существенные моменты полового процесса у грибов: **плазмогамия, кариогамия и мейоз**. Соответственно, гриб может находиться в гаплоидной или диплоидной стадиях. Плазмогамия и кариогамия у сумчатых и базидиальных грибов не совпадают во времени, в результате чего после плазмогамии у них возникает особая стадия **дикариотичного мицелия**, когда гаплоидные

ядра попарно ассоциированы, сближены, но не слились и образуют **дикарион**. Ядра дикариона обычно синхронно делятся с параллельным расположением осей веретен деления. В определенный момент цикла развития они сливаются, образуя диплоидное ядро, которое затем делится редукционно. Смена ядерных фаз будет подробно рассмотрена при описании отделов и классов грибов.

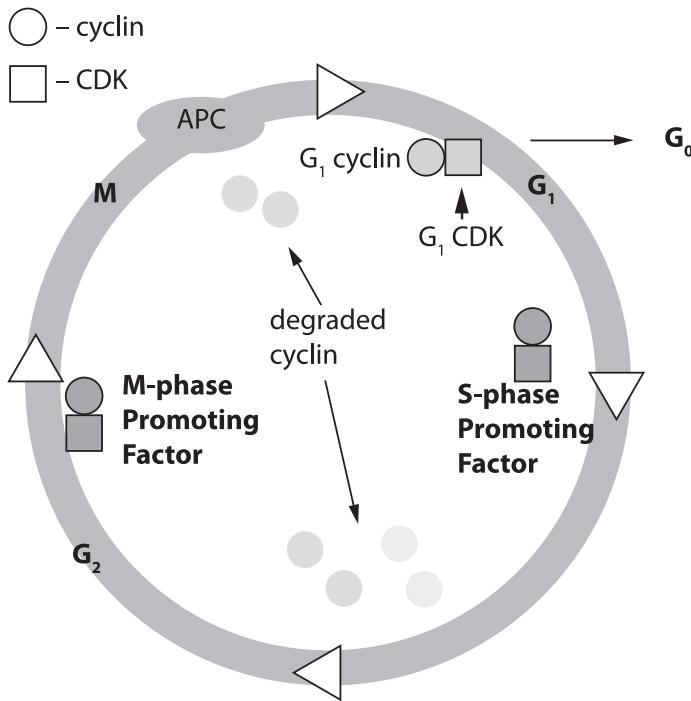


Рис. 21. Показаны четыре фазы: G₁, S, G₂, M и выход из клеточного цикла состояние G₀. Показаны соответствующие фазо-стимулирующие факторы (*phase-promoting factor*), представляющие комплекс циклина (*cyclin*) — кружок и циклин зависимой протеинкиназы (*cyclin-dependent kinase* — CDK) — квадрат. После прохождения фазы цикла показана деградация циклинов. На рисунке также представлен стимулирующий комплекс анафазы (*anaphase-promoting complex* — APC), необходимый для прохождения одной из стадий митоза — анафазы (расхождение хромосом).

В результате полового процесса образуются гаплоидные, неоднородные в генетическом отношении споры, что принципиально отличает их от спор бесполого размножения грибов. Эти гаплоидные споры располагаются или на мицелии или, чаще, на поверхности или внутри плодовых тел различного строения, которые называются **телеоморфами**. Таким образом, размножение с помощью спор, возникших половым путем, даёт начало формам с новой комбинацией генетического материала, что является основой дальнейшей эволюции форм, а размножение спорами, возникшими бесполым путем, способствует распространению и сохранению данной формы.

Типы полового процесса у грибов. Половое размножение у грибов известно у всех групп, за исключением анаморфных, или несовершенных, грибов. Половой процесс у грибов разнообразен и его особенности лежат в основе выделения классов. У грибов известно три основных типа полового процесса: гаметогамия, гаметангиогамия и соматогамия (рис. 23).

Гаметогамия — слияние гамет, образующихся в гаметангиях. Различают **изогамию** — слияние подвижных морфологически сходных гамет и **гетерогамию** — слияние подвижных, отличающихся по размерам и часто по степени подвижности гамет. Эти два типа гаметогамии характерны для хитридиевых и гифохитридиевых грибов. При **оогамии** крупные, неподвижные яйцеклетки, формирующиеся в специальных **оогониях**, оплодотворяются мелкими, подвижными **сперматозоидами**, развивающимися в специализированных **антеридиях**. У многих грибов с этим типом полового процесса сперматозоиды не образуются, а яйцеклетка оплодотворяется недифференцированным на сперматозоиды содержимым выростом многоядерного антеридия. Такой тип оогамии характерен для всех представителей отдела оомикота.

Второй тип полового процесса, **гаметангиогамия**, состоит в слиянии двух обычно многоядерных специализированных структур, содержимое которых не дифференцировано на гаметы. Гаметангиогамия характерна для зиго- и аскомикотов. Гаметангиогамия у зигомикотов носит название **зигогамии**. Она заключается в слиянии в основном многоядерных клеток, гаметангов, хорошо отличимых от вегетативного мицелия, на котором они формируются, но недифференцированных морфологически по половому знаку на мужской и женский. Из образовавшейся в результате их слияния зиготы формируется одетая толстостенной окрашенной оболочкой **зигоспора**, которая прорастает после периода покоя в особый зародышевый спорангий (рис. 23, 24).

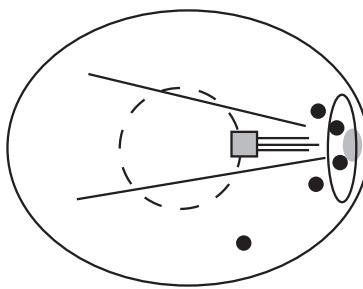
У аскомикотов при гаметангиогамии также сливаются два многоядерных гаметангия, но у них, в отличие от зигомикотов, половые органы дифференцированы на женский — **аскогон** и мужской — **антеридий**. Аскогон состоит из двух клеток: крупной многоядерной, или собственно аскогона, и тонкой нитевидной — **трихогин**, помещающейся на его вершине, через которую в аскогон переливается содержимое многоядерного антеридия. При этом происходит только плазмогамия, а ядра ассоциируются в пары, образуя **дикарион**. Из оплодотворенного аскогона без периода покоя вырастают **аскогенные** дикариотичные гифы. В их клетках происходит слияние ядер дикариона и образование диплоидного ядра, которое в дальнейшем делится мейотически. В результате этого процесса на аскогенных гифах достаточно сложным путем формируются особые образования — **сумки**, или **аски**, внутри которых после митотического деления постмейотических ядер формируются восемь эндогенных гаплоидных **аскоспор** (рис. 25).

- Начало образования почки.
- Локализация и морфогенетические изменения в месте образования почки.

ФАЗА G1:

- Локализация актинового пятна на секреторных элементах в месте возникновения почки.
- Начало образования веретена.
- Синтез белков РНК, образования кольца и микрофиламентов.

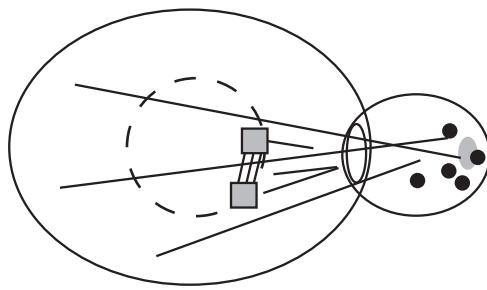
G1



Cdc28

↓

S



START

Cdc28

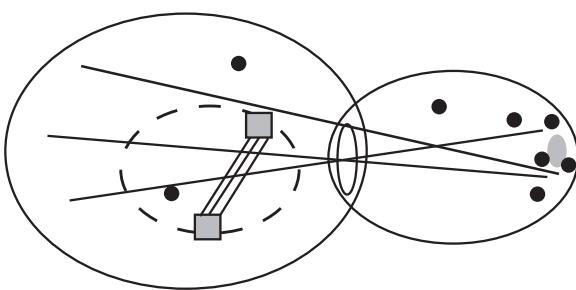
Cln 1,2

↓

Cdc28

Clb 5,6

G2

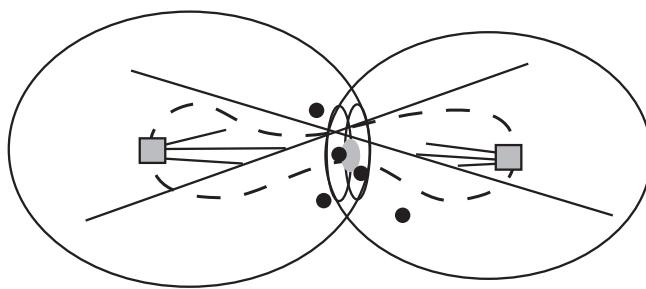


Cdc28

Clb 1,2

↓

M



Cdc28

ФАЗА S:

- Рост почки (1/3 размера клетки).
- Локализация SPA-2, актинового пятна и секреторных везикул в почке.
- SPB веретено в почке.

ФАЗА M:

- Миграция новых SPB в дочернюю клетку.
- Конденсация хромосом.
- Локализация SPA-2 и актина в новом месте.
- Образование перегородки.
- Цитокинез и отделение клетки.

Рис. 22. Бесполое размножение дрожжей

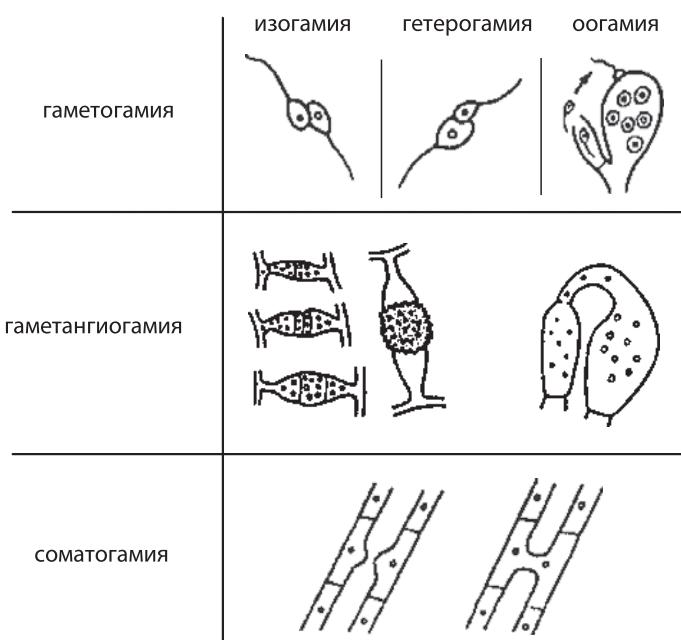


Рис. 23. Типы полового процесса у грибов [9].

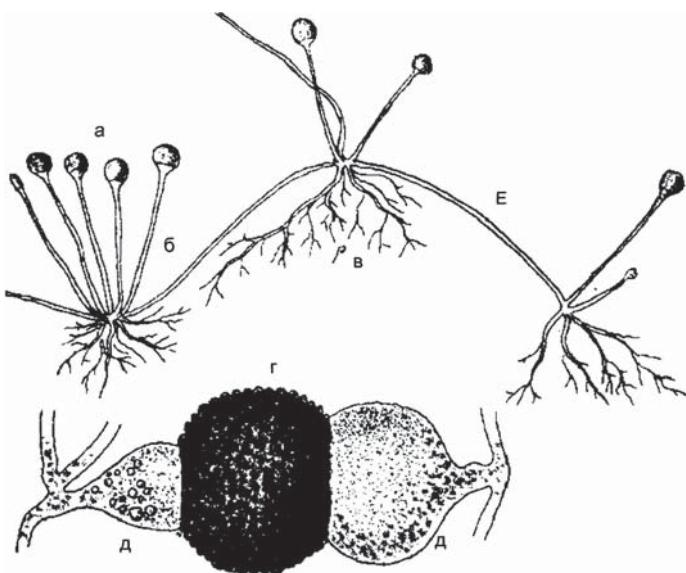


Рис. 24 (1). Жизненный цикл и зигота *Rhizopus nigricans*: а — спорангий, б — спорангийносец, в — ризоиды, г — зигоспора, д — подвески супензоры, е — столон.

Третий тип, **соматогамия**, — половой процесс, при котором сливаются обычные соматические, или вегетативные клетки мицелия. Половые органы и гаметы отсутствуют. Соматогамия характерна для некоторых представителей отделов хитридиомикота и гифохитридиомикота, имеющих одноклеточный таллом. В этом случае целиком сливаются две одноклеточные особи. Такой тип соматогамии называется **хологамией**. Соматогамия у базидиомикот заключается в слиянии двух вегетативных клеток гаплоидного мицелия. При этом, как и у аскомикот, сначала имеет место только плазмогамия, в результате чего формируются дикари-

оны и образуется дикариотический (состоящий из двудерных клеток) мицелий. Это наиболее длительная стадия в цикле развития базидиальных грибов. Затем на этом дикариотическом мицелии формируются особые клетки, **базидии**, в которых происходит слияние ядер дикариона и мейотическое деление диплоидного ядра, после чего на базидии формируются **экзогенные гаплоидные базидиоспоры** (рис. 26).

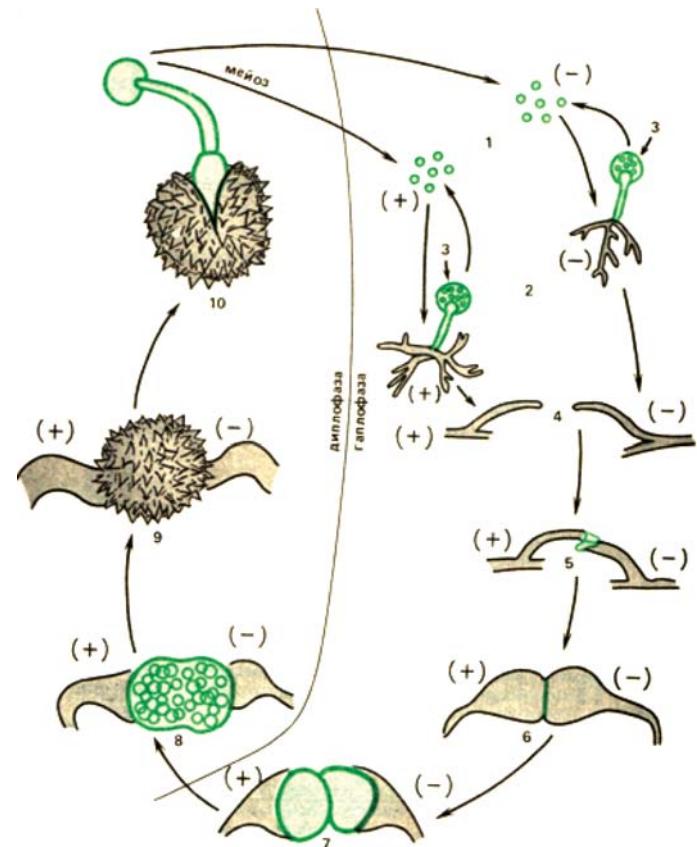


Рис. 24 (2). Жизненный цикл *Mucor mucedo*. 1 — гаплоидные спорангиспоры; 2 — вегетативный мицелий; 3 — споранги, образующиеся на вегетативном однодомном мицелии; 4 — образование зигофор в результате взаимодействия (+) и (-) нитей мицелия; 5 — слияние зигофор; 6 — формирование парагаметангия; 7 — образование ограниченного гаметангия с супензорами; 8 — молодая зигоспора; 9 — зрелая зигоспора; 10 — прорастание зигоспоры [11].

Эндогенные аскоспоры сумчатых грибов и экзогенные базидиоспоры базидиальных грибов образуются в результате полового процесса, т.е. их появление связано с половым размножением этих групп. Половой процесс сумчатых и базидиальных грибов имеет две характерные общие особенности: во-первых, разрыв между плазмогамией и кариогамией и появление дикариотической фазы и, во-вторых, отсутствие у зиготы состояния покоя: мейотическое деление диплоидного ядра происходит сразу же после слияния гаплоидных ядер дикариона.

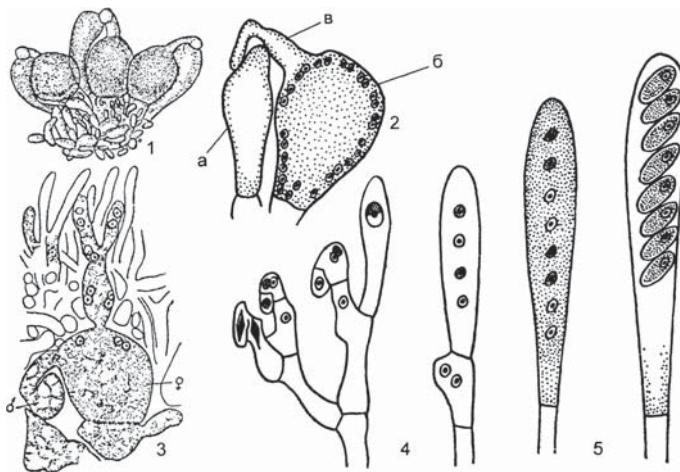


Рис. 25. Половой процесс и развитие сумок у *Pyronema omphaloides*: 1 — группа половых органов, 2 а — антеридий, б, в — аскогон с трихогиной, 3 — развитие двуядерных (дикариотичных) аскогенных гиф из оплодотворенного аскогона, 4 — схема образования сумок из аскогенных гиф с помощью крючка, 5 — молодая и зрелая сумка с аскоспорами [9].

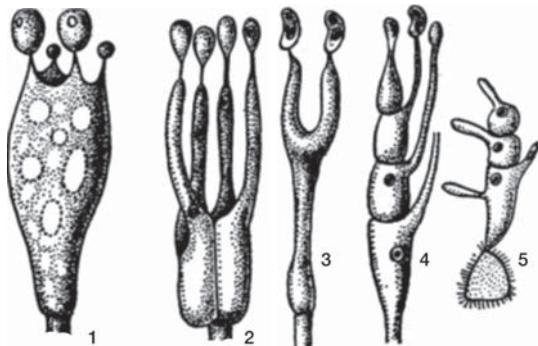


Рис. 26. Типы базидий: 1 — холобазидия; 2-4 — гетеробазидии; 5 — телио- (фрагмо-) базидия [9].

По характеру половой дифференцировки у грибов различают **гомоталличные** (обоеполые) и **гетероталличные** (раздельнополые) формы. У гомоталличных грибов к слиянию способны клетки одного и того же мицелия. На одном и том же мицелии формируются и мужской и женский половые органы (например, оогонии и антеридии у оомикотов). У гетероталличных грибов на мицелии, выросшем из одной споры, половые органы не закладываются и, соответственно, зиготы не образуются. Они развиваются лишь при встрече двух мицелиев, отличающихся друг от друга по половому знаку (+ и -, или мужской и женский). Понятие гетероталлизма относится к гаплоидной стадии, так как определение пола у грибов происходит в основном генотипически. Гетероталлизм, или раздельнополость, у грибов может быть двух типов: **биполярный**, когда пол определяется одной парой аллелей, и **тетраполярный**, когда пол определяется двумя парами аллелей, локализованных в разных хромосомах и независи-

мо комбинирующихся. В случае биполярного определения пола все гифы, выросшие из спор одного плодового тела, распадаются на две группы, и при соединении мицелиев из этих двух разных групп происходит половой процесс. В случае тетраполярного определения пола гифы, выросшие из спор одного плодового тела, распадаются на четыре половые группы. При этом группа I сливается только с группой II, и группа III только с группой IV. Численные соотношения этих групп для шляпочных грибов (базидиомицетов), у которых тетраполярный гетероталлизм распространён очень широко, соответствует отношению 1:1:1:1 (рис. 27).

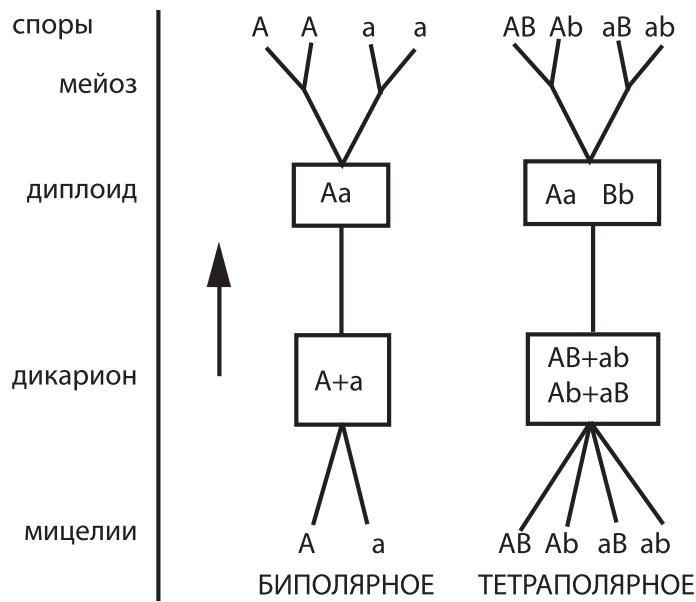


Рис. 27. Схема распределения пола у грибов.

У несовершенных (анаморфных) грибов половой процесс отсутствует, и жизненный цикл эти грибы проводят в гаплоидном состоянии. В определённой степени отсутствие полового процесса в этой группе компенсируется гетерокариозом и происходящим на его основе парасексуальным процессом. **Гетерокариоз**, или разноядерность, — это наличие в клетках мицелия генетически разных ядер. Гетерокариоз характерен для многих групп грибов и обеспечивает адаптацию грибов к изменяющимся условиям среды. В таком мицелии ядра иногда могут сливаться, образуя диплоидное гетерозиготное ядро. Такое ядро делится митотически, при этом происходит митотическая рекомбинация и затем вегетативная гаплоидизация этих диплоидных ядер путем потери или части хромосом. Этот сложный процесс, включающий в качестве существеннейшего момента митотическую рекомбинацию, получил название **парасексуального процесса**. Он известен у разных групп грибов, и имеет особое значение для несовершенных грибов, лишённых настоящего полового процесса.

2.4 Особенности деления ядра

Митоз и мейоз у грибов отличаются рядом специфических особенностей. У большинства видов грибов деление ядра происходит по закрытому типу, то есть с сохранением ядерной оболочки. Центриоли имеются лишь у псевдогрибов и некоторых грибов, имеющих жгутиковые стадии, у остальных видов веретено деления формируется более просто устроеными белковыми структурами — полярными тельцами веретена (ПТВ). Фазы митоза чередуются быстро, а хромосомы имеют небольшие размеры; в сочетании эти факторы затрудняют микроскопическое исследование, поэтому ранее считалось, что деление ядер у грибов происходит амитотически. Телофаза митоза происходит несинхронно, в результате чего могут образовываться гетеропloidные дочерние ядра, то есть содержащие неравное число хромосом. Чаще всего при гетероплоидии наблюдается различное число В-хромосом. Митоз и образование новых клеток (цитокинез) у мицелиальных (не дрожжевых) грибов происходят независимо друг от друга — ядра перемещаются в дочернюю клетку уже после отделения её перегородкой (септой) от материнской (у грибов с неклеточным мицелием цитокинез вообще наблюдается редко, при регенерации повреждённых участков и при образовании репродуктивных органов).

Репродукционное бесполое размножение происходит с помощью особых клеток — спор (рис. 22, 28), образующихся без участия полового акта. Репродукционное половое размножение включает обмен генетическим материалом при слиянии ядер (кариогамии) и редукционное деление (мейоз), связанные с образованием определенных морфологических структур.

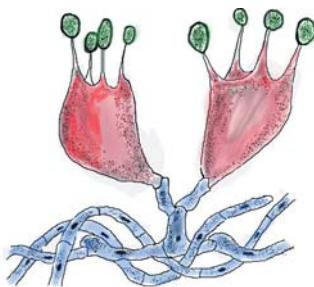


Рис. 28. Рисунок двух базидий (показаны красным цветом) с базидиоспорами (показаны зелёным)

Бесполые репродуктивные структуры называют *анаморфами*, а половые — *телеоморфами*. Грибы, имеющие половую стадию развития, называют *совершенными*. Грибы, в жизненном цикле которых отсутствует половое размножение, называют *несовершенными*, дейтеромицетами или митоспоровыми грибами.

Анаморфы и телеоморфы строго приурочены к определенной фазе жизненного цикла гриба, образуются при наличии особых условий внешней среды и выполняют дифференцированные функции (табл. 5).

Функциональная и морфологическая дифференцировка таллома

Таблица 5.

Фаза цикла развития	Функция	Морфологическая структура
Вегетативная	Прорастание	Проростковые гифы, почкающиеся клетки
	Разрастание по субстрату	Столоны, мицелий, ризоморфы, тяжи
	Поселение на хозяине	Апрессории, гифоподии, инфекционные и перфорационные гифы, гаустории, ловчие гифы
	Перенесение неблагоприятных условий	Хламидоспоры, склероции
Репродукционная бесполая	Размножение и распространение	Спорангииносцы (спорангиифоры), спорангиспоры, конидиеносцы (конидиофоры), конидии, зооспоры Гаметы, гаметангии, оогонии, аскогонии, антеридии, трихогини, ооспоры, зигоспоры, аски (сумки), аскоспоры, базидии, базидиоспоры, плодовые тела

2.5 Ультраструктура грибной клетки

Клеточная стенка

Клеточная стенка (рис. 2, 29) обеспечивает механическую прочность клетки, постоянство ее формы, служит барьером проницаемости и защищает клетку от внешних воздействий. Характерная черта клеточной стенки — способность к росту и интенсивной перестройке в течение развития грибов (в их онтогенезе).

Компоненты клеточной стенки можно подразделить на две группы: структурные компоненты (сеть микрофибрилл) и соединения, заполняющие пространство между ними (матрикс). Первые представлены полисахаридами, включающими полиаминосахара (хитин и хитозан) и глюканами, имеющими β - (1, 3), β - (1, 4), β - (1, 6) связи. Вторые являются маннопротеинами, галактоманнопротеинами, глюкуронманнопротеинами, ксиломаннопротеинами и α - (1, 3) глюканами. У мицелиальных и дрожжевых грибов имеются существенные различия в химическом составе и структуре клеточной стенки. Так содержание хитина составляет у мицелиальных грибов 0,2-26,2% от сухой массы клеточных стенок, а у дрожжевых 1-4%. Помимо полисахаридов в клеточной стенке присутствуют белки и липиды. Некоторые белки являются ферментами. Липиды клеточной стенки определяют ее гидрофобность и принимают участие в синтезе компонентов клеточной стенки, активируя хитинсинтетазу.

У многих грибов, особенно дрожжевых, внешняя часть клеточной стенки образует *капсулу* — сильно оводненный слизистый слой полисахаридной природы. В капсule локализованы многие ферменты, она принимает участие в поглощении питательных веществ из субстрата, участвует в адгезии клеток между собой и субстратом, защищает клетку от внешних воздействий (высушивания, радиации и т. п.).

Различия в размере капсул в одной и той же культуре связаны с возрастным и физиологическим состоянием клеток.

Органеллы грибной клетки

Органеллы грибной клетки характерны для большинства зукариот. В ней имеется ядро, содержащее наследственную информацию в виде ДНК, оформленной в хромосомы. Ядро заполнено нуклеоплазмой, имеет ядрышко — место синтеза прорибосом, окружено двойной оболочкой (ядерной мембраной). Ядерная мембрана имеет поры, которые связывают нуклеоплазму с цитоплазмой.

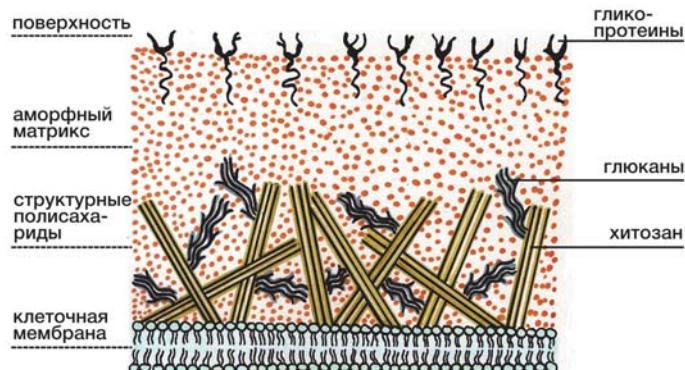


Рис. 29. Модель цитоскелета дрожжевой клетки [12].

Митохондрии содержат ферменты дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования, а также цикла трикарбоновых кислот, обеспечивая энергетические потребности клетки.

Рибосомы 80 S — это органеллы синтеза белка. Часть рибосом располагается в цитоплазме беспорядочно, однако большинство их прикреплено к мембранам эндоплазматического ретикулума, митохондриям и другим органеллам.

Одним из основных компонентов клеточных органоидов являются мембранны. С ними связано большинство метаболических процессов. Они составляют от 40 до 90% общей массы клеток.

Цитоплазматическая мембрана служит осмотическим барьером, в ней локализуется система активного транспорта, она способна к пиноцитозу и фагоцитозу.

Эндоплазматический ретикулум (ЭР) расположжен в цитоплазме в виде сети каналцев, цистерн и трубочек, не имеющих фиксированной ориентации, выполняет транспортную функцию, связывает цитоплазматическую мембрану с ядерной, образует

поверхности раздела в цитоплазме, на его мембранах могут располагаться рибосомы.

Аппарат Гольджи представляет собой систему вакуолек, он обеспечивает экскрецию (выведение) по типу обратного пиноцитоза с помощью пузырьков, аккумулирующих выводимые продукты, и транспорт веществ, синтезированных в ЭР, к другим органоидам. Кроме того аппарат Гольджи — место синтеза новых мембран и образования лизосом.

Лизосомы содержат около сотни ферментов, преимущественно гидролаз, осуществляющих функцию пищеварения.

Вакуоли образуются из ЭР и выполняют многообразные функции. В них могут накапливаться вредные продукты метаболизма, они участвуют в компартментализации веществ в клетке (их разделении и концентрации), в них накапливаются необходимые клетке метаболиты (полифосфаты, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания). Вакуоли обеспечивают тургор клеток.

Новообразование мембран ЭР и Гольджи происходит на матрице ядерной мембраны. Цитоплазма содержит включения, которые служат запасными питательными веществами: гликоген, волютин (полифосфат), липиды.

Цитоскелет наряду с мембранными структурами обеспечивает внутриклеточную организацию и высокую биологическую упорядоченность всех метаболических процессов, протекающих в клетке. Цитоскелет представляет собой развитую сеть белковых нитей (филаментов), из которых наиболее важная роль принадлежит *микрофиламентам* и *микротрубочкам*. Те и другие состоят из глобулярных белковых субъединиц, которые в клетке могут легко соединяться между собой и разъединяться. Помимо этого существуют вспомогательные белки, которые либо связывают филаменты друг с другом или с другими клеточными структурами, либо влияют на скорость и степень полимеризации филаментов. Цитоскелет связан с движением органоидов клетки и амебоидным движением, присущим некоторым грибам.

Другие подвижные клетки грибов (зооспоры, планогаметы) передвигаются с помощью жгутиков. Жгутики грибов по строению отличаются от жгутиков бактерий, но сходны с аналогичными органеллами простейших и многих подвижных гамет растений и животных.

2.6 Экологические группы грибов

Грибы широко распространены в природе на самых различных субстратах. Они предпочитают водные или влажные местообитания, но встречаются и в относительно сухих средах. Грибы являются гетеротрофами, потребляют органические соединения углерода. Азот, фосфор, сера, ионы металлов могут поглощаться

в неорганической форме. Питательные вещества грибы получают, принимая участие в разложении органического вещества или паразитируя на животных и растениях.

Многие грибы переносят значительные изменения температуры, мезофильные грибы предпочтительно развиваются в пределах 24–30°C. Термофильные — в диапазоне 33–55°C, психрофильные — от –2°C до +20°C. Свет, особенно в коротковолновой области, может влиять на спороношение грибов.

Экологические группы грибов сформировались в процессе эволюции. Сапротрофные грибы принимают участие в минерализации органических веществ, образовании гумуса, ксилотрофные грибы разлагают древесину, кератинофилы способны жить на волосах, перьях, рогах павших животных. Симбиотрофные грибы образуют микоризу, имеющую огромное значение для жизни многих растений. Лишайники — это стабильные симбиотические ассоциации гриба с водорослями или цианобактериями. Грибы-паразиты растений и животных описаны ниже.

Грибы, как и другие организмы, способны существовать в относительно узком диапазоне температур, влажности, почвенных условий и других факторов среды. Эти условия определяют их географическое распространение. Распространению популяций препятствуют географические преграды (океаны, пустыни, горные цепи) и способствуют агенты, действующие как средства переноса: воздух, вода, животные и человек.

Для некоторых грибов характерна способность находиться длительное время в неизменных и ограниченных зонах — эндемических областях (очагах). К таким грибам относятся возбудители глубоких микозов *Coccidioides immitis* и *Paracoccidioides brasiliensis*, которые встречаются в зонах с определенными климатическими условиями (Центральная Америка для первого гриба и Южная Америка для второго). Дерматофиты *Trichophyton soudanense* обнаруживается только в Африке, а *T. concentricum* — в Южной Океании. Многие грибы, в том числе возбудители многих микозов человека и фитопатогенные грибы, являются космополитами, их можно обнаружить в любой местности, где условия для них окажутся благоприятными.

2.7 Использование грибов в промышленности

С древних времен человек использует дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* для изготовления хлеба, пива, вина. Современная промышленная микробиология использует грибы для получения разнообразных продуктов: антибиотиков, алкалоидов, белков, витаминов, гербицидов, ферментов, коферментов, ингибиторов ферментов, полисахаридов, липидов, органических

кислот и др. В табл. 6 приведены антибиотики и другие БАВ, выпускаемые промышленностью для медицины и сельского хозяйства; в табл. 7 — сведения о практическом применении ферментов грибов; в табл. 8 приведены органические кислоты, которые получаются с помощью грибов. Некоторые дрожжевые грибы используют для получения кормового белка на непищевом сырье. Многие грибы из класса базидиомицетов (макромицеты, образующие крупные плодовые тела) обладают целебными свойствами, их культивируют поверхностным и глубинным (в фернентах) способами и используют как лекарственные препараты и пищевые добавки (табл. 9).

2.8 Грибы — возбудители болезней человека и животных

Грибы могут наносить вред человеку и животным путем отравления их метаболитами, вызывая состояние повышенной чувствительности к различным веществам, входящим в состав их клеток или продуцируемыми ими (микогенная аллергия), и вызывая инфекционные заболевания (микозы).

Отравление может происходить при поедании ядовитых или испорченных грибов, при неправильном приготовлении и хранении шляпочных грибов. Их токсины действуют на пищеварительную, нервную системы и на другие ткани тела.

Другая группа заболеваний, вызванных отравлением метаболитами грибов (микотоксикозы), связана с тем, что токсинообразующие грибы заселяют растения, продуцируя при этом или во время хранения урожая ядовитые вещества, действующие и после переработки растительных продуктов в корма или продовольствие.

Микогенные аллергии возникают у чувствительных людей в ответ на антигенные вещества грибов. Они проявляются в виде кожной сыпи, насморка, конъюнктивита, диареи, астматических явлений и т. п. Аллергенами могут быть клетки мицелия, споры гриба и продукты их обмена или распада. Эти заболевания могут возникать и развиваться у персонала биотехнологических предприятий, использующих грибы как продуценты БАВ, и у населения близлежащих районов за счет загрязнения воздуха при плохой очистке заводских выбросов. Меры предупреждения состоят в строгом соблюдении величины санитарной зоны у предприятия, техники безопасности (защитная одежда, маски, респираторы, герметизация оборудования), тщательной очистки воздуха, контактировавшего с микроорганизмами.

Опасна также работа в складских помещениях, где плесневые грибы могут развиваться при неправильном хранении сырья в условиях высокой влажности, образования конденсата на поверхностях и т. д. Такие помещения должны быть снажены приточно-вытяжной

Биологически активные вещества грибов, выпускаемые промышленностью

Таблица 6.

Применение	Вторичный метаболит	Продуцент	Действие
Медицина	Пенициллины	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Антибактериальное
	Цефалоспорины	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Антибактериальное
	Гризофульвин	<i>P. griseofulvum</i>	Антигрибное
	Фузидин	<i>Fusidium coccineum</i>	Антибактериальное
	Циклоспорин	<i>Trichoderma polysporum</i>	Иммунодепрессивное
	Эргоалкалоиды	<i>Claviceps purpurea</i>	Нейротропное
	Зеараленон	<i>Gibberella zaeae</i>	Стимулятор роста крупного рогатого скота
	Гибберелины	<i>G. fujikuroi</i>	Регуляторы роста растений

Ферменты грибов, выпускаемые промышленностью

Таблица 7.

Продуцент	Фермент	Применение фермента
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i>	α-амилаза	Расщепление крахмала
<i>A. niger</i>	Амилоглюкозидаза	Получение крахмальных сиропов
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Глюкоамилаза	Расщепление крахмала
<i>A. niger</i>	Глюкозооксидаза	Получение глюконовой кислоты
<i>Aspergillus</i> species	Протеиназы (кислые, нейтральные, щелочные)	Расщепление белков (в хлебопечении, виноделии)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Инвертаза	Расщепление сахарозы
<i>Aspergillus</i> species, <i>Rhizopus</i> species	Пектиназы	Осветление фруктовых соков
<i>Mucor</i> species	Реннин	Створаживание молока
<i>Mucor</i> species, <i>Aspergillus</i> species	Глюкозоизомераза	Получение сиропов с высоким содержанием фруктозы
<i>Mucor</i> species, <i>Aspergillus</i> species, <i>Penicillium</i> species	Липазы	Получение детергентов, в молочной промышленности
<i>A. niger</i> , <i>Trichoderma roseum</i> , <i>Penicillium notatum</i>	Целлюлазы	В целлюлозно-бумажной промышленности
<i>Fusarium</i> species, <i>Penicillium</i> species, <i>Trichoderma</i> species	Ксиланазы	В целлюлозно-бумажной промышленности, в сельском хозяйстве

Органические кислоты, получаемые с помощью грибов

Таблица 8.

Кислота	Продуцент
Глюконовая	<i>Aspergillum niger</i>
Койевая	<i>A. oryzae</i>
Лимонная	<i>A. niger</i>
Итаконовая	<i>Candida lipolytica</i>
Трео-изолимонная	<i>A. terreus</i>
Аллоизолимонная	<i>C. brumptii</i>
α-Кетоглутаровая	<i>C. lipolytica</i>
Фумаровая	<i>Penicillium purpurogenum</i>
Яблочная	<i>C. lipolytica</i>
Тетрадекандикарбоновая	<i>Rhizopus delemar</i>
	<i>C. hydrocarbofumarica</i>
	<i>Schizophyllum commune</i>
	<i>C. hydrocarbofumarica</i> + <i>Pichia membranaefaciens</i>
	<i>C. cloacea</i>

Лечебные свойства базидиомицетов [13]

Таблица 9.

Вид гриба	Биологически активные вещества														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Agaricus blazei</i>			*												
<i>A. bisporus</i>				+						*	*				
<i>Agrocybe aegerita</i>	+		+						+				+		
<i>Armillariella mellea</i>	+					*	*						*		
<i>Auricularia auricula-judae</i>						*	*	*							*
<i>Dendropolyporus umbellatus</i>				*						*	*	*			*
<i>Flammulina velutipes</i>	+	*	*	+							*				
<i>Fomes fomentarius</i>					+		+								
<i>Fomitopsis pinicola</i>	+	+	+										+		
<i>Ganoderma lucidum</i>	*	*	*	*	*	*	*			*	*	*	*	*	*
<i>G. applanatum</i>				+	+	+						+			
<i>Grifola frondosa</i>	+	*	*	*	*	*				*	*		+		+
<i>Hericium erinaceus</i>				+						*			*		*
<i>Hypsizygus marmoreus</i>			*												
<i>Inonotus obliquus</i>	*	*									*		*	*	*
<i>Laetiporus sulphureus</i>	+		+												
<i>Lentinula edodes</i>	*	*	*	*	*	*				*	*	*	*	*	*
<i>Lenzites betulina</i>			+					+							
<i>Marasmius androsaceus</i>	*												*		
<i>Oudemansiella mucida</i>	*														
<i>Piptoporus betulinus</i>	+		+			+									
<i>Pleurotus ostreatus</i>				+	+	+			*					*	
<i>P. pulmonarius</i>	+		+							+					
<i>Schizophyllum commune</i>	*	*			*						*		*		
<i>Trametes versicolor</i>	*	*	*									*	*		
<i>Tremella fuciformis</i>	+		+							+	+	+	+		*
<i>T. mesenterica</i>								+							+
<i>Volvariella volvacea</i>		+	+	+					+						

Примечание: * - коммерческий препарат (лекарственный или пищевая добавка)

+ - некоммерческий продукт

Биологически активные вещества:

- 1 - антрафунгальные
- 2 - противовоспалительные
- 3 - противоопухолевые
- 4 - антивирусные
- 5 - антибактериальные и антипротозойные
- 6 - регулирующие давление крови
- 7 - потенцирующие сердечно-сосудистую систему
- 8 - антихолестеринемические, антилипидемические
- 9 - антидиабетические
- 10 - иммуномодулирующие
- 11 - тонизирующие почки
- 12 - гепатопротективные
- 13 - тонизирующие нервную систему
- 14 - потенцирующие половую функцию
- 15 - применяющиеся при хроническом бронхите

вентиляцией, а температуру необходимо поддерживать постоянной, чтобы предотвратить появление конденсата.

Микозы человека. В последние десятилетия наиболее часто встречаются оппортунистические микозы, возникающие при ослабленном иммунитете и вызываемые условно-патогенными грибами, которые встречаются среди представителей родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Aleurotricha*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Candida*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Sporobomycetes*, *Trichosporon* (табл. 10). Они могут входить в состав нормальной микробиоты человека и животных и активируют свои паразитарные свойства под влиянием нерациональной антибиотической и кортикостероидной терапии, при использовании иммунодепрессантов и при ослаблении реактивности организма в связи с предшествующим заболеванием.

Наряду с этим существуют и микозы, вызванные патогенными грибами. К ним относятся дерматомикозы и глубокие микозы (кокцидиодоз, паракокцидиодоз, бластомикоз, гистоплазмоз). Всего патогенных грибов насчитывают около 100 видов, тогда как грибов-оппортунистов — несколько сотен видов.

В таблице 10 приведены наиболее важные возбудители (этиологические агенты) микозов человека. Этиологический агент — либо один паразитический вид, либо группа близких микроорганизмов. Клиническая картина микоза сильно варьирует в зависимости от фонового заболевания, локализации очага или тяжести поражения. Например, аспергиллы могут вызывать поражение кожи, подкожных тканей, легких; грибы рода *Candida* — слизистых оболочек рта и половых органов, кожи, ногтей, бронхов, легких и других органов.

Большинство возбудителей микозов — космополиты. Заражение может происходить контактным путем, через одежду, обувь (дерматомикозы), от больных животных (микроспория, трихофития). Микозы стоп, от которых страдают примерно пятая часть населения Земли, передаются при хождении босыми ногами в банях, бассейнах и т. п. Некоторые микозы представляют собой раневые инфекции (мицетомы, споротрихоз, хромиомикоз, лобомикоз). Большинство глубоких микозов — респираторные инфекции (гистоплазмоз, бластомикоз, кокцидиодоз, «плесневые» микозы).

Профилактика и терапия

Грибы, в том числе патогенные, окружают нас постоянно. Поэтому самый надежный способ профилактики — это здоровый образ жизни, способствующий укреплению иммунной системы, защищающей человека от чужеродных агентов. Сюда относится правильное питание, занятие спортом, прогулки на свежем воздухе, отказ от вредных привычек (курение, алкоголь).

Микозы ног можно предупредить, соблюдая личную гигиену. При работе в запыленных помещениях следует пользоваться респиратором.

Предрасполагающим фактором к развитию кандидоза является дисбактериоз и авитаминоз. Поэтому для его предупреждения используют препараты — эубиотики, содержащие полезные молочнокислые бактерии и витамины.

Методы терапии зависят от характера заболевания. При поверхностных микозах используют местные средства (производные имидазола, ундециленовой кислоты, нитрофенола и др.). При диссеминированных и генерализованных формах применяют антибиотики гризофульвин, нистатин, амфотерицин В и др.

Производные имидазола (амиказол, изоконазол, кетоконазол, клотrimазол, миконазол, сульконазол, тиоконазол, эконазол) и триазола (итраконазол, флуконазол) активны против мицелиальных грибов и дрожжей. Их часто применяют для лечения кандидозов.

При лечении микозов, вызванных видами *Candida* и *Cryptococcus*, используют 5-фторцитозин, первоначально предлагаемый как противоопухолевый препарат.

Производные аллиламина (батрафен, ламицил) эффективны в отношении дерматофитов, *Candida albicans*, но применяются, в основном, при лечении онихомикоза (грибковое поражение ногтей).

При диссеминированных и генерализованных формах применяют **противогрибковые антибиотики**, среди которых наибольшее распространение получили полиеновые (амфотерицин В, нистатин, пимарин, леворин, фунгизон и др.) и гризофульвин.

Амфотерицин В эффективен при лечении заболеваний, вызванных видами *Candida*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*. Другие полиеновые антибиотики (nistatin, pimarin) имеют аналогичный амфотерицину В спектр действия, но они более токсичны для млекопитающих.

Гризофульвин является антибиотиком узкого спектра действия, он эффективен против дерматофитов, но не против дрожжевых грибов, в частности, рода *Candida*. Гризофульвин вмешивается в митотический процесс при размножении грибов, воздействуя на синтез белка микротрубочек веретена.

Все эти средства применяются под контролем врача после установления диагноза заболевания. Диагностика заболевания требует установления его микотической природы методами микроскопии, а если это возможно — выделения чистой культуры возбудителя. Полезными оказываются и иммунологические методы (серодиагностика, кожные пробы). Данные лабораторных исследований должны соответствовать клинической картине заболевания, хотя симптомы микозов часто бывают неспецифичными.

Микозы животных

Домашние животные часто страдают от дерматофитии, вызываемой грибами родов *Trichophyton* и *Microsporum*, которые способны передаваться человеку. Среди возбудителей генерализованных микозов наиболее распространена *Candida albicans*, которая вызывает ощущимые потери в животноводстве и птицеводстве, особенно среди молодняка. Развитию кандидоза способствует применение антибиотиков в качестве профилактического средства для предупреждения бактериальных инфекций.

У грызунов выявлены системные заболевания кокцидиоидозом, криптококкозом, гистоплазмозом и споротрихозом.

Некоторые грибы поражают только животных и неизвестны у человека. Так *Histoplasma farciminosum* вызывает глубокий микоз у лошадей, мулов и ослов, а *Pityrosporum pachydermatis* — дерматомикоз у собак, коров, лошадей, свиней и носорогов. Грибы рода *Saprolegnia* (*Oomycetes*) паразитируют на рыбах.

Основные возбудители микозов человека

Таблица 10.

Возбудитель			Резервуар	Способ заражения	Болезнь
Класс	Телеоморфа	Анаморфа			
1	2	3	4	5	6
Basidio-mycetes	Filobasidiella neoformans	Cryptococcus neoformans	Почва, помет птиц, летучих мышей	Вдыхание	Криптококкоз
Ascomy-cetes или Deutero-mycetes	Не обнаружена	Madurella spp.	Почва, растения	Инокуляция	Мицетома
	Ceratocystis stenoceras	Sporotrix schenckii	Растения, почва	Инокуляция	Споротрихоз
	Различные Dathideales	Phialophora spp.	Растения, почва	Инокуляция	Хромомикоз
	Различные Eurotiales	Aspergillus fumigatus, другие виды Aspergillus и Penicillium	Распространены повсеместно	Вдыхание, инокуляция	Аспергиллез
	Arthroderma spp. (Onygenales)	Trichophyton spp.	Почва, животные, человек	Через кожу и волосы	Дерматомикозы
	Arthroderma spp.	Micrisorum	Почва, животные, человек	Через кожу и волосы	Дерматомикозы
	Различные Onygenales	Epidermophyton spp.	Почва, животные, человек	Через кожу и волосы	Дерматомикозы
	Ajellomyces capsulates	Histoplasma capsulatum	Почва, растения	Вдыхание	Бастомикоз
	Не обнаружена	Paracoccidioides brasiliensis	Растения, почва	Инокуляция	Паракокцидиоидоз
	Не обнаружена	Coccidioides immitis	Почва, остатки растений	Вдыхание	Кокцидиоидоз
	Не обнаружена	Candida albicans	Животные, человек и их окружение	Контакт, эндогенно	Кандидоз
	Различные Endomycetes	Другие виды Candida	Животные, человек и их окружение	Контакт, эндогенно	Кандидоз
	Не обнаружена	Malassezia furfur	Человек	Через кожу	Разноцветный (отрубевидный) лишай
	Не обнаружена	Pneumocystis carinii	Человек	Эндогенно	Пневмоцистная пневмония
Zygo-mycetes	Различные Mucorales		Распространены повсеместно	Вдыхание	Мукоромикоз
	Entomophthora coronata		Водная среда, насекомые		Энтомофтороз
	Rhinosporidium seeberi		Вредная среда		Риноспоридиоз

Глава 3. МИКРОФЛОРА РАСТИТЕЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ, ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Медицинские растения содержат широкий спектр микроорганизмов с различными отдельными свойствами и со значительными различиями относительно качественных аспектов [14]. В принципе, микробный груз растений — результат ряда влияний, вызванных источниками живой и неживой природы, и микробными загрязнителями легко передаваемыми через воздух и с почвой. Растения, как показано на рис. 30, имеют субстратную (корни) и надземную часть, что необходимо учитывать при анализе их микробной обсемененности. Субстратная (почвенная) часть находится в почве и непрерывно контактирует с почвенными микроорганизмами (грибы, актиномицеты, бактерии), вирусами и фагами, которые могут проникать в корни или колонизировать поверхность корней. Надземная часть растений постоянно контактирует с микроорганизмами и они могут оседать с пылью и водными каплями. Состав воздушной микрофлоры может периодически изменяться при изменении ветра, а так же зависит от наличия промышленных предприятий. При производстве лекарственных средств из растительного сырья важную роль играет не только контроль исходных материалов, условий хранения и переработки, но и его происхождение (предыстория). Важными факторами, влияющими на качество растительного сырья, и соответственно, определяющими дальнейшее качество и эффективность при применении, являются агрофитопоказатели (агрофон), выбор культуры, условия выращивания, сбора и сушки. Эти факторы могут оказывать влияние на микробную обсемененность растений.

Свойства постоянства и неизменности микрофлоры растений определены так же внешними факторами, которые происходят из-за естественных, сельскохозяйственных, экологических и технологических влияний (табл. 11).

Микроорганизмы являются постоянными спутниками не только человека и животных, но и, в равной степени, высших растений, в том числе используемых в качестве лекарственного сырья. В России использу-

ется более 200 видов лекарственных растений. Микроорганизмы поселяются и ведут активный образ жизни, как на поверхности, так и внутри зеленых частей растений, их корней, семян, плодов. Были собраны микробиологические данные о лекарственных растениях представленных: в табл. 12 — общее количество аэробных мезофильных бактерий, в табл. 13 — энтомобактерий.

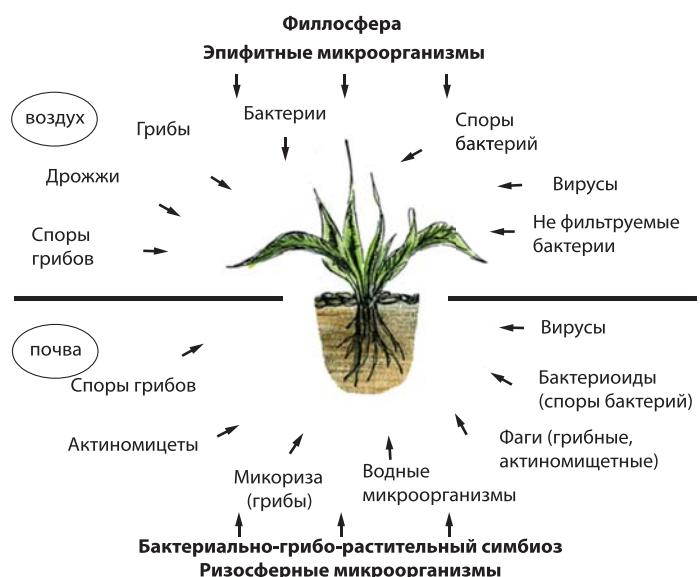


Рис. 30. Микробная обсемененность растений.

Факторы, определяющие микробиологическое качество растений.

Таблица 11.

Внутренние факторы	Внешние факторы
Природа растения и природные барьеры	Климат (температура, влажность и т.д.)
Структура растения	Сбор урожая
Состав растения (антибактериальные составы и агенты)	Физическое состояние
Внутриклеточные микробные загрязнения	Технологическая обработка
	Упаковка и условия хранения

Видовой состав микрофлоры, выделенной из НЛС и сырья

Таблица 12.

Категория ЛС	Виды грибов-контаминаントов ЛС
1. Препараты из сырья природного происхождения	<i>A. flavus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. lanosum</i> , <i>A. flavipes</i> , <i>A. ventii</i> , <i>P. P. chermesum</i> , <i>P. herquei</i> , <i>P. wakzmannii</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Pichia</i> sp., <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Alternaria consorti</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>M. strictus</i> , <i>M. racemosus</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i>
2. Лекарственное растительное сырье	<i>A. orysae</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. chevalieri</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>P. roseo-purpureum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. meleagrinum</i> , <i>P. asperosporum</i> , <i>P. raciborskii</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>P. steckii</i> , <i>P. decumbens</i> , <i>P. diversum</i> , <i>Trichoderma</i> sp., <i>T. hamatum</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>M. racemosus</i> , <i>A. consorti</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Cladosporium transchelii</i>
3. Вспомогательные материалы	<i>A. flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>P. ochrochoron</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. asperosporum</i> , <i>P. raciborskii</i> , <i>A. alternata</i> , <i>A. solani</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>M. racemosus</i> , <i>M. abundans</i> , <i>M. hiemalis</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Rh. nigricans</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Acremonium charticola</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i>

Микробиологическая чистота лекарственных растительных препаратов

Таблица № 13.

Виды лекарственного растительного сырья	Общее число бактерий аэробное культивирование в 1 г	Общее число грибов в 1 г	Наличие <i>E. coli</i>	Общее число бактерий в 1 г	
				Анаэробное культивирование	<i>C. perfringens</i>
1	2	3	4	5	6
Цветки (6 наименований) 114 серий	10^3 – 10^7	10^3 – 10^6	Менее 100	10^3 – 10^8	10^1 – 10^2
Плоды (9 наименований) 124 серий	10^2 – 10^7	10^2 – 10^4	Менее 100	10^2 – 10^8	–
Травы (16 наименований) 264 серий	10^4 – 10^7	10^3 – 10^8	Менее 100	10^2 – 10^8	10^1 – 10^2
Листья (10 наименований) 171 серий	10^4 – 10^7	10^2 – 10^5	Менее 100	10^2 – 10^7	10^1
Корни и корневища (7 наименований) 76 серий	10^3 – 10^7	10^2 – 10^4	Менее 100	10^2 – 10^8	10^2
Кора (2 наименований) 44 серий	10^4 – 10^7	10^3 – 10^4	Менее 100	10^2 – 10^5	–
Фитопрепараты промышленного производства	–	–	–	–	–

В этих таблицах перечислено большое количество растений с их соответствующими диапазонами жизнедеятельности. Весьма очевидно, что явные различия в ОЧБ (табл. 13) отражают оригинальные и экологические критерии, описанные выше. Например, относительно низко бактериальный рост найденный у некоторых растений (например, плоды Миртиллы), может произойти из-за естественных антибактериальных веществ, тогда как высокое микробное число (например, *Herba urticae*) может указать на менее благоприятные гигиенические условия. Кроме того, такие факторы как расстояние растения от почвы и отношения между размером поверхности растения и весом образца могут играть определенную роль. Хотя энтеробактерии присутствуют повсеместно в природе, наличие представителей этого семейства свидетельствует о попада-

нии фекального загрязнения. Вместе с группой колиформных бактерий, они могут служить индикатором плохих условий гигиены. О присутствии патогенных микроорганизмов на лекарственных растениях существует относительно ограниченное число сообщений, но загрязнения патогенными микроорганизмами не могут быть исключены. Недавно, Czech et al. и dr. [15] провел испытания на широкий спектр патогенов, как индикатор микроорганизмов. Было показано, что эти микроорганизмы обнаруживаются относительно редко, за исключениями *Bacillus cereus* и *Clostridium perfringens*. В 1980-х Leimbeck [14] обнаружил *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa* во многих образцах и поэтому предложил обрабатывать лекарства кипящей водой для дезактивации микроорганизмов. В настоящее время показано, что при микробно-растительных

взаимодействиях существуют бактерии — стимуляторы роста растений (*plant growth-promoting bacteria* — *PGPB*). Это, например, некоторые штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, которые защищают растения от заморозков, предотвращая кристаллообразование на надземных частях растения при кратковременном резком понижении температуры. Представители родов *Bacillus*, *Agrobacterium* и *Pseudomonas* являются «поставщиками» биоконтролирующих агентов [14].

Бактерии вызывают свыше 200 болезней растений. Большой ущерб причиняют бактериозы овощным, плодовым и техническим культурам. Длина бактериальной клетки составляет 0,5-4,1 мкм, диаметр от 0,3-0,8 мкм. Преобладающая форма грамотрицательных фитопатогенных бактерий палочковидная (исключение *Streptomyces*, которые имеют нитчатое строение). Большинство фитопатогенных бактерий подвижны за счет жгутиков [неподвижных форм не-много]. У большинства подвижных фитопатогенных бактерий жгутики полярные, реже — перитрихиальное расположение.

Так как, широко распространенные лекарственные растения, несут значительное количество грибов (плесень) с микотоксинами, продукты, получаемые макерацией в холодной воде должны особенно тщательно контролироваться. Hitokoto и др. показали, что такие формы, как Пеницилл, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Cladosporium* и *Aureobasidium* spp. могут часто обнаруживаться в ассоциации с лекарственными растительными препаратами, но продуцирующие микотоксины встречались лишь у 2%. Напротив, Kumar и Roy [16] обнаружили большие уровни риска афлатоксинов в нескольких образцах лекарственных растений различных таксонов. Учитывая эти результаты видно, что условия окружающей среды (климат, влажность, гигиена и т.д.) в значительной степени способствуют присутствию микотоксинов.

Хотя бактериальные эндоспоры и грибковые споры могут быть расценены как две доминирующие группы загрязнителей, связанных с лекарственными растениями, на растении и внутри него может находиться широкое разнообразие бактериальных, грибковых клеток и вирусов. Среди этих микроорганизмов могут также присутствовать патогенные микроорганизмы, и этот факт особенно ограничивает использование этих растений, помимо снижения качества, вызванного порчей. Кроме того, по аналогии со специями и травами, используемыми в пище, не может быть исключен факт присутствия в некоторых препаратах загрязнений от грызунов, насекомых и неорганических источников (например, камни).

Определенные растения (например, аир, мелисса, тимьян, базилик, сладкий укроп и т.д.) содержат естественные барьеры и антибактериальные вещества, которые проявляют типичные ингибиторные эффекты на микробный рост и стабильность. Считается, что

приблизительно 1400 трав и специй могут обладать антибактериальными агентами различной химической природы, такие как масла, пептиды, жидкие и органические извлечения.

Некоторые из этих биологических действий были апробированы для определенного терапевтического использования и внедрены в практическую медицину. Кроме того, вполне ожидаемо, что некоторые антиоксиданты, естественно присутствующие в растениях, могут ограничивать некоторые микробы.

Микориза — наиболее широко распространенный тип растительно-микробного симбиоза (РМС), который растения формируют с грибами, колонизирующими корни и другие подземные органы, и при котором часть микобиона (грибного партнера) находится внутри растения, а другая часть — в почве. Разделение микобиона на внутри- и внекорневую части отражает его ключевую функцию посредника между растением и почвой. В природных фитоценозах, где происходит жесткая конкуренция за почвенное питание, самостоятельное выживание растений сильно затруднено, что позволяет рассматривать зависимость большинства растений от микоризных грибов как экологически облигатную. Эта функция имеет глобальное экологическое значение, так как лишь некоторые растения (например, эфемерные и водные формы) могут самостоятельно удовлетворять свои потребности в минеральном питании и воде. При искусственной подаче полного минерального питания (например, в условиях гидропоники) большинство растений способно пройти полный цикл развития без микоризы. У орхидных растений (*Orchidaceae*) эта зависимость является еще более глубокой, так как они не могут проходить нормальное развитие без грибов, необходимых для прорастания семян, эмбриогенеза и питания лишенных хлорофилла проростков (Finlay, 2008).

Будучи многоклеточными эукариотами, микоризные [14] грибы претерпевают специфичный для симбиоза морфогенез и образуют структуры, которые не развиваются без взаимодействия с хозяином. Основываясь на строении внутрикорневой части микобиона, микоризные симбиозы разделяют на эндомикоризы (гриб проникает в растительные клетки, внутри которых образуются особые структуры, обеспечивающие максимально тесные клеточные контакты партнеров) и эктомикоризы (распространение гриба в ограниченном межклеточном пространстве). Универсальной формой эндомикоризы является арбускулярная микориза (АМ), формируемая подавляющим большинством (80-90% видов) наземных растений. Эктомикоризы (ЭМ) ограничены деревянистыми и кустарниковыми формами цветковых.

Вклад растения-хозяина в построение структур микоризы не так велик, как его вклад в построение клубеньков: он ограничен организацией тесных клеточных контактов с микобионтами (АМ), либо моди-

фикацией архитектуры корней (ЭМ). Наиболее выраженное симбиотическое развитие претерпевают корни орхидных, которые могут быть сильно редуцированы или реорганизованы в структуры, лишенные ассимиляторной функции и специализированы для поддержания и питания микобионтов.

Микроорганизмы, развивающиеся в норме на поверхности растений, относятся к эпифитам (греч. *Epi* — над, *phyton* — растение). Они не наносят вреда, являются антагонистами некоторых фитопатогенных микроорганизмов, растут за счет обычных выделений растений и органических загрязнений поверхности растений. Эпифитная микрофлора препятствует проникновению фитопатогенных микроорганизмов в растительные ткани, усиливая тем самым иммунитет растений. Наибольшее количество эпифитной микрофлоры составляют грамотрицательные бактерии *Erwinia herbicola*, образующие на мясопептонном агаре золотисто-желтые колонии. Эти бактерии являются антагонистами возбудителя мягкой гнили овощей. Обнаруживаются в норме и другие бактерии — *Pseudomonas fluorescens*, реже *Bacillus mesentericus* и небольшое количество грибов.

Болезни, вызываемые бактериями, называют бактериозами. Среди возбудителей бактериозов встречаются псевдомонады, микобактерии, эрвии, коринебактерии, агробактерии и др. К бактериозам относятся различные виды гнилей, некрозы тканей, увядание растений, развитие опухолей и др. Различают общие и местные бактериозы. Общие бактериозы вызывают гибель всего растения или его отдельных частей. Они могут проявляться на корнях (корневые гнили) или в сосудистой системе растений. Местные бактериозы ограничиваются поражением отдельных участков растений, проявляясь на паренхимных тканях. Род *Erwinia* включает виды, вызывающие болезни типа ожога, увядания, мокрой или водянистой гнили, например *E. amylovora* — возбудитель ожога яблонь и груш, *E. carotovora* — возбудитель мокрой бактериальной гнили. К роду *Pseudomonas* относят различные виды, в частности, вызывающие бактериальную пятнистость (*P. syringae* и др.), при этом на листьях образуются пятна разной окраски и размеров в зависимости от видов растений.

3.1 Микробно-растительные взаимодействия при росте и развитии растений

В качестве точки отсчета взаимодействия микроорганизмов и растений логично избрать прорастание семени в почве. Однако семена растений, попадающие в почву, уже заселены микроорганизмами, т. е. микробно-растительные отношения начинаются гораздо раньше. Довольно часто, и особенно это характерно для фитопатогенов, микроорганизмы уже находятся внутри созревшего семени. Потенциально семя рас-

тения может нести на себе бактериальные клетки, их эндоспоры или цисты, конидиоспоры и/или обрывки гиф актиномицетов, обрывки мицелия грибов и/или их конидиоспоры, цисты простейших, а также, возможно, яйца нематод и вирусы. Численность разных групп микроорганизмов варьирует и зависит от многих факторов — размера, формы, родовой и видовой принадлежности растения, наличия или отсутствия специфических покровов, местообитания растения, т. е. географических и климатических факторов и др. Обилие и разнообразие микроорганизмов, колонизирующих поверхность семени, в существенной степени определяются и биологией самих микроорганизмов. Важную роль в контаминации поверхности семян, способности удерживаться на их поверхности играют такие характеристики микроорганизмов, как размеры и морфология, структура поверхности клетки, способность к длительному выживанию в условиях низкой влажности (обезвоживании), при воздействии света и т. д. В связи с этим фактически невозможно предсказать, сколько на поверхности здорового семени может быть бактерий, тем более грибов.

На поверхности и в покровах, а в некоторых случаях и в тканях разных семян можно обнаружить бактерии, принадлежащие к родам *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Clostridium*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rhizomonas*, *Streptomyces*, *Xanthomonas* и др.;

грибы родов: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cephalosporidium*, *Cfaviceps*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Helminthosporium*, *Humicola*, *Penicillium*, *Perenospora*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Puccinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Septoria*, *Trichothecium*, *Ustilago*, *Verticillium* и др. Среди перечисленных родов бактерий и грибов много истинных фитопатогенов.

В семенах растений, даже находящихся в состоянии глубокого покоя, протекают процессы метаболизма и, следовательно, происходят обменные процессы с окружающей средой. Многие семена растений обладают специфическим, характерным для соответствующего вида запахом за счет синтеза летучих органических веществ. Эти вещества являются потенциальными субстратами для микроорганизмов. Естественно, что микроорганизмы — обитатели поверхности семян и растений в меньшей или большей степени, но постоянно ощущают на себе воздействия этих обменных процессов.

При попадании в благоприятные условия влажности и температуры семя растения набухает и прорастает (рис. 31). При набухании, а тем более прорастании в семени происходят соответствующие молекулярно-генетические и физиолого-биохимические процессы. Те же факторы — влажность и температура — оказывают соответствующее действие и на микроорга-

низмы, находящиеся на поверхности семени. Однако основное действие на микробное сообщество поверхности семян оказывает «выброс» органических веществ из набухающего и прорастающего семени. Концентрация и состав таких веществ каждого вида специфичны. Например, при прорастании семян пшеницы обнаруживаются углеводы (главным образом, глюкоза и фруктоза, а в целом — до 10 компонентов), органические кислоты (в большинстве своем — сукцинат, фумарат и малат) и до 16 аминокислот, среди которых доминируют аспарагиновая и глутаминовая.

Помимо нелетучих веществ, как при прорастании семени, так и активации метаболизма поверхностных микроорганизмов имеет место «выброс» и летучих органических веществ (ЛОВ). Взаимовлияния веществ на макро- и микроорганизмы в настоящее время активно исследуются.



Рис. 31. Прорастающее и развивающееся из семени в почве растение [21].

Прорастающее и развивающееся из семени в почве растение (рис. 31) сталкивается с различными микроскопическими биологическими объектами: микроскопическими животными, простейшими, грибами, бактериями и вирусами. Будущее растение контактирует с этими объектами как формирующейся корневой системой, так и будущей надпочвенной частью — стеблем, пока проростком. Корень контактирует с неспецифическими для него микроорганизмами, т. е. такими, контакт с которыми не приводит к его инфицированию, и со специфическими, инфицирующими корень микроорганизмами. Среди инфицирующих имеются непатогенные и типичные патогены. К непатогенным относятся, например, клубеньковые бактерии, а из грибов — микоризные, эндо- и эктомикоризные. Однако имеется и другая точка зрения, когда взаимодействие с растениями упомянутых бактерий и грибов в более широком контексте рассматривается как патогенез. Из структурных частей почвы

для микробиологии особый интерес представляет ее органическое вещество — гумус, состоящий из остатков животных и растительных организмов и обитающих в почве микробов. Поверхностный слой почвы беднее микробами, так как на них вредно воздействуют факторы внешней среды: высушивание, ультрафиолетовые лучи, солнечный свет, повышенная температура и др. Наибольшее количество микроорганизмов находится на глубине 5-15 см, меньше их на глубине 20-30 и еще меньше на глубине 30-40 см. Наиболее богаты микрофлорой возделываемые (культурные) почвы; бедны — песчаные, горные, а также почвы, лишенные растительности; содержание их в почве увеличивается с севера на юг.

К типичным почвенным бактериям относятся *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megatherium*, *Cl. tetani*, *Cl. perfringens*, *Cl. oedomaticus*, *Cl. histolyticus*, *Cl. botulinum*, *Cl. chauvoeij* а также термофильные, пигментные, непигментные и другие микроорганизмы, составляющие иногда 80-90% всей микрофлоры почвы. Пространство и почву, окружающие формирующийся корень, называют ризосферой. Считается, что первое определение понятия ризосферы было дано Хилтнером в 1904 г. В настоящее время под ризосферой понимают пространство вокруг корня от 0 до 2-8 мм в диаметре, в котором имеет место более обильное развитие микроорганизмов из-за стимулирования их роста корневыми экссудатами (выделениями), а в более широком смысле — корневыми депозитами. Пространство ризосферы иногда называют еще эндоризосферой, включая в это понятие и ткани самого корня в противовес ризоплане, под которой подразумевают только то, что находится непосредственно на поверхности корня и прикреплено к корню. Корневые экссудаты представляют собой низкомолекулярные органические вещества, продукты фотосинтеза и метаболизма растения. К ним относятся сахара, органические кислоты и аминокислоты, спирты, гормоны, витамины и др. Эти вещества «утекают» из зоны вблизи кончика корня, точнее зоны «растяжения» корня в процессе его роста и развития. Корневые ризодепозиты — более широкое понятие. Они включают не только экссудаты, но и все другие вещества — высокополимерные слизи полисахаридной и белковой природы, ферменты, отмирающие и слущивающиеся поверхностные клетки с их содержимым, куски тканей, в частности кортекс верхних стареющих участков корня, корневой чехлик, корневые волоски, летучие органические вещества и др. Считают, что в виде ризодепозитов растение теряет более 30-40% продуктов фотосинтеза.

Помимо химического воздействия на почву и находящихся в ней микроорганизмов, в том числе через изменение pH и Eh имеет место и чисто механическое воздействие растущего корня на окружающую его экосистему. Феномен более высокой плотности микроорганизмов вокруг корня за счет потребления экссудатов и ризодепозитов называется ризосферным эффектом.

В сравнительных экспериментах с выращиванием стерильных растений в стерильной и нестерильной почве показано, что в ризосфере микробно-растительные взаимодействия выражаются, в частности, и в стимуляции экссудирования растений. Численность микроорганизмов в ризосфере может превышать их численность в окружающей почве от нескольких процентов до десятков процентов и даже на порядок.

Общую численность микроорганизмов в ризосфере назвать очень трудно. Она зависит от типа почвы, растения и других факторов и может колебаться от миллионов до сотен миллиардов клеток на грамм сухой почвы.

Оказалось, что пространственно-временная организация микробного сообщества ризосфера не просто отражает зоны экссудации корня, а имеет свою специфическую структуру. Микробное сообщество развивается вдоль растущего корня волнообразно, т. е. зоны с более высокой плотностью микроорганизмов чередуются с зонами низкой плотности. При этом пики разной плотности микроорганизмов смещаются во времени вдоль корня и, следовательно, можно говорить о форме «движущейся волны» развивающегося микробного сообщества ризосфера. Волнообразное развитие микробных популяций наблюдали и в ризоплане, и в перпендикулярном корню направлении, т. е. явление волнообразного роста микроорганизмов в ризосфере представляет собой всеобщую форму развития микробного сообщества ризосфера.

Пространство, окружающее надпочвенную поверхность растения, включая ткани этого растения, называют филлосферой, а поверхность растения — филлопланой. Микроорганизмы, колонизирующие надземные поверхности растений, называют эпифитными микроорганизмами (от греч. *epi* — вокруг; *phytos* — растение). Количество эпифитных микроорганизмов, обнаруживаемых на поверхности листьев, иногда может достигать 10^8 клеток на грамм свежих листьев, или 10^6 на 1 см², что вполне сопоставимо с численностью микроорганизмов в грамме почвы. Численность и разнообразие микроорганизмов, например тех же бактерий, существенно зависят от вида растения и его местообитания, климата, погодных условий и некоторых других обстоятельств. Некоторые из них уже были упомянуты при обсуждении наличия микроорганизмов на семенах растений. Это опять же сапротрофные и фитопатогенные представители родов *Pseudomonas* (*P. syringae*, *P. fluorescens* и др.), *Erwinia* (*E. carotovora*, *E. amylovora*), *Xanthomonas* (*X. campestris*), *Agrobacterium* (*A. tumefaciens*), родов *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium* и многих других. Имеются различия в микробном сообществе верхней стороны листа и нижней. Существенную роль в этом играют свет и температура. Естественно, что растения пустынь, суккуленты, содержат гораздо меньше микроорганизмов на единицу площа-

ди поверхности или на грамм, чем растения влажных тропических лесов.

Как упоминалось выше, возле корней растений в почве находится большое количество ризосферных микроорганизмов. Здесь встречаются псевдомонады, микобактерии (неспорообразующие палочки), актиномицеты, а также спорообразующие бактерии и грибы. Эти микроорганизмы переводят различные сложные вещества в соединения, доступные для растений, синтезируют биологически активные соединения (витамины, антибиотики и др.), вступают в симбиотические взаимоотношения с растениями, обладают антагонистическими свойствами по отношению к фитопатогенным микробам. Состав ризосферы специфичен для каждого вида растений. Растения культурных почв в большей степени загрязнены микроорганизмами, чем растения лугов и лесов. Особенно много микробов содержится в нижней части растений, что связано с их попаданием из почвы. В большом количестве обнаруживаются микроорганизмы на растениях, растущих на свалках, вблизи навоза, в местах выпаса скота. При этом на растениях могут быть обнаружены и патогенные микроорганизмы.

Микробная обсеменённость растительного лекарственного сырья зависит от исходной загрязненности, но может повышаться на этапах первичной обработки, измельчения, приведения в стандартное состояние. Порча сырья происходит в основном при повышенной влажности, способствующей размножению гнилостных микроорганизмов. Наиболее обильно микроорганизмы представлены в почве, особенно в прикорневой зоне. В её состав входят различные микобактерии, псевдомонады, спорообразующие, азотфикссирующие и нитрифицирующие бактерии, актиномицеты и грибы. Вокруг корней растений находится зона интенсивного роста и повышенной активности микробов. Поверхность корневой системы колонизируют преимущественно псевдомонады и грибы. Последние вступают в симбиотические отношения с растениями и образуют мицелий (грибокорень), стимулирующую рост обоих партнёров.

3.2 Фитопатогенные грибы

К фитопатогенным микроорганизмам относят бактерии, вирусы и грибы. Фитопатогенные грибы вызывают микофитозы [20].

Грибы, вызывающие заболевания лесных пород и культурных растений, наносят огромный ущерб. Массовые заболевания растений (эпифитотии) могут быть причиной голода населения целых стран. Болезни снижают потенциальный урожай на 10—20% и более. В Центральной Европе насчитывают до 162 серьезных заболеваний сельскохозяйственных культур. Из них 135 (83%) вызываются грибами, остальные — бактериями и вирусами. Поражая лекарственные растения, грибы, как и другие микроорганизмы, делают их непригодными для использования в качестве сырья

в фармацевтической промышленности (описание фитопатогенных грибов и бактерий приводятся в главе 3).

Паразитические грибы подразделяются на экто- и эндопаразиты. Эктопаразиты распространяются преимущественно по листьям, внедряясь в клетки хозяина только специализированными органами (например, гаусториями), и спороносят на его поверхности. К ним относятся возбудители мучнистой росы злаков, тыквенных, табака, картофеля. Эндопаразиты развиваются своей таллом внутри хозяина, при спороношении они выходят наружу.

В зависимости от типа взаимоотношения гриба и растения-хозяина различают облигатные и факультативные паразиты. Первые поражают только живые ткани и не растут на обычных питательных средах. К таким грибам относятся важнейшие для экономики фитопатогенные грибы, например *Puccinia graminis* (черная ржавчина злаков) и *Peronospora tabacina* (ложная мучнистая роса табака).

Факультативные паразиты также поражают живые ткани растения, но после его отмирания не погибают, они могут расти на лабораторных питательных средах. К ним относятся многочисленные грибы, разрушающие древесину. Они вызывают практический интерес в связи с проблемой утилизации отходов сельского и лесного хозяйства.

Фитопатогенные грибы различаются по специфичности выбора растения-хозяина. Например, среди возбудителей мучнистой росы *Erysiphales* имеются как виды, поражающие только определенные расы хозяина, так и грибы, которые поражают растения из разных порядков. Ржавчинные грибы *Puccinia graminis* в гаплофазе развивается на барбарисе, а в дикариотической — на злаках. Некоторые паразитические грибы предпочитают отдельные органы растений. Например, пурпурная спорынья *Claviceps purpurea* инфицирует только завязи злаков, *Ustilago violacea* (возбудитель головни злаков) — только тычинки. Грибы рода *Verticillium* развиваются в сосудах растения, нарушая движение соков, что приводит к его увяданию и гибели.

Гриб проникает в ткань растения через устьица или через раны на его поверхности; они способны прорывать поверхностные структуры своими инфекционными гифами. Далее гриб распространяется по растению, что сопровождается появлением симптомов его заболевания. На следующей стадии инфекционного процесса гриб развивает органы спороношения, а реакция растения зависит от количества и качества возбудителя заболевания.

3.3 Бактерии — возбудители болезней растений

Способностью вызывать болезни растений обладают различные вирусы, бактерии и грибы (фитопатогенная микрофлора) [15, 20]. Поражения, вызываемые

фитопатогенными бактериями называют бактериозами. По локализации процесса выделяют общие и местные поражения. Первые вызывают гибель всего растения или отдельных его частей, вторые — отдельных участков растения. По механизму поражения бактериозы разделяют на паренхиматозные заболевания, сосудистые поражения и опухоли.

Паренхиматозные заболевания развиваются при попадании бактерий в ткани растений через различные анатомические отверстия (устыица, чечевички, нектарники) и повреждения покровных тканей. Возбудители выделяют ферменты и токсины, облегчающие их распространение по межклеточным пространствам. Проникновение бактерий вглубь вызывает массовую гибель клеток. К ним относят гнили (основные возбудители — бактерии родов *Pseudomonas* и *Erwinia*), ожоги (основные возбудители — виды *Erwinia* и *Corynebacterium*) и пятнистости (основные возбудители — виды *Pseudomonas* и *Xanthomonas*).

Сосудистые поражения развиваются при распространении бактерий по сосудам растений. Основные возбудители — виды *Corynebacterium* (*C. fascians*, *C. insidiosum*, *C. michiganense*). Бактерии размножаются в сосудах, вызывая их закупорку за счёт повреждения стенок, что приводит к увяданию растения.

Микрофлора, обитающая на лекарственном растительном сырье могут включать представителей нормальной эпифитной и фитопатогенной микрофлоры. Состав нормальной микрофлоры растений зависит от вида, возраста растений, типа почвы, температуры, влажности окружающей среды, от других условий произрастания, от времени проверки растений, их высоты и целостности. В норме на поверхности живых растений (на листьях, стеблях, плодах, семенах) обитают микроорганизмы (эпифитная микрофлора). Они питаются выделениями растений и органическими загрязнениями на поверхности растений. Эпифитная микрофлора не наносит вреда и препятствует проникновению фитопатогенных микробов в растительные ткани (антагонистическое действие). К эпифитной микрофлоре относятся: Г[−] бактерии *Erwinia herbicola* (на МПА образует золотисто-желтые колонии), грам[−] полиморфная палочка *Pseudomonas fluorescens* (на МПА — прозрачные колонии с флюоресценцией), Бактерии образуют зелёный пигмент пиовердин, вызывающий флуоресценцию колоний при коротковолновом УФ-облучении. Пиовердин обладает свойством бактериоцина, действующего на грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также проявляет умеренную фунгицидную активность. К эпифитной микрофлоре относятся Г⁺ спорообразующие бактерии — *Bacillus mesentericus*, *Bacillus vulgaris*, бесспoreвые бактерии — *Bacterium putidam*, *E. coli*, а также небольшое количество грибов. Осенью на листьях обнаруживается больше микробов, чем ранней весной. При повышении влажности воздуха повышается

количество микробов на поверхности растений (эпифитные микрофлора). На поврежденных растениях накапливается большое количество пыли, а, следовательно, и микроорганизмов.

Поверхность некоторых фитопатогенных бактерий покрыта слизистым слоем — капсулой. Она имеет большое значение для выживания бактерий в неблагоприятных условиях: они становятся устойчивыми к действию солнечных лучей, химических веществ и других факторов. Во влажную погоду бактериальные клетки накапливаются на поверхности пораженных органов в виде скопления слизи — экссудата. По характеру питания фитопатогенные бактерии — гетеротрофы, способные расти на питательных средах. На твердых питательных средах бактерии образуют колонии, окраска, форма, поверхность которых типична для данного штамма.

Фитопатогенные бактерии относят к тем же родам и видам, что и сапротрофные формы.

Симптомы заболевания и типы бактериозов

По воздействию бактерий на растение и степени поражения тканей бактериозы делят на два типа: диффузные или системные, и местные или локальные.

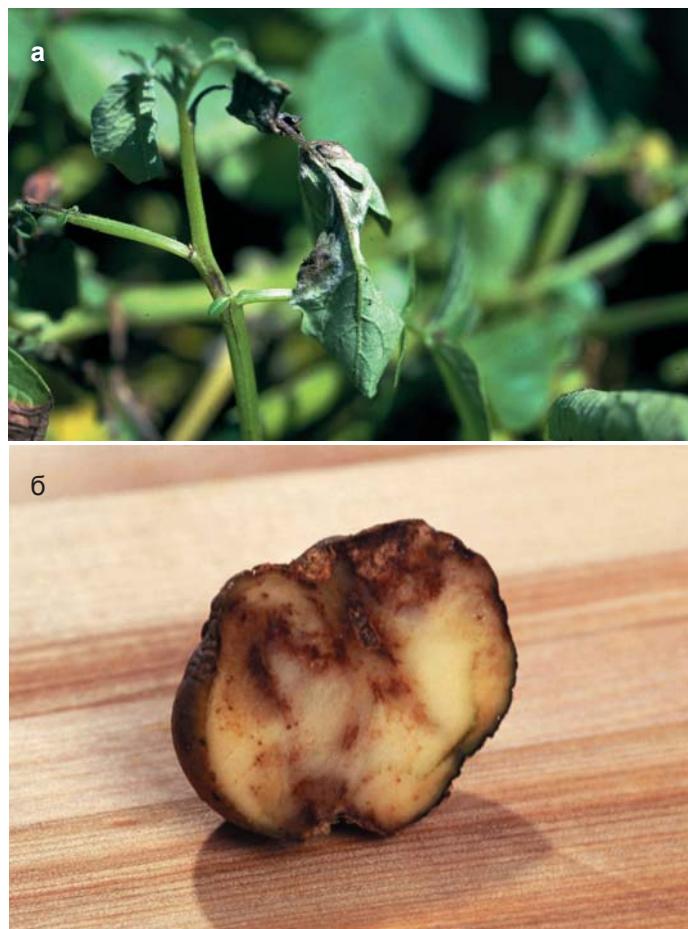


Рис. 32. Диффузный бактериоз. Кольцевая гниль картофеля: а) пораженное растение, б) пораженный клубень.

При диффузных бактериозах возбудитель проникает в сосудистую систему, распространяется по про-

водящим пучкам и прилегающим к ним тканям. При этом нарушается процесс поступления в растение воды, и оно увядает. Увядание — основной симптом системных бактериозов. Симптомы некоторых бактериозов представлены на рис. 32. Под *увяданием* понимают патологические изменения тканей отдельных органов или всего растения, связанные с потерей ими тurgора. По мере размножения бактерий сначала закупориваются сосудистые пучки отдельных органов, а затем — всего растения, и растение увядает. Например, бактериальное увядание томата сначала проявляется лишь на отдельных листьях, позже — на некоторых побегах, и, наконец, растение увядает полностью под воздействием возбудителя этой болезни — *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Бактериальные болезни растений — болезни растений, вызываемые бактериями *Pseudomonas*, *Erwinia*. Причиняют большой вред многим видам растений. Поражения могут быть общими, вызывающими гибель всего растения или отдельных его частей, проявляться на корнях (корневые гнили), в сосудистой системе (сосудистые болезни); местными, ограничивающимися заболеванием отдельных частей или органов растения, а также проявляться на паренхимных тканях (паренхиматозные болезни — гнили, пятнистости, ожоги); могут носить смешанный характер. Особое место занимают бактериозы, связанные с появлением новообразований (опухолей).

Возбудители бактериозов, главным образом, неспороносные бактерии из семейства *Muscobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacteriaceae*. Среди них существуют многоядные бактерии, поражающие многие виды растений, и специализированные, поражающие близкородственные растения одного вида или рода. Многоядные бактерии вызывают следующие наиболее распространённые бактериозы: мокрые гнили и корневой рак различных плодовых деревьев, винограда.

Специализированные бактерии вызывают бактериальную пятнистость фасоли, бактериоз огурцов, чёрную бактериальную пятнистость и бактериальный рак томатов, сосудистый бактериоз капусты, рябуху табака, чёрный и базальный бактериоз пшеницы, бактериальный ожог косточковых, груш, шелковицы, цитрусовых, кольцевую гниль и чёрную ножку картофеля, гоммоз хлопчатника, полосатый бактериоз проса и ячменя и другие болезни.

Возникновение и развитие бактериоза [17] зависит от наличия инфекционного начала и восприимчивого растения, а также от факторов внешней среды, изменения которых можно управлять течением инфекционного процесса. Например, бактериоз огурцов в теплицах развивается только при наличии капельножидкой влаги и температуры воздуха 19–24°C. Проветривая теплицы и повышая в них температуру, удаётся приостано-

вить развитие болезни. Как отмечалось ранее бактерии проникают в растения через различные повреждения и естественные ходы; например, возбудители различных пятнистостей — через устьица листьев, ожога плодовых деревьев — через нектарники цветков, сосудистых бактериозов крестоцветных — через водяные поры в листьях. Развитию бактериоза способствуют кроме повышенной влажности и температуры воздуха наличие на растениях капелек воды, а также недостаток фосфора и калия, высокий pH почвы.

3.4 Бактериальная пятнистость, бактериальный ожог, сосудистый бактериоз

Болезнь чаще поражает молодые листья и побеги. Бактериальные пятнистости в зависимости от вида патогена имеют различные симптомы. Наиболее характерная картина, когда на поверхности листа или стебля сначала образуются мелкие водянистые пятна, которые постепенно приобретают чёрный цвет. Чаще всего пятна имеют неправильно-угловатую форму, и ограничены желтой или светло-зеленой каймой. Бактерия распространяется чаще всего вдоль жилок. Пятна растут, сливаются, чернеет весь лист. В конечном итоге растение погибает.

Оптимальные условия для развития бактерий — это температура 25-30°C и высокая влажность воздуха. Гибель бактерий наступает только при температуре выше 56°C. Бактерии рода *Xanthomonas* устойчивы к высушиванию и долгое время может переносить пониженную температуру.

Вариантом бактериальной пятнистости является так называемые бактериальный ожог, который вызывают бактерии рода *Pseudomonas*. В этом случае на растения появляются не пятна, а довольно большие бесформенные области почернения, которые затем усыхают. Выглядит так, как будто этот участок листа подгорел. Если болезни сопутствуют благоприятные условия, то развивается она, очень быстро вызывая отмирание отдельных частей и гибель всего растения. Начинается бактериальный ожог чаще с молодых листьев, побегов и цветков. Бактерии проникают в растения через устьица или ранки, начинают размножаться в межклетниках паренхимы листьев. Инкубационный период развития заболевания 3-6 дней в зависимости от температуры. Бактерии сохраняются в почве и на семенах.

Источник

Одним из важнейших источников заражения являются семена. При прорастании семян они могут заражать всходы, а затем по проводящим сосудам передвигаться в растения и заражать взрослые растения в период вегетации. Кроме того, больные семена могут служить источником распространения инфекции, причиной появления бактериозов в таких районах, где раньше их не было. Инфекцию могут распространять

также и зеленые растения, в которых бактерии хорошо сохраняются и переносятся в новые районы страны вместе с зараженными растениями (черенки, окулировочные материалы — глазки). Одним из основных источников заражения бактериозами являются остатки больных растений. Особенно долго и хорошо фитопатогенные бактерии сохраняются в деревянистых частях растений.

Почва как источник инфекции не представляет большой опасности. Многочисленные исследования показали, что фитопатогенные бактерии, попадая в почву, быстро погибают под воздействием микробов-антагонистов (происходит как бы самоочищение почвы).

Некоторые виды насекомых также могут являться источником первичной инфекции. Большую опасность в распространении бактериозов представляют капельки дождя с мелкими частицами остатков больных растений, которые ветром и воздушными течениями разносятся на далекие расстояния (воздух сам по себе не играет роли в непосредственной передаче заболеваний). Переносить фитопатогенные бактерии может также и вода — поливная, вода рек и других источников. И наконец, в природе в распространении бактериозов немаловажную роль играют нематоды.

Местные бактериозы проявляются в поражении паренхимной ткани отдельных органов растений. Основные их симптомы — это некрозы, хлорозы, гнили и опухоли. Местный тип гнили наблюдается, например, при поражении плодов абрикоса (побурение плодов). Гниль локализуется около косточки плода; болезнь вызывается почвенной спорообразующей бактерией *Bacillus mesentericus* (рис. 33).



Рис. 33. Местный бактериоз.

Для некоторых бактериозов характерно появление бактериального экссудата. Его выделяют возбудители: бактериального ожога плодовых (*Erwinia amylovora*), угловатой пятнистости огурца (*Ps. syringae* рв. *lachrymans*), бактериоза фасоли (*X. phaseoli*) и другие бактерии преимущественно при высокой влажности воздуха.

Меры борьбы и профилактики [16]

Некоторые болезни передаются семенами, поэтому важным мероприятием оказывается обеззараживание семян. Одним из источников инфекции яв-

ляются опавшие на поверхность почвы пораженные растительные остатки. Поэтому эффективна глубокая зяблевая вспашка, способствующая перемещению паразитов вглубь почвы, где они погибают под антагонистическим воздействием бактерий и актиномицетов или поедаются простейшими животными. Важное значение имеет сбор и уничтожение опавших листьев, плодов, ветвей, правильный севооборот, препятствующий накоплению в почве заразного начала.

Широко используются меры химической защиты растений. Большое значение имеет правильная обработка почвы и внесение удобрений, что повышает сопротивляемость культурных растений. Весьма важны выведение и подбор устойчивых к заболеваниям сортов, интересны также сверхчувствительные сорта, быстрая гибель которых ведет к прекращению развития паразитического гриба. Для предупреждения переноса возбудителей из одной страны в другую существуют специальные карантинные службы, осуществляющие специальные мероприятия.

Растение можно спасти, если бактериоз еще не поразил всю сосудистую систему или носит местный характер (например, гниль началась с кончика листа). Если сгнили корни, то еще можно попробовать укоренить верхушку (если данное растение укореняется черенками). Если гниение поразило только часть корней, а надземная часть выглядит живой, можно попытаться спасти растение — для этого нужно освободить корни от земли, срезать все гнилые, пересадить в сухую подготовленную почву, полить и опрыскать бордоской жидкостью (или медьсодержащими препаратами). Зараза не перекинется на другое растение стоящее рядом, но весь рабочий инструмент и горшки необходимо тщательно дезинфицировать.

При прорастании семян они могут заражать всходы, а затем по проводящим сосудам передвигаться в растения и заражать взрослые растения в период вегетации. Кроме того, больные семена могут служить источником распространения инфекции, причиной появления бактериозов в таких районах, где раньше их не было. Инфекцию могут распространять также и зеленые растения, в которых бактерии хорошо сохраняются и переносятся в новые районы страны вместе с зараженными растениями (черенки, окулировочные материалы — глазки). Одним из основных источников заражения бактериозами являются остатки больных растений. Особенно долго и хорошо фитопатогенные бактерии сохраняются в деревянистых частях растений.

Некоторые виды насекомых также могут являться источником первичной инфекции. Большую опасность в распространении бактериозов представляют капельки дождя с мелкими частицами остатков больных растений, которые ветром и воздушными течениями разносятся на далекие расстояния (воздух сам по себе не играет роли в непосредственной передаче

заболеваний). Переносить фитопатогенные бактерии может также и вода — поливная, вода рек и других источников. И наконец, в природе в распространении бактериозов немаловажную роль играют нематоды.

3.5 Микоплазмы (фитоплазмы)

Фитоплазмы относят к прокариотам, т. е. организмы, не имеющие настоящего ядра. Ядерный аппарат у этих организмов называют обычно нуклеотидом.

Микоплазмы давно известны в качестве возбудителей болезней человека и животных. Микоплазмы (фитоплазмы) — возбудители болезней растений открыты лишь в 1967 г. Их обнаружили японские ученые при помощи электронного микроскопа во флюэме растений шелковицы, пораженных карликовостью. Эти микоплазмоподобные организмы (МПО) оказались фитопатогенными. Было установлено, что они передаются от растения к растению цикадками, листоблошками (ксилидами) и повиликой и вызывают болезни, подобные «ведьминым метлам» и желтухам (рис. 34). По свойствам МПО напоминали организмы, входящие в группу микоплазм. Однако в отличие от микоплазм животных, обнаруживаемых обычно вне клеток, фитоплазмы были выявлены внутри клеток.

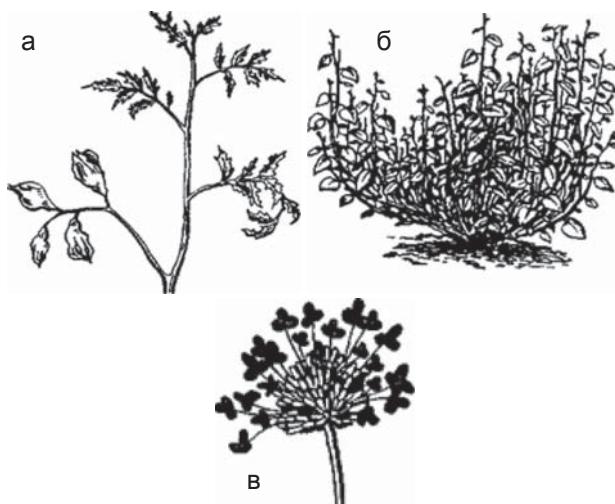


Рис. 34. Симптомы фитоплазмозов: а — столбур томата; б — «ведьмины метлы» картофеля; в — позеленение цветков (филлоидия) клевера.

Фитоплазмы — специфическая группа фитопатогенных организмов, занимающих промежуточное положение между бактериями и вирусами. Клетки их, как правило, округлы, но некоторые имеют удлиненную или гантелиобразную форму. Диаметр клеток — 0,1-1 мкм.

Фитоплазмы не имеют настоящей клеточной стенки, и поэтому не имеют постоянной формы, окружены трехслойной элементарной мембраной, чем и отличаются от бактерий.

По сравнению с вирусами для них характерны клеточное строение и способность размножаться

на искусственных питательных средах. На плотных средах они образуют мелкие специфические колонии, по виду напоминающие «яичницу-глазунью». В отличие от вирусных частиц, в клетках фитоплазм присутствуют два типа нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и рибосомы, по размерам близкие к рибосомам бактерий. Фитоплазмы, в отличие от бактерий, устойчивы к пенициллину, но по сравнению с вирусами чувствительны к тетрациклину.

Переносчиками фитоплазм служат в основном цикадки, листоблошки, светоноски. Фитоплазмы могут сохраняться только в живых тканях растения: клубнях, корневищах, луковицах, корневищах многолетних сорняков. В насекомых — переносчиках фитоплазмы могут длительное время сохраняться и размножаться.

Риккетсии. В 1972 г. во флоэмной части растений клевера с деформированными листьями были обнаружены организмы, морфологически сходные с риккетсиями — облигатными внутриклеточными паразитами

позвоночных и беспозвоночных животных, получившие название риккетсиеподобные организмы.

Основные возбудители опухолей растений — бактерии рода *Agrobacterium* (наиболее часто *A. tumoralis*). Агробактерии содержат онкогенные плазмиды. После их переноса в растительных клетках развиваются специфические опухоли — корончатые галлы. Возбудители микофитозов также вызывают паренхиматозные и сосудистые поражения растений. Использование сырья, обсеменённого грибами, в качестве пищевых продуктов может вызвать тяжёлые заболевания — микотоксикозы. Фитопатогенные вирусы вызывают мозаичные болезни, желтуху, карликовость. Их характерная особенность — появление слабоокрашенных пятен или целых участков, а также задержка роста растений. Помимо вирусов, к фитопатогенам относят и вириоиды.

Почти все фитопатогенные бактерии грамотрицательные; лишь виды родов *Clavibacter* и *Streptomyces* дают положительную реакцию.

Глава 4. НАДЛЕЖАЩАЯ ПРАКТИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И СБОРА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (GACP)

Правила культивирования и сбора растений содержат следующие главы: введение, общая часть, обеспечение качества, персонал и квалификация, здания и производственная зона, оборудование, документация, семена и рассада, культивирование, сбор, уборка урожая, первичная обработка, упаковка, хранение и дистрибуция [22].

Применение правил гарантирует, что лекарственное растительное сырье:

1) произведено в гигиенических условиях с минимальной микробиологической обсемененностью;

2) обработано и хранилось таким образом, чтобы не было снижено качество последнего.

Требования к посадочному материалу. Семена и рассада должны быть получены от растений, у которых четко идентифицированы следующие признаки: род, вид, сорт, культурная разновидность, хемотип, происхождение. Использование генетически модифицированных растений или семян должно соответствовать положениям местных законодательных актов.

Следует учитывать принципы эффективности сельского хозяйства, в том числе и соответствующий севооборот. Лекарственные растения не следует культивировать на почве, контактированной шламами, тяжелыми металлами, отходами, продуктами защиты растений и другими химикатами. Химикаты для улучшения роста и защиты следует применять в минимальном объеме. Вода для полива должна соответствовать стандартам качества. По возможности следует избегать применения пестицидов и гербицидов. Если же их применение необходимо, то только в соответствии с рекомендациями производителя, силами квалифицированного персонала и с помощью утвержденного оборудования.

Требования к заготовке ЛРС. Сбор (заготовка) должен проходить в соответствии с положениями нормативных документов по защите видов растений. Методы сбора не должны наносить вред среде места произрастания и должны оставлять оптимальные условия для регенерации собираемых растений.

Уборка урожая должна проводиться при наилучших условиях, когда нет: влажной почвы, росы, дождя,

высокой влажности воздуха. Если же приходится убирать урожай при перечисленных выше условиях, необходимо предпринять меры против повреждения урожая за счет влажности и задокументировать этот факт. Уборочные машины должны быть отрегулированы таким образом, чтобы контаминация от почвы была сведена к минимуму. Растения не должны (или минимально) контактировать с почвой; их следует в ускоренном порядке доставить к месту первичной переработке при соблюдении необходимых условий (чистота, сухость). В ходе уборки урожая необходимо обеспечить, чтобы в массу лекарственного растительного сырья не попадали примеси других растений, особенно ядовитых.

Контейнеры, используемые при уборке урожая, должны быть очищены от предыдущего сбора. Контейнеры, которые не используются, должны храниться в сухом месте, незагрязненном от вредителей, грызунов, хозяйственных и домашних животных. Необходимо предотвратить возможность механического повреждения и утрамбовки (слеживания) сырья, т.е. мешки заполнять сырьем следует в соответствии с разработанными нормами по максимально допустимой массе одной единицы упаковки сырья. Свежесобранное сырье необходимо как можно скорее доставить на место первичной переработки сырья, с целью предотвращения теплового разложения.

Первичная обработка растений может включать в себя следующие этапы: мойку ЛРС; отделение необходимой части растения (или нарезку перед сушкой, например, в случае корней); фумигацию; замораживание; дистилляцию и сушку.

В случае сушки на открытом воздухе сырье необходимо распределить тонким слоем. Для обеспечения циркуляции воздуха полки сушилки следует расположить на достаточном расстоянии от земли. Сушка на земле или под прямым солнечным светом допускается только в тех случаях, когда она не повлияет на качество сырья. Каждую серию лекарственного растительного сырья необходимо проверять по числовым показателям и, если это необходимо, просеивать через сито. Сита следует поддерживать в чистом и работоспособном состоянии. Необходимо наличие промар-

кированных емкостей для отходов, которые ежедневно опорожняются и очищаются. Для защиты продукта и уменьшения риска поражения вредителями рекомендуется своевременная упаковка.

Упаковка продукта должна проводиться при текущем контроле в чистые, лучше всего, в новые пакеты, мешки или ящики. Маркировка должна быть четкой, устойчивой и нетоксичной.

Спецификации на исходное сырье

Однако лекарственные растения первоначально не свободны от микробов, и таким образом, в обычном контроле необходимо рассмотреть несколько параметров гигиены, особенно когда растение применяется в медицинских целях. После этой фундаментальной потребности оценка микробного загрязнения все более и более стала неотъемлемой частью НАССР [23]. В этом контексте микробный риск, свойственный лекарственным растениям, может изменяться относительно различных стадий производства, и это должно быть учтено в систематической стратегии проверки качества (табл. 14). Даже в высушенных растительных продуктах, некоторые микроорганизмы, в особенностях их споры, могут переживать периоды длительного хранения.

Оценка риска микробиологического загрязнения на различных стадиях производства лекарственных растительных препаратов и пищевых продуктов

Таблица 14.

Уровень риска

Предварительное культивирование	(+)
Полевое культивирование	++
Сбор урожая	++
Промежуточное хранение	+
Транспортировка	(+)
Обработка (очистка, резка, сушка, упаковка)	+
Конечный продукт (упакованный, на хранении)	-

Объяснение символов: «—» отсутствие риска, (+) низкий риск, «+» средний риск, «++» высокий риск.

В медико-экологических исследованиях можно выделить, как минимум, два типа риска:

— Реальный риск — количественное выражение ущерба общественному здоровью, связанного с загрязнением среды обитания, в величинах дополнительных случаев заболеваний, смерти и др.

— Потенциальный риск — возможность неблагоприятного для человека эффекта, определяемый как вероятность возникновения этого эффекта при заданных условиях. Выражается в процентах или долях единицы. При изучении вероятности возникновения инфекционных заболеваний или пищевых токсикоинфекций, можно говорить о потенциальном риске инфекционных заболеваний. Инфекционная опасность во многом определяется степенью обсемененности продукта (КОЕ/г).

Одним из подходов по обеспечению микробиологической безопасности растительного сырья и фитопрепаратов на его основе может являться разработка анализа микробиологического риска (AMP) [15, 17]. Он служит новым средством научно-обоснованной оценки как факторов риска, связанных с пищей, так и мер, которые будут предприниматься для их минимизации или ликвидации.

Производители лекарственных растительных препаратов должны убедиться в том, что они используют только то исходное сырье растительного происхождения, которое произведено в соответствии с GACP. Следует иметь в наличии исчерпывающую документацию касательно аудитов поставщиков исходного сырья растительного происхождения, проведенных либо самим производителем лекарственного растительного препарата, либо по его поручению. Результаты аудитов в отношении растительного сырья являются основополагающими для качества исходного сырья. Производитель должен убедиться в том, что поставщики растительного сырья/препарата работают в соответствии с правилами надлежащего выращивания и сбора растений (GACP).

4.1 Микробиологический контроль лекарственных средств

Растительное лекарственное сырье может обсеменяться микроорганизмами в процессе его получения: инфицирование происходит через воду, нестерильную аптечную посуду, воздух производственных помещений и руки персонала [12].

Обсеменение лекарственного сырья возможно на всех этапах его заготовки и при хранении. Активному размножению микроорганизмов способствует увлажнение растений и растительного сырья. Размножившиеся микроорганизмы вызывают изменение фармакологических свойств препаратов, полученных из лекарственных растений. Микроорганизмы могут также попадать из окружающей среды, от людей и обсеменять лекарственные препараты в процессе их изготовления из растительного сырья. Для соблюдения санитарного режима изготовления лекарственных препаратов проводят санитарно-микробиологический контроль объектов окружающей среды предприятия и каждой серии выпускаемой лекарственной формы. Лекарственные средства для парентерального введения в виде инъекций, глазные капли, мази, пленки и др., в отношении которых имеются соответствующие указания в нормативно-технической документации, должны быть стерильными. Контроль стерильности лекарственных средств проводят путем посева на тиогликолевую среду для выявления различных бактерий, в том числе анаэробов; при посеве на среду Сабуро выявляют грибы, главным образом рода *Candida*. Стерильность лекарственных

средств с антимикробным действием определяют путем мембранный фильтрации: фильтр после фильтрации исследуемого препарата делят на части и вносят для подращивания задержанных микроорганизмов в жидкие питательные среды. При отсутствии роста препарат считается стерильным. Лекарственные средства, не требующие стерилизации, обычно содержат микроорганизмы, поэтому их испытывают на микробиологическую чистоту: проводят количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов в 1 г или 1 мл препарата, а также выявляют микроорганизмы (бактерии семейства энтеробакте-

рий, синегнойная палочка, золотистый стафилококк), которые не должны присутствовать в нестерильных лекарственных средствах. В 1 г или 1 мл лекарственного сырья для приема внутрь должно быть не более 1000 бактерий и 100 дрожжевых и плесневых грибов. В случаях местного применения (полость уха, носа, интравагинальное использование) количество микроорганизмов не должно превышать 100 (суммарно) микробных клеток на 1 г или 1 мл препарата. В таблетированных препаратах не должно быть патогенной микрофлоры, а общая обсемененность не должна превышать 10 тыс. микробных клеток на таблетку.

Глава 5. ВИРУСЫ

Вирусы существенно отличаются от других форм жизни своими размерами, строением генома и особенностями его воспроизведения.

Размеры вирусных частиц (вирионов) находятся в пределах 28-250 нм, их можно рассмотреть только с помощью электронного микроскопа. Вирион содержит только один тип нуклеиновых кислот — ДНК или РНК. Вирусы не способны строить свои структурные элементы (белки, нуклеиновые кислоты и др.) из компонентов питательной среды, они не способны расти на питательных средах, а для своего воспроизведения используют метаболические системы клетки хозяина (человека, животного, растения, бактерии), т. е. являются облигатными паразитами.

5.1 Структура вирусов

Вирусная частица (рис. 35) содержит генетический материал (ДНК или РНК), окруженный белковой оболочкой (капсидом) [24]. ДНК может образовывать кольцевые или линейные структуры. РНК представлена одно- или двухнитевыми молекулами, у некоторых вирусов может быть сегментированной. Преимущество сегментированного генома в том, что в дискретных фрагментах содержится информация, которую не способна обеспечить единая молекула. В зависимости от выполняемых функций однонитевые РНК подразделяют на две группы:

(1) РНК способна непосредственно транслировать генетическую информацию на рибосомы клетки-хозяина, т. е. выполнять функции иРНК, ее обозначают +РНК (плюс-нити РНК, позитивный геном).

(2) РНК вируса не способна функционировать как иРНК, а служит матрицей для образования +РНК, ее обозначают -РНК (минус-нити, негативный геном).

Ретровирусы содержат +РНК, на матрице которой фермент ревертаза (РНК-зависимая ДНК-полимераза) синтезирует ДНК-провирус, интегрирующий в клеточный геном.

Капсид защищает геном от внешних воздействий, например, от действия нуклеаз клетки хозяина. На его поверхности располагаются системы распознавания рецепторов клетки хозяина и адсорбции на ее поверхности. Обычно это гликопротеиды, молекулы которых в виде ворсинок окружают вирион. Вирусы бактерий — бактериофаги часто имеют особые

структуры, облегчающие их проникновение внутрь клетки. Некоторые вирусы в составе вириона имеют ферменты, участвующие в разрушении оболочки клетки хозяина (фаговый лизоцим) или в репликации его генома (например, вирус иммунодефицита человека содержит обратную транскриптазу). Капсид построен из идентичных белковых субчастиц — капсомеров. Субъединичная структура обеспечивает экономию генетического материала, а также самосборку вириона за счет нековалентных межмолекулярных взаимодействий подобно процессу кристаллизации. Кроме того, такая структура способствует освобождению генетического материала внутри клетки хозяина путем диссоциации нековалентно связанных субчастиц. Форма вириона определяется характером самосборки капсомеров и может быть кубической, спиральной или соединять несколько структурных компонентов (рис. 36). На поверхности белкового капсида многие вирусы млекопитающих имеют липопротеиновую оболочку, которая обычно образуется из мембраны клетки хозяина [12].

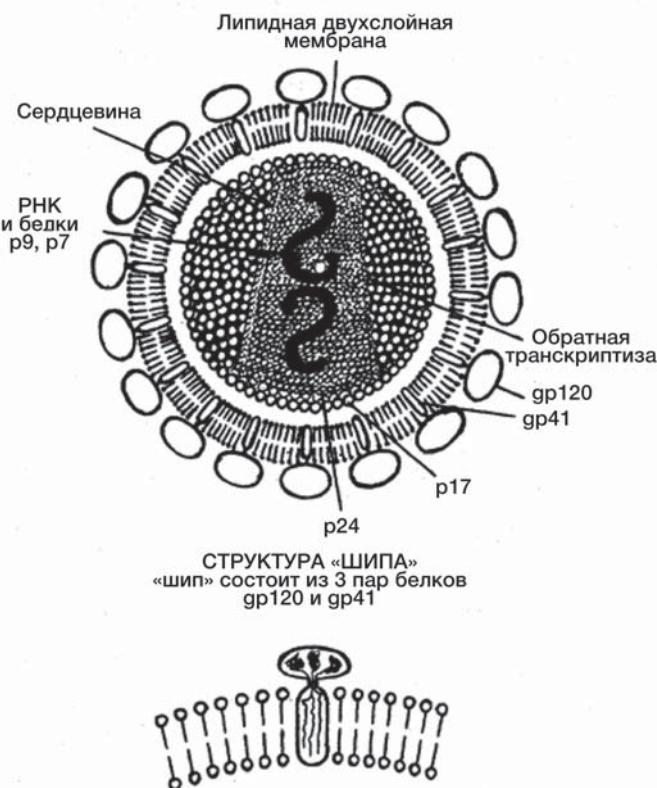


Рис. 35. Схема строения вириона ВИЧ.

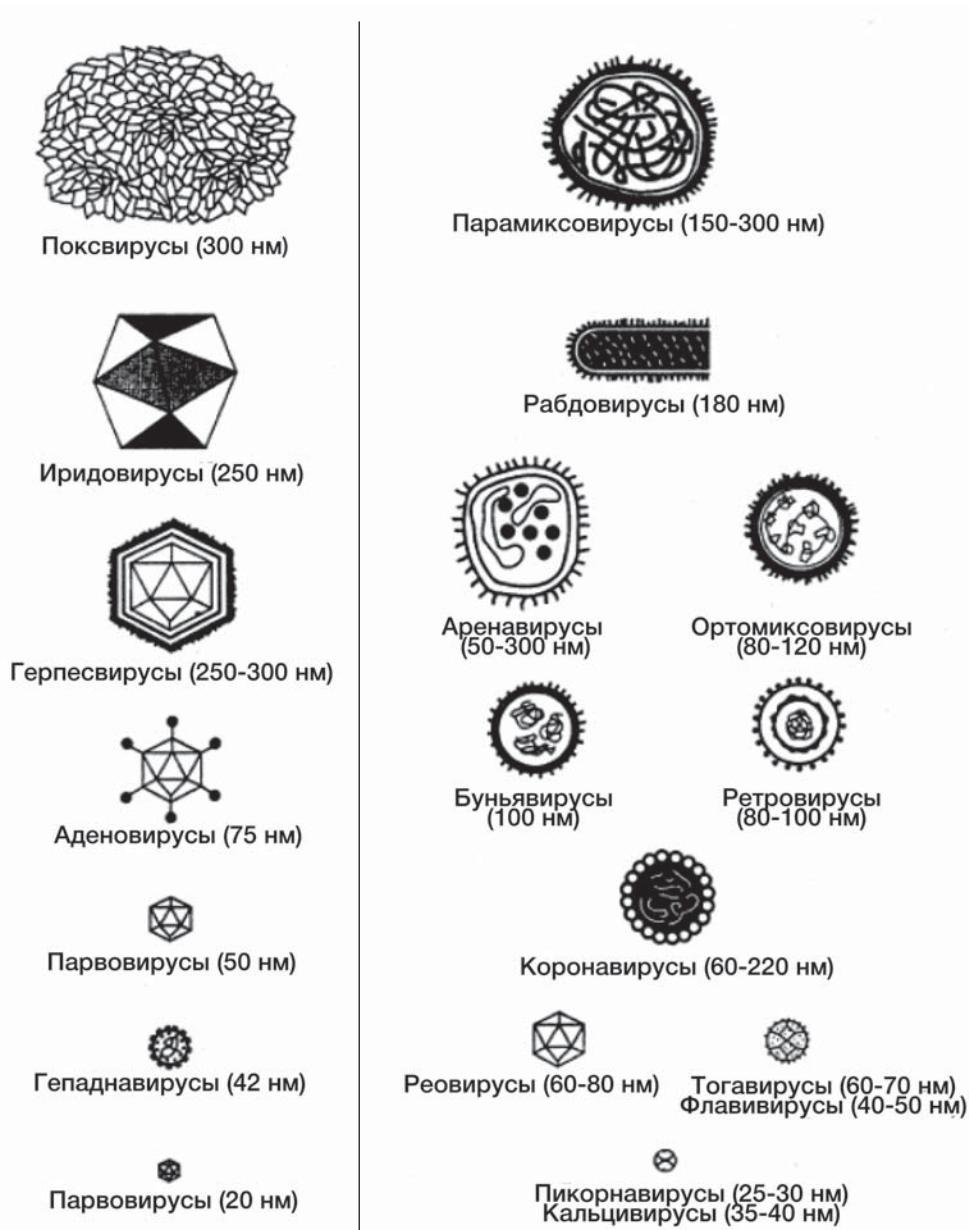


Рис. 36. Размеры и морфология основных возбудителей вирусных инфекций человека.

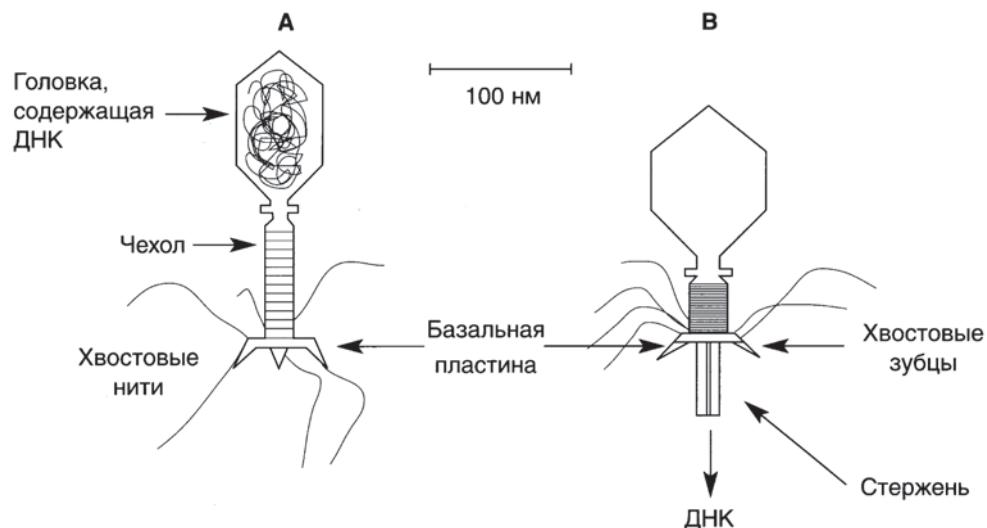


Рис. 37. Бактериофаг до (А) и после (В) сокращения чехла.

5.2 Взаимодействие вируса с клеткой хозяина

Вирус проникает в клетку хозяина и использует ее метаболические системы для своего воспроизведения и сохранения [4]. Этапы этих процессов различны у разных групп вирусов и окончательный результат может быть одним из следующих:

1. Размножение вируса и гибель клетки хозяина.
2. Размножение вируса и выход его из клетки без значительного повреждения последней.
3. Сохранение вируса в клетке в латентном состоянии, обычно в виде вирусной ДНК.
4. Внедрение вирусной ДНК в геном хозяина, в результате чего происходит мутация, например, возникновение раковых клеток.

Бактериофаги (фаги) — это вирусы бактерий (прокариот). Их генетический материал содержится в головке, имеющей белковую оболочку (рис. 37). Хвостовые нити и зубцы предназначены для распознавания рецепторов на поверхности бактериальной клетки и адсорбции на ней. Распознавание специфично не только для вида бактерии, но и для штамма, что служит основой для фаготипирования бактерий (см. ниже). У некоторых фагов хвост имеет чехол, покрывающий стержень. После адсорбции фага на клетке чехол сокращается, проталкивая стержень внутрь. Через стержень фаговая ДНК проникает внутрь клетки. Процесс облегчается благодаря местному повреждению клеточной стенки фаговым лизоцимом. Таким сложным органом инфицирования обладают лишь некоторые фаги грамотрицательных бактерий. На клеточной стенке грамположительных бактерий имеются рецепторные участки, которые способствуют проникновению в клетку крупных молекул и бактериофагов. Чувствительное место для атаки — это пили, к которым фаги могут прикрепляться. Некоторые фаги впрыскивают в клетку свою ДНК, другие проникают интактными. По типу взаимодействия с бактериальной клеткой фаги подразделяют на вирулентные и умеренные. *Вирулентные* фаги размножаются внутри клетки. Созревшие частицы фага изнутри разрушают клеточную стенку и выходят наружу, клетка при этом погибает. *Умеренные* фаги также способны лизировать бактерии, однако, в большинстве клеток популяции они существуют в клетке в виде профага — фаговой ДНК, которая подобно плазмидам может интегрировать с хромосомой.

Литический цикл жизни вирулентного ДНК-геномного фага начинается с проникновения его ДНК в клетку и синтеза ранней иРНК (ранними называются молекулы, образующиеся до репликации вирусной ДНК). На матрице вирусной иРНК синтезируются ранние белки. Последние выключают синтез белков клетки хозяина, разрушают бактериальную ДНК и начинают синтез компонентов вирусной ДНК. После

этого происходит репликация вирусной ДНК, синтез поздней иРНК и белков, необходимых для построения фаговых частиц (капсомеров головки и элементов хвоста) и лизоцима. Вновь синтезированные структурные единицы путем самосборки образуют зрелые фаговые частицы, покидающие клетку, оболочка которой разрушена лизоцимом. В одной микробной клетке может быть синтезировано до 100 фаговых частиц через 25 мин после инфекции.

Литическую активность вирулентного фага можно выявить в эксперименте, путем посева смеси суспензии фага и чувствительной к нему культуры на питательный агар в чашке Петри. На газоне бактериальной культуры появятся зоны лизиса в результате гибели части клеток под действием фага. Поскольку каждая зона лизиса (колония фага) инициирована одной фаговой частицей, метод позволяет определить их количество в исходной суспензии (метод титрования фага).

Лизогенные называют культуры, несущие умеренный фаг. Чтобы обнаружить явление лизогенеза, т. е. выход фага из клеток, требуется индикаторная культура, для которой данный фаг вирулентен. Лизогенную культуру смешивают с избыtkом бактерии-индикатора и высевают газоном на чашку. Наблюдают зоны лизиса индикаторной культуры под действием фага. В центре такой зоны находятся клетки лизогенной культуры. Основные стадии развития умеренных и вирулентных фагов представлены на рис. 38.

Интеграция фаговой ДНК с бактериальной хромосомой обеспечивает ее передачу дочерним клеткам. Лизогенные бактерии невосприимчивы к заражению теми фагами, которыми они лизогенизированы, а также близкородственными фагами. Эта невосприимчивость связана с образованием особого репрессора, препятствующего размножению фага. Этот же репрессор препятствует переходу профага в активное состояние и синтезу фаговых белков.

Спонтанно лизогенные бактерии лизируются редко (10^{-2} – 10^{-5} в одной генерации). Частота лизиса зависит от внешних условий, например, состава питательной среды. Мутагены (ультрафиолетовые лучи, H_2O_2 , митомицин С и др.) могут индуцировать массовое развитие зрелых фаговых частиц в клетках лизогенной культуры, связанное с нарушением механизма репрессии. Мутации также могут быть причиной перехода умеренного фага в вирулентное состояние. Такие мутанты оказываются устойчивыми к репрессору или утрачивают способность вызывать синтез репрессора в клетке.

Обычно лизогения — это весьма стабильное состояние, однако, некоторые клетки способны утрачивать фаг и вместе с этим резистентность к данному типу фага.

Лизогения — чрезвычайно распространенное явление: большая часть штаммов бактерий несет в себе ДНК одного или нескольких фагов, которая определяет

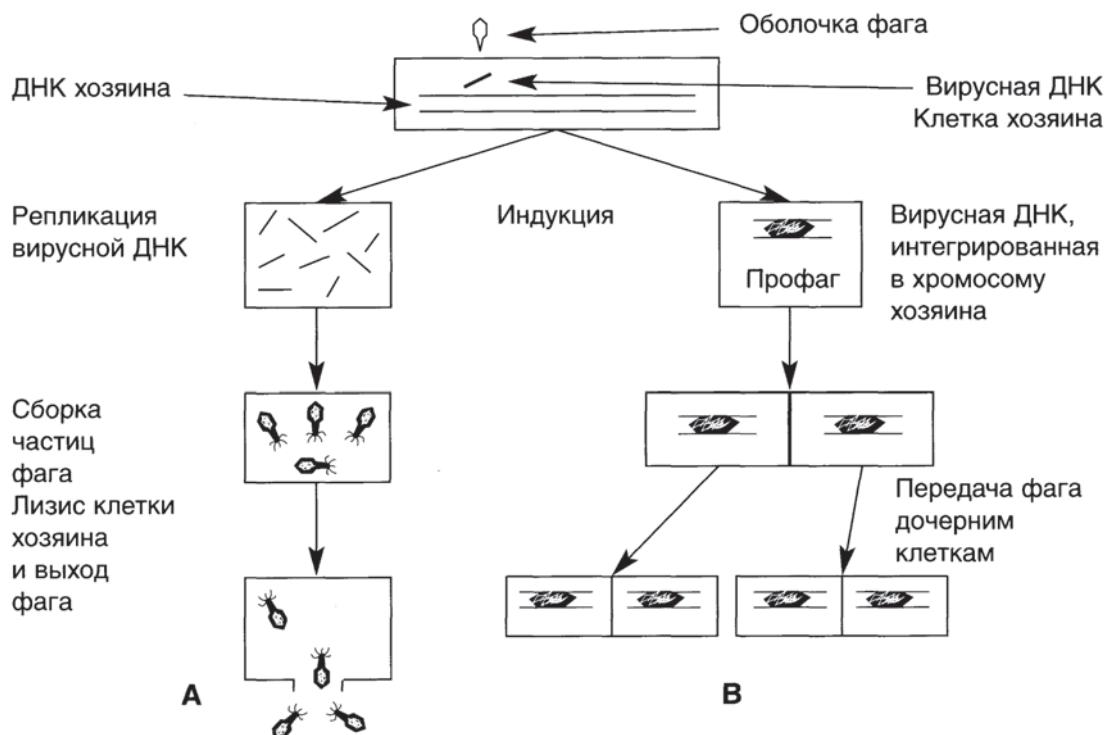


Рис. 38. Схема развития вирулентного (А) и умеренного (В) бактериофагов.

фенотипические показатели культуры (морфологические, культуральные, антигенные, токсигенные и др.). Это явление носит название фаговой конверсии.

Инфекционные фаги, продуцируемые лизогенной культурой, способны лизогенизировать другие штаммы данного вида бактерии (или близкородственных видов). При переходе из интегрированного с бактериальной хромосомой состояния в автономное геном фага может включить в свою структуру соседние гены нуклеоида клетки донора и перенести их в другую клетку (реципиент). Это явление носит название трансдукции. Путем трансдукции могут быть переданы многие важные признаки бактерий: резистентность к антибиотикам, вирулентность, токсигенность и др.

Практическое использование фагов. Фаги широко используются в генетической инженерии в качестве векторов — переносчиков генов в процессе создания рекомбинантных молекул ДНК. В медицине фаги назначают с профилактической и лечебной целью при дизентерии, брюшном тифе и других энтеральных заболеваниях, при гнойно-воспалительных процессах и дисбактериозе. Широко используют фаги в диагностике инфекционных заболеваний и идентификации микроорганизмов. Реакция нарастания титра специфичного фага указывает на присутствие соответствующего вида микроорганизма в объектах внешней среды (вода, пищевые продукты и т. п.). Метод фаготипирования позволяет установить биовар бактерии и тем самым выявить источник инфекции. Поскольку многие вещества, вызывающие индукцию профага и переход его в активное состояние, являются онкогенными, лизогенные культуры бактерий могут быть использованы для выявления потенциальных канцерогенов.

Размножение вирусов млекопитающих.

По сравнению с бактериофагом, литический цикл которого завершается в пределах 30 мин, вирусы млекопитающих размножаются медленно, в культуре ткани цикл репликации занимает от 4 до 24 час и включает стадии адсорбции, проникновения внутрь клетки и процесс образования зрелых вирусных частиц.

Адсорбция обусловлена двумя механизмами: неспецифическими (электростатическими и ван-дер-ваальсовыми силами) и специфическими, более прочными, представляющими собой взаимодействие рецепторов вируса с соответствующими рецепторами клетки по принципу биологического узнавания.

Проникновение вирусов млекопитающих внутрь клетки зависит от природы вируса. На поверхности вирионов многих групп вирусов, например, гриппа имеются особые шипы, содержащие нейраминидазу и гемагглютинин, которые участвуют в проникновении вириона в клетку. Вирусы оспы и герпеса поглощаются клеткой, как при фагоцитозе.

Депротеинизация (высвобождение вирусной НК) происходит с участием ферментов клетки хозяина.

Синтез вирусных НК и белков определяется природой вируса. У ДНК-геномных вирусов процесс начинается с синтеза ранней иРНК с участием РНК-полимеразы клетки хозяина или вириона. На матрице ранней РНК синтезируются ранние белки, необходимые для последующей репликации ДНК. Репликация также происходит под действием клеточных или вирусных ферментов. На матрице реплицирующейся ДНК происходит синтез поздних иРНК, которые направляют синтез белков вируса.

У РНК-геномных вирусов, содержащих +РНК, последняя транслируется на рибосомах клетки хозяина. Вирусная –РНК используется как матрица для построения с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы комплементарной копии +РНК, которая функционирует как информационная.

Необходимым этапом жизненного цикла ретровирусов является интеграция его генома в форме ДНК-провируса в хромосому хозяина. Синтез ДНК-провируса на матрице вирусной +РНК происходит с участием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). Интегрированная в одну из хромосом хозяина вирусная ДНК транскрибируется клеточной РНК-полимеразой. Ретровирусы часто являются онкогенными, поскольку включение их ДНК в геном клетки-хозяина вызывает ее перерождение. По этой же причине онкогенными могут быть и ДНК-геномные вирусы.

Самосборка вириона — это физико-химический процесс, в результате которого формируется капсид с встроенной в него НК. У вирусов, имеющих наружную оболочку, формирование вирионов происходит на клеточной мембране, компоненты которой входят в состав оболочки вириуса (рис. 39).

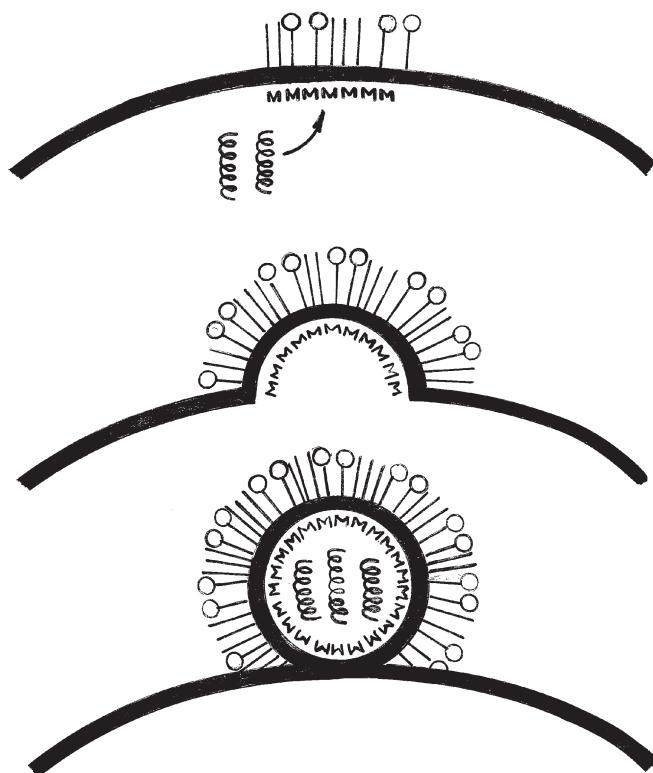


Рис. 39. Схема сборки и выхода дочерних популяций вируса гриппа из зараженных клеток [24].

Выход вирионов у одних вирусов сопровождается гибеллю клетки, у других — только частичным повреждением мембранны.

5.3 Культивирование вирусов

Культивирование вирусов в лабораторных условиях является необходимым этапом диагностики многих вирусных болезней, кроме того, оно необходимо для получения вакцинальных препаратов. Поскольку вирусы являются облигатными паразитами, они способны размножаться только в живых клетках, например, в культуре ткани (клетках тканей человека или животных, растущих на питательном субстрате, обычно в виде монослоя на плоской поверхности сосуда). Присутствие вирусов можно обнаружить по цитопатическому эффекту (ЦПЭ), т. е. разрушению монослоя клеток. Метод позволяет идентифицировать вирус, например, в клиническом материале, с помощью иммунной сыворотки. Специфическая сыворотка нейтрализует вирус, и ЦПЭ в ее присутствии не будет проявляться.

Вирусы выращивают также путем заражения лабораторных животных или эмбрионов птиц.

5.4 Действие химических и физических факторов на вирусы

Нагревание — наиболее эффективный способ уничтожения вирусов. Большинство вирусов, патогенных для человека, погибает при 60°C в течение 30 минут; однако вирус гепатита В выдерживает эту температуру в течение 4 часов. Вирусы выдерживают глубокое охлаждение и могут храниться при температуре от –40°C до –70°C. Высушивание губительно для некоторых вирусов, на других оно не действует. Ультрафиолетовое облучение инактивирует вирусы, повреждая их НК, что может быть использовано при изготовлении вирусных вакцин.

Вирусы, имеющие липидную оболочку, инактивируются органическими растворителями (хлороформом, эфиром); это явление используют при классификации вирусов. Многие химические дезинфицианты, используемые против бактерий (фенолы, спирты, ЧАС) малоэффективны против вирусов. Наиболее активны против вирусов: хлор, гипохлориты, йод, альдегиды и оксид этилена.

5.5 Принципы создания антивирусных препаратов

Для профилактики и лечения вирусных инфекций применяют иммунопрепараты и химиотерапевтические средства [25]. По спектру действия и клинической значимости препараты, применяемые для лечения вирусных заболеваний, подразделяют на следующие группы: *этиотропные, иммуномодулирующие, патогенетические* (направленные на борьбу с интоксикацией, обезвоживанием, поражениями органов, аллергическими реакциями, а также на профилактику

бактериальных осложнений) и *симптоматические* (купирующие соответствующую симптоматику, например, головную боль, кашель). Симптоматическую и патогенетическую терапию проводят практически в 100% случаев, тогда как этиотропные химиотерапевтические средства применяют ограниченно. Причиной этого являются трудности создания препаратов, избирательно подавляющих репродукцию возбудителя и не затрагивающих процессы жизнедеятельности организма хозяина. Большинство ингибиторов вирусспецифических процессов, тесно связанных с клеточным метаболизмом, оказываются токсичными.

Тем не менее, определены этапы жизненного цикла некоторых вирусов, подавление которых мало влияет на клетки хозяина. Прежде всего, это адсорбция и проникновение вируса в клетку, депротеинизация НК и некоторые процессы, связанные с синтезом НК, трансляцией и сборкой вириона.

Антивирусные химиотерапевтические вещества отличаются узким спектром активности (в пределах одного вида или семейства), число их ограниченно (табл. 15).

Спектр активности противовирусных препаратов, зарегистрированных в РФ

Таблица 15.

Препараторы	Показания к применению
Адапромин	Грипп А и В
Азидотимидин	Вич-инфекция, СПИД
Амантадин	Грипп А
Амбен	
Аминокапроновая кислота	Грипп А и В, респираторная вирусная инфекция
Арбидол	
Ацикловир	Герпес, опоясывающий лишай
Видарабин	
Ганцикловир	Герпес, цитомегалия
Дейтифорин	Грипп А, респираторная вирусная инфекция
Идоксиуридин	Герпес
Марборан	Оспа
Оксолин	Грипп, герпес, риновирусные инфекции
Пандовир	Герпес
Ремантадин	Грипп А
Рибавирин	Респираторная вирусная инфекция, гепатит С, лихорадка Ласса
Теброфен	
Трифторидин	Герпес, аденоизвирусные поражения глаз
Тромантадин	Герпес
Флюреналь	Герпетические и аденоизвирусные поражения глаз
Фоскарнет	Герпес, цитомегалия, гепатит В, ВИЧ-инфекция
Хельпин	Герпес, ветряная оспа
Цитарабин	Цитомегалия

Амантадин, ремантадин — трициклические симметричные адамантамины активны против вирусов гриппа А и коревой краснухи. Эти вещества взаимо-

действуют с белком М2 вириуса, что приводит к блокаде слияния оболочки клетки и вириуса и проникновения нуклеокапсида в цитоплазму. Кроме того, они блокируют первичную транскрипцию и активацию гемагглютинина. Препараты проявляют профилактическое действие при приеме до заражения и на ранних стадиях инфекции.

Видарабин (аденинарабинозид) — наименее токсичный и наиболее эффективный из аналогов пуринов, блокирует сборку ДНК, его интермедиат ингибитирует вирусную ДНК-полимеразу. Применяют при лечении герпетических инфекций.

Цитозинарабинозид — аналог видарабина более токсичный, с меньшей избирательностью действия. Применяют при химиотерапии опухолей.

Галогенированные производные дезоксиуридина — йодоксиуридин, трифторидин (трифтортимидин) фосфорилируются вирусной тимидинкиназой и встраиваются в ДНК вириуса, что приводит к образованию дефектных вирусных белков. Применяются местно при герпетических кератитах.

Аналоги нуклеозидов, избирательно активируемые вирусспецифической тимидинкиназой — ацикловир, фамцикловир, ганцикловир обладают избирательным действием на инфицированные вирусами клетки. Для активации необходимо их превращение в макроэргический трифосфат, который ингибитирует вирусную ДНК-полимеразу. Первый этап фосфорилирования индуцирует вирусспецифическая тимидинкиназа. Нативная форма препаратов неактивна, поэтому они не влияют на синтез ДНК в незараженных клетках. Применяют при герпетических инфекциях, назначают внутрь, внутривенно и в виде глазной мази.

Ингибиторы обратной транскриптазы активны против ретровирусов, включая ВИЧ.

Зидовудин (азидотимидин), зальцитабин (дидезоксицитидин), диденозин (дидезоксиинозин), ставудин (дидегидродезокситимидин) действуют как конкурентные ингибиторы фермента, кроме того, прекращают элонгацию при синтезе белка на рибосомах. Обладают значительной токсичностью.

Ингибиторы протеаз — негидролизующиеся синтетические пептиды сакцинавир, ратонавир, индинавир конкурентно взаимодействуют с протеазами ВИЧ, в результате чего в ВИЧ-инфицированных клетках накапливаются нерасщепленные предшественники gag-полипротеина, проявляющие цитотоксическое действие. Используют в сочетании с ингибиторами обратной транскриптазы у ВИЧ-инфицированных больных.

Нуклеозидные аналоги широкого спектра

Рибавирин — аналог гуанозина, действует на РНК- и ДНК-геномные вирусы. Разрешен для лечения тяжелых респираторных инфекций у детей и других заболеваний. Вызывает побочные эффекты, включая подавление иммунитета.

Фоскарнет (тринатриевая соль фосфорному-раввиной кислоты) ингибитирует активность обратной транскриптазы и всех ДНК-полимераз герпесвирусов и возбудителя гепатита В. Применяют для лечения герпетических инфекций.

N_1 -метилизатин- β -тиосемикарбазон (метизазон, марборан) угнетает синтез поздних иРНК и поздних полисом у поксвирусов. Применяется для лечения оспы.

5.6 Устойчивость вирусов к химиотерапевтическим препаратам

Вирусам, как и всем живым существам, присуща способность адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды, в том числе и к действию биоцидов (рис. 40). Адаптация происходит как в результате селекции устойчивых штаммов, сформировавшихся в ходе предшествующей эволюции, так и в результате селективного отбора вновь возникающих штаммов. Преодоление развития резистентности в условиях клиники возможно при комбинированном применении препаратов с различными механизмами действия и при использовании препаратов, воздействующих на ранние этапы репродукции вируса. В настоящее время наблюдаются случаи развития резистентности к следующим препаратам.



Рис. 40. Этапы продукции вирусов — мишени для основных противовирусных препаратов.

Ацикловир. Выделены устойчивые штаммы герпесвирусов, опасные для больных с иммунодефицитами. Резистентность обусловлена отсутствием тимидинкиназы или модификацией ее структуры, кроме того, мутацией генов, кодирующих ДНК-полимеразу, что делает ее устойчивой к действию ингибиторов.

Ганцикловир. Устойчивость связана с изменением структуры вирусной фосфотрансферазы и ДНК-полимеразы, приводящими к снижению уровня фосфорилирования препарата.

Зидовудин и невирапин. Устойчивость ВИЧ обусловлена мутацией генов, кодирующих обратную транскриптазу, что приводит к снижению аффинитета фермента к ингибитору.

К цитозинарабинозиду и рибавирину устойчивые штаммы не выявлены, что предположительно связано со способностью этих препаратов воздействовать на определенные этапы клеточного метаболизма, что объясняет причину широкого спектра их действия.

5.7 Интерфероны.

Интерфероны (ИФН, см. гл. 19) обладают универсально широким спектром антивирусной активности, поскольку действуют не на вирионы или их НК, а индуцируют антивирусное состояние клетки, стимулируя образование комплекса белков, блокирующих транскрипцию вирусной иРНК. ИФН не проникают в клетки, а взаимодействуют с мембранными рецепторами, индуцируя образование цАМФ, передающего сигнал на соответствующий оперон ДНК. Кроме того, ИФН активируют гены, кодирующие продукты с прямым антивирусным действием — протеинкиназы, нарушающие сборку белковой молекулы, и аденилатсигнатазы, продукт которых активирует эндонуклеазу, разрушающую вирусные иРНК. Гамма-ИФН активирует цитотоксические лимфоциты, естественные киллеры, моноциты, макрофаги, гранулоциты, способствующие уничтожению инфицированных клеток.

Медицинские препараты ИФН делятся на природные и рекомбинантные, их эффективность при различных заболеваниях указана в табл. 16.

Индукторы ИФН — это весьма разнородная по составу группа природных и синтетических соединений, способных вызывать в организме образование собственного (эндогенного) ИФН. Подобно ИФН они обладают универсально широким спектром противовирусной активности (табл. 17), а также иммуномодулирующим действием, которое определяет их эффективность при многих невирусных заболеваниях.

Типы ИФН	Препараты	Эффективны при заболеваниях
Природные:		
α-ИФН (альфа-фероны)	Лейкоцитарный ИФН человека, эгиферон, виллферон, лейкинферон	Гепатиты В, С и Д, папилломавирусные заболевания, ВИЧ-инфекция, СПИД
β-ИФН (бета-фероны)	Фибробластный ИФН человека, ферон	Гепатит С, герпес, папилломавирусные заболевания, ВИЧ-инфекция, СПИД, рассеянный склероз
γ-ИФН (гаммафероны)	Иммунный ИФН человека (γ-ИФН)	Гепатит В, папилломавирусные заболевания
Рекомбинантные:		
α2 А	Реаферон, роферон, виферон, реальферон	Гепатиты В, С и Д, герпес, опоясывающий лишай, папилломавирусные заболевания, ВИЧ-инфекция, СПИД
α2 В	Инtron, инрек	Гепатиты С и Д, герпес, папилломавирусные заболевания, ВИЧ-инфекция, СПИД
α2 С	Берофор	Гепатит В, опоясывающий лишай, папилломавирусные заболевания
β	Рекомбинантные β-ИФН (бетафероны)	Рассеянный склероз

Спектр противовирусной активности индукторов ИФН

Таблица 17.

Препарат	Показания к применению
Акриданоны (циклоферон, неовир)	Грипп, энцефалиты, бешенство, ВИЧ-инфекция, СПИД
Флюореноны (амиксин)	Грипп, ОРВИ, герпес, гепатит А, энцефалиты, бешенство, рассеянный склероз
Поли (И): поли (У) — амплиген	ВИЧ-инфекция, СПИД
Поли (Г): поли (Ц) — полигуцил	Грипп, гепатит В, энцефалиты, бешенство
Двухспиральные РНК (ларифан, ридостин)	Грипп, ОРВИ, герпес, энцефалиты, бешенство
Поли (А): поли (У) — полудан	Герпетические поражения глаз
Полифенолы (мегасин, кагоцел, саврац, рагосин, гозалидон)	Грипп, ОРВИ, герпес, энцефалиты, бешенство, гепатиты, энтеровирусные инфекции

5.8 Возбудители вирусных болезней человека

5.8.1 ДНК-содержащие вирусы

Герпесвирусы — икосаэдральный капсид, двухслойная внешняя оболочка, гликопротеиновые шипы, двухнитевая линейная ДНК. Вызывают острые и латентные инфекции (рецидивирующий герпес, ветряная оспа, опоясывающий лишай, инфекционный мононуклеоз, кератит, энцефалит и др.); обладают онкогенным потенциалом.

Паповавирусы — голый икосаэдральный капсид, двухнитевая циклическая ДНК. Вызывают папилломы и полиомы (бородавки, кондиломы, локальные гиперплазии эпителия, карцинома гортани и шейки матки).

Аденовирусы — голый икосаэдральный капсид, двухнитевая линейная ДНК. Вызывают фарингоконъюнктивиты, эпидемический кератоконъюнктивит, гастроэнтериты.

Поксвирусы — вирион кирпичнообразной формы, двухнитевая ДНК. Вызывают натуральную оспу, оспу коров, оспу обезьян и др.

Парвовирусы — голый икосаэдральный капсид, однонитевая ДНК. Вызывают апластический криз у детей.

Гепаднавирусы — икосаэдральный капсид с оболочкой, неполная (с разрывом одной цепи) кольцевая

двойнитевая ДНК, в состав вириона входят праймерный белок и ДНК-полимераза. Для репликации необходим синтез вирус-индуцированной обратной транскриптазы, т. к. вирусная ДНК образуется на матрице РНК; в динамике процесса вирусная ДНК интегрирует в хромосому. Вызывают гепатит В.

5.8.2 РНК-содержащие вирусы

Ортомиксовирусы — сферический вирион содержит одннитевую сегментированную РНК. Вызывают грипп. У вирусов гриппа А и В геном содержит 13588 нуклеотидов и состоит из 8 сегментов, каждый из которых кодирует свой протеин. Основной белок вириона — М-протеин, локализуется на внутренней поверхности двухслойной липидной оболочки, с которой ассоциированы поверхностные гликопротеины — гемагглютинин и нейраминидаза, образующие шипы. Эти гликопротеины обладают антигенной специфичностью, которая способна варьировать часто в динамике одной эпидемической вспышки, что затрудняет вакцинопрофилактику гриппа.

Парамиксовирусы — сферический вирион, лигопротеиновая оболочка содержит М-протеин, формирующий его внутренний слой, и поверхностные гемагглютинин, нейраминидазу и гликопротеид F, проявляющий гемолитическую цитотоксическую активность и ответственный за слияние с клеткой; геном

представлен линейной несегментированной молекулой РНК, связанный с мажорным белком. Вирион содержит РНК-зависимую РНК-полимеразу. Вызывают парагрипп, корь, эпидемический паротит и подострый склерозирующий панэнцефалит.

Пикорнавирусы — голые икосаэдрические вирионы, несегментированная молекула +РНК. Вызывают бессимптомные инфекции, менингиты, паралич (полиомиелит), миоперикардит, острые респираторные инфекции.

Раддовирусы — вирион пулевидной формы со спиральной симметрией, двухслойная липидная оболочка, включающая внешние гликопротеиновые структуры; нуклеокапсид содержит однонитевую РНК, протеины сердцевины и транскриптазу. Вызывают бешенство, везикулярный стоматит и др.

Тогавирусы — икосаэдральный капсид, липидная оболочка с гликопротеиновыми шипами, содержащими гемагглютинин, однонитевая молекула +РНК. Вызывают энцефалиты, желтую лихорадку, лихорадку Денге, карельскую лихорадку, гепатит С, краснуху.

Буньявирусы — сферический вирион с тремя нуклеокапсидами, каждый из которых содержит три отдельных линейных сегмента –РНК и РНК-зависимую РНК-полимеразу. Оболочка липопротеиновая с гликопротеиновыми шипами, содержащими гемагглютинин. Вызывают лихорадки и энцефалиты.

Аденовирусы — округлые или полиморфные вирионы, однонитевая сегментированная молекула –РНК; вирионы содержат несколько типов как вирусных, так и заимствованных у хозяина рибонуклеопротеинов, выполняющих роль рибосом. Вызывают тяжелые геморрагические лихорадки, гриппоподобные заболевания, менингиты.

Филовирусы — палочковидные ветвящиеся вирионы, спиральный нуклеокапсид, –РНК. Вызывают тяжелые геморрагические лихорадки.

Коронавирусы — округлые или овальные вирионы, гликолипопротеиновая оболочка с характерными выростами (короной), нуклеокапсид спиральный, несегментированная +РНК. Вызывают острые гастроэнтериты и респираторные инфекции.

Калицивирусы — голый икосаэдральный капсид, несегментированная +РНК. Вызывают гастроэнтериты и гепатит Е.

Реовирусы — голый вирион, капсид квазисферический с икосаэдральной симметрией, геном фрагментарный, образован двухнитевой РНК, состоящей из 10-11 сегментов. Ортореовирусы вызывают лихорадки (колорадская, кемеровская и др.); ротавирусы — острые энтериты у детей.

Петровирусы — сферический вирион, одетый липидной оболочкой, с гликопротеиновыми шипами, геном образован +РНК, состоящей из двух идентичных субъединиц. Характерная особенность — наличие в вирионе РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Вызывают

злокачественные заболевания; HTLV-1—T-клеточные лимфомы и миелопатии; ВИЧ-1 и ВИЧ-2 — синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).

5.8.3 Неклассифицированные вирусы

Вирус гепатита D — дефектный (неспособный к самостоятельному размножению, нуждающийся в вирусах-помощниках), выделяемый только от пациентов, инфицированных вирусом гепатита В (ВГВ), его геном — однонитевая РНК не имеет гомологии с ДНК ВГВ, но оболочка включает антигены ВГВ.

Астровирусы — сферические вирионы, геном — однонитевая РНК. Вызывают диарейные инфекции у детей.

5.9 Вирусы — возбудители болезней растений

Вирусы — мельчайшие (субмикроскопические) возбудители болезней растений, животных и человека, не имеющие клеточного строения и способные размножаться только в живых клетках растения хозяина [20]. Зарегистрировано примерно 600 фитопатогенных вирусов; точное число указать трудно, так как некоторые вирусы представлены многими штаммами, иногда описываемыми как самостоятельные виды.

Все фитопатогенные вирусы объединены в 20 групп.

В настоящее время полагают, что вирусы — это самые простейшие формы жизни, не имеющие клеточную структуру и активизирующиеся при попадании в клетки восприимчивых организмов. Вирусы растений характеризуются следующими особенностями:

1. Размножаются только в организме хозяина или переносчика; на искусственных питательных средах не растут. Имеют своеобразный механизм размножения.

2. Клеточного строения не имеют: состоят из РНК — рибонуклеиновой кислоты (одно или двухцепочечной) или ДНК — дезоксирибонуклеиновой кислоты, окруженной обычно (но не всегда) белковой оболочкой.

3. Геном вирусов представлен только нуклеиновой кислотой, репродуцирующейся за счет ферментативной системы хозяина.

4. Нуклеиновая кислота ответственна за инфекционность, а белок осуществляет в основном защиту РНК.

Вирусы имеют палочковидную (ВТМ), нитевидную (Х-вирус картофеля, тристеза цитрусовых), сферическую (некроз табака) и бацилловидную (штриховатая мозаика пшеницы) формы. Размер вирусов составляет от 25 нанометров (нм) у вируса некроза табака, и до 2500 нм у тристезы цитрусовых 1-нм (нанометр) равен $10^{-9} = 0,001$ мкм). По характеру воздействия на пораженный организм вирусы делят на две

большие группы — вирусы мозаичного типа (мозаика) и вирусы желтушного типа (желтуха).

В результате заражения мозаичными вирусами изменяется окраска листьев, наблюдается чередование светло- и темно-зеленых, желтых, зеленых участков листьев, появление некротических пятен, штрихов, колец и др.

Источниками инфекции мозаичных вирусов могут быть сухие растительные остатки, семена, клубни, сорняки, почва и др.

Вредоносность вирусных заболеваний проявляется, главным образом, в снижении урожайности растений и ухудшении качества продукции. Особый вред вирусы наносят при выращивании семенного и посадочного материала. Поражение вирусами отрицательно влияет на пищевую и кормовую ценность продукции, пригодность её к промышленной переработке. Вирусы вызывают у растений стерильность и несовместимость, что отрицательно оказывается на работе селекционеров. У цветочных культур теряется декоративность, что наносит значительный экономический ущерб. Под действием вирусов теряются сортовая чистота, холодостойкость, зимостойкость, снижается всхожесть семян. В среднем размер убытков от развития вирусных болезней составляет примерно 20% общего экономического ущерба, обусловленного деятельностью всех групп возбудителей болезней и вредителей сельскохозяйственных культур.

5.9.1 Строение и размножение вирусов.

К вирусам неприменимы традиционные микробиологические методы исследования, поэтому долгое время об их строении, способах размножения, сохранения ничего не было известно. Только в 1935 г. американский вирусолог У. Стенли выделил из зараженных вирусом табачной мозаики (ВТМ) листьев табака белковый компонент, получив чистый кристаллический белок вируса. В 1937 г. англичане Ф. Боуден и Н. Пирри установили, что кроме белка в состав вируса входит нуклеиновая кислота. Вирус табачной мозаики состоит из белка (95%) и нуклеиновой кислоты (5%).

Говоря о размере и строении вирусов, имеют в виду вирионы, или вирусные частицы. Размеры вирионов в большинстве случаев составляют 100...200 нм.

Форма вириона определяется способом ориентирования в пространстве нуклеиновой кислоты и строения белковой оболочки. Белок играет защитную роль, а также обеспечивает проникновение вируса в ткани растения-хозяина. Нуклеиновая кислота является носителем инфекционности и наследственных признаков.

Большинство вирусов растений содержит однцепочечную линейную РНК, реже встречаются вирусы с двухцепочечными молекулами РНК, закручен-

ными в спираль. Лишь немногие вирусы растений (вирус мозаики цветной капусты) имеют в своем составе ДНК.

Механизм размножения вирусов отличается от способов размножения других микроорганизмов. Фитопатогенные вирусы попадают в растительную клетку, например, при проколе ткани ротовыми органами насекомых-переносчиков или через мелкие ранки (без грубых повреждений клеток) при механической передаче. В клетках зараженного растения вирус репродуцируется путем синтеза отдельных молекул нуклеиновых кислот и белка и последующей сборки из них вирионов. Попав в клетку растений, нуклеиновая кислота вируса освобождается от белковой оболочки и, становясь матрицей, начинает управлять синтезом ферментов клетки растения в направлении, необходимом вирусу. Происходит её накопление за счет репликации цепочек нуклеиновых кислот из имеющихся в клетке, а затем синтезируемых клеткой нуклеотидов. Вирусный белок синтезируется на рибосомах клетки-хозяина. Впоследствии происходит объединение нуклеиновой кислоты и структурного белка с образованием вирионов.

Нередко вирионы агрегируют друг с другом, обраzuя вирусные включения — кристаллы различной формы (кристаллы Ивановского), или, если вирионы соединяются с уплотнениями цитоплазмы, образуются включения в виде аморфных тел.

При вирусной инфекции имеет место облигатный тип паразитизма, причем его абсолютная форма. Патоген внедряется в генетический аппарат растений, изменяя его в сторону, необходимую для синтеза собственной ферментативной энергетической системы и впоследствии — соответствующих вирусных структур.

5.9.2 Симптомы вирусных болезней растений

По характеру проявления симптомы вирусных болезней можно разделить на 5 основных типов: 1. Угнетение роста; 2. Изменение окраски листьев, которые приобретают мозаичную расцветку; 3. Деформация органов; 4. Локальные некрозы; 5. Нарушение репродуктивных функций растений.

При одном и том же вирусном заболевании на растении обычно проявляется несколько типов симптомов. Симптомы вирусных заболеваний могут изменяться по мере развития патологического процесса.

5.9.3 Способы распространения фитопатогенных вирусов

Вирусы, вызывающие болезни растений, могут распространяться различными путями. Многие

вирусы распространяются переносчиками (векторами), которые питаются или паразитируют на растении. Это главным образом насекомые, клещи, нематоды, грибы и паразитические цветковые растения (повилика). Лишь сравнительно небольшое количество фитопатогенных вирусов передается насекомыми с грызущим ротовым аппаратом — такая передача малоспецифична и имеет значение только для вирусов, способных сохраняться в соке большого растения.

В зависимости от особенностей передачи насекомыми вирусы делят на персистентные и неперсистентные. Персистентные вирусы сохраняются свою инфекционность в организме переносчика в течение нескольких дней, а иногда в течение всей жизни вектора. Неперсистентные вирусы могут быть переданы переносчиками в течение ограниченного промежутка времени, часто не более часа.

Вирусы могут передаваться контактно-механическим путем, т. е. при взаимоповреждающем контакте частей здорового и больного растения. Это происходит при соприкосновении надземных или подземных частей растений. Часть вирусов (около 20%) способна передаваться через семена. Некоторые вирусы плодовых и ягодных культур могут передаваться через пыльцу. У вегетативно размножаемых культур (картофель, земляника, тюльпан и др.) вирусы распространяются в основном с посадочным материалом. При различного рода прививках (трансплантации) происходит распространение вирусных болезней. Этим методом передаются все известные фитопатогенные вирусы. Единичные вирусы (вирус мозаики табака, вирус некроза табака) могут передаваться с растительными остатками, с почвой, с гидропонными растворами. Небольшое значение (для вирусов кормовых бобовых трав) имеет место распространения вирусов через стебли повилики.

5.9.4 Защита растений от вирусных болезней

1. Карантин растений — это система государственных мероприятий, направленных на предотвращение заноса с территории других стран карантинных возбудителей болезней растений (внешний карантин), а в случае проникновения — на локализацию их очагов (внутренний карантин).

2. Использование и получение оздоровленного от вирусов семенного и посадочного материала.

3. Селекционный метод — при этом стремятся вывести новые сорта, устойчивые не только к вирусу, но и к его переносчику.

4. Организационно-хозяйственные мероприятия — дезинфекция орудий труда в растворе формалина, перманганата калия, спирта, тепловая обработка. Регулярное визуальное обследование растений.

5.9.5 Вироиды — возбудители болезней растений

Вироиды как новый класс патогенов был открыт Т. Динером в 70-х годах XX в. К этой группе фитопатогенов относят вирусоподобные инфекционные агенты, которые не образуют характерных для вирусов нуклеопротеидных частиц. Они представляют собой только низкомолекулярную одноцепочечную РНК, являющуюся носителем инфекционности и использующую для своей репликации биосинтетическую систему клетки растения-хозяина. Они характеризуются тем, что имеют только ковалентно замкнутую кольцевую РНК, имеющую крайне низкую молекулярную массу ($2,5 \times 10^4$ — 15×10^4). Белковая оболочка отсутствует.

Наиболее характерные симптомы вироидозов: угнетение роста, уменьшение размеров растения и отдельных его органов (листьев, цветков, плодов), ослабление интенсивности окраски, хлороз листьев.

Вироиды распространяются с посадочным материалом, с семенами, передаются от растения к растению механическим путем. Так, вироид экзокортиса цитрусовых быстро распространяется при прививках. Вироиды характеризуются высокой инфекционностью, термостабильностью, стойкостью к воздействию различных химических соединений.

Основные симптомы вироидных болезней: угнетение роста растений или его отдельных органов, изменение окраски (хлороз, антоцианоз), деформация различных органов. Вироиды отличаются высокой инфекционностью, стойкостью к химическим и термическим воздействиям. Они распространяются с посадочным материалом, семенами, контактно-механическим путем. К основным методам диагностики вироидов относят визуальную диагностику, метод растений-индикаторов, электронную микроскопию, метод гель-электрофореза, метод ДНК-зондов. Защита растений от вироидных болезней сходна с защитой их от вирусных патогенов.

Именно благодаря высокой обойдной организации грибов и растений их взаимодействия носят широкий характер. По разным оценкам, известно от 120 тыс. до 250 тыс. видов грибов, и среди них свыше 8 000 видов фитопатогенных, тогда как среди бактерий известно только около 200 фитопатогенных видов.

Агробактерии способствуют развитию различных опухолей у растений. Образование опухолей вызывается онкогенной плазмидой, передающейся агробактериями в растительные клетки. Эти бактерии вызывают у растений образование корончатых галлов опухолей. После развития опухоли агробактерии в тканях обычно отсутствуют. Передача возбудителей бактериозов происходит через зараженные семена, остатки больных растений, почву, воду, воздух, путем переноса насекомыми, моллюсками, нематодами. Бактерии проникают в растения через устьица, не-

ктарники и другие части растений, а также даже через небольшие повреждения.

5.10 Прионы

Прионы как инфекционные агенты

Прионы — это гликопротеины, которые способны индуцировать в нормальном клеточном белке конформационный переход в конформер с инфекционной активностью (рис. 41) [26]. Источником нормального белка является сама клетка, в которой постоянная экспрессия гена PRNP создает пул белка PrP^c — нормального компонента клеточных мембран. Контакт с инфекционным прионом PrP^{sc} (sc — скрепи) вызывает переход нормального белка в конформационное состояние PrP^{sc}. Этот переход осуществляется в период посттрансляционного процессинга предобразованного нормального клеточного белка.

Нормальный белок PrP^c локализуется в цитоплазматической мембране и участвует в функционировании сигнальных систем клеток, в частности нейронов, и предположительно в биогенезе и развитии нервной системы. Его конформационная модификация вызывает нарушение этих процессов. Кроме того, конформеры индуцируют апоптоз инфицированных клеток и генерируют нейротоксические полипептиды, предположительно образующие поры в нейронах и связывающие нуклеиновые кислоты, а также блокируют репликацию митохондрий, вызывая их дегенерацию. Последнее лежит в основе многих неврологических заболеваний.

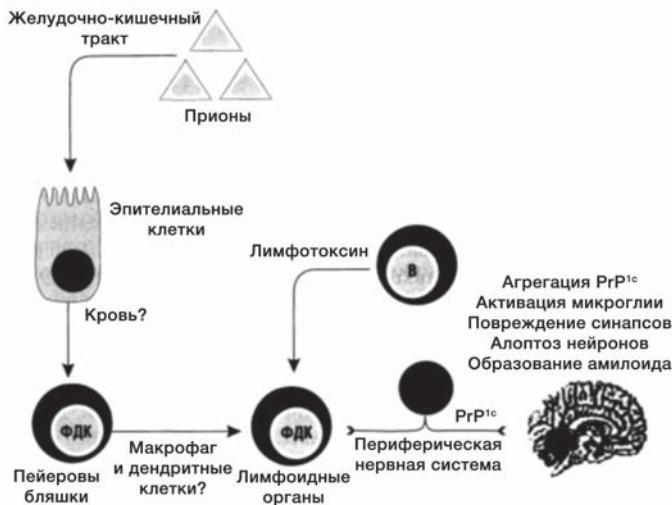


Рис. 41. Схема заражения прионами, диссеминация прионов в организме и стадии инфекционного процесса в центральной нервной системе (В — В-лимфоциты; ФДК — фолликулярные дендритные клетки [7].

Заболевания, вызываемые прионами, характеризуются поражением центральной нервной системы: болезнь Крейцфельда-Якоба, синдром Гертсманна-

Шtreуессера-Шейннера, семейная смертельная бессонница, куру, скрепи овец и коз, трансмиссивная губчатая энцефалопатия коров и др. Источником инфекции являются ткани больного организма. Заражение человека возможно алиментарным путем, а также при использовании лекарственных препаратов, полученных из тканей больных животных, или недостаточно обезвреженных медицинских инструментов. У коров и овец инфекционные агенты передаются через корма, содержащие ткани погибших животных.

Для заболеваний, вызванных прионами, характерен очень длительный инкубационный период. Развитие инфекции тесно связано с функциями генома и жизнедеятельностью клеток, обеспечивающих накопление белка PrP^{sc} и постепенное прогрессирующее развитие симптомов, которое может затягиваться на месяцы и годы.

Для прионных заболеваний характерно практически полное отсутствие иммунного ответа в связи с высокой консервативностью первичной структуры белка; эти инфекции не реагируют на иммуномодулирующую терапию, хотя делаются попытки получить иммунопрепараты, воздействующие на отдельные этапы формирования конформированных белков.

Прионы в фармацевтической практике

Прионы представляют собой индивидуальные белки с молекулярной массой от 20 до 30 кДа при длине полипептидной цепи около 254 аминокислотных остатков. Они фильтруются через фильтры с диаметром пор 25-50 нм.

Прионы стабильны при температуре 90°C в течение 30 мин., инактивируются только при автоклавировании при 135°C в течение 30 мин. Однако описаны случаи инфицирования при применении автоклавированного медицинского инструмента (стоматологического, отоларингологического, нейрохирургического). Прионы резистентны к воздействию химических агентов (глутаровый альдегид, формальдегид, β -пропиолактон, этанол, толуол, ксиол), нуклеазам, УФ и ионизирующей радиации. Менее резистентны к ацетону, натрия гидроксиду, ионным детергентам типа натрия додецилсульфата, фенолу, хлороформу, сильным окислителям, этиленоксиду, протеазам.

Прионы имеют ограниченный спектр хозяев, но способны адаптироваться к новому хозяину, т. е. преодолевать межвидовые барьеры.

Опасность распространения прионных заболеваний представляет серьезную проблему для фармацевтической деятельности, включая контроль поставщиков животного сырья (недопущение получения сырья из регионов, где наблюдались случаи трансмиссивной губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота) и выбор способа стерилизации. Для термостабильного медицинского оборудования, загрязненного материалом, содержащим прионы, ВОЗ рекомендует погружение в раствор натрия гидроксида (1 н) или натрия

гипохлорита (20000 ppm активного хлора) на 1 час с последующим автоклавированием, очисткой и обычной стерилизацией.

Методы контроля полноты инактивации прионов трудоемки, длительны и дорогостоящи, они предусматривают заражение животных инфицированной тканью, подвергнутой воздействию биоцида, и математический расчет концентрации биоцида и времени, необходимых для инактивации приона. Поэтому на практике необходимо строго соблюдать регламентированный режим обработки, гарантирующий качество стерилизации.

Заключение

Вирусы отличаются от других форм жизни по следующим признакам:

- размеры от 28 до 250 нм;
- наличие одного типа НК — ДНК или РНК;
- облигатный паразитизм.

Вирусы паразитируют на клетках бактерий (бактериофаги), растений, животных и человека, вызывая различные заболевания. Ретровирусы содержат +РНК, на матрице которой фермент обратная транскриптаза

синтезирует ДНК-провирус, интегрирующий в геном клетки и вызывающий ее перерождение.

Внешняя оболочка вируса — капсид состоит из белковых субъединиц — капсомеров.

Вирулентные бактериофаги вызывают лизис клеток, умеренные фаги существуют в клетке в виде профага — фаговой НК, которая входит в состав генома бактериальной клетки.

Вирусы выращивают в культуре ткани или путем заражения животных или эмбрионов птиц.

Создание противовирусных препаратов направлено на подавление этапов жизненного цикла вирусов, не затрагивающих клетки хозяина: адсорбция, проникновение вирусов в клетку, функционирование вирусной НК.

Интерфероны — это белки, которые обладают универсально широким спектром противовирусной активности.

Прионы — инфекционные гликопротеины, вызывают поражение ЦНС, передаются алиментарным путем или через инфицированные материалы и инструменты. Прионы исключительно устойчивы к стерилизующим агентам.

Глава 6. ПРОСТЕЙШИЕ

Простейшие (*Protozoa*) — это одноклеточные эукариотические организмы, которые имеют значительно более сложную функциональную организацию по сравнению с бактериями и грибами. Их размеры составляют от 3 до 200 мкм. Наиболее крупные раковинные корненожки достигают 2-3 см в диаметре.

Снаружи тело простейших покрывает эластичная мембрана — пелликула. У некоторых видов клеточная мембрана может включать опорные фибрillы, и даже минеральный скелет. Органоиды идентичны органоидам клеток других эукариот. Специфическими органоидами движения являются псевдоподии, жгутики и реснички.

Всего насчитывают до 25000 видов простейших. Из них патогенными для растений, животных и человека являются около 7000 видов. Виды, патогенные для человека, входят в состав 3 типов — *Sarcostigophora*, *Apicomplexa* и *Ciliophora* (рис. 42). Пути проникновения патогенных простейших в организм человека аналогичен таковым для других патогенных микроорганизмов.

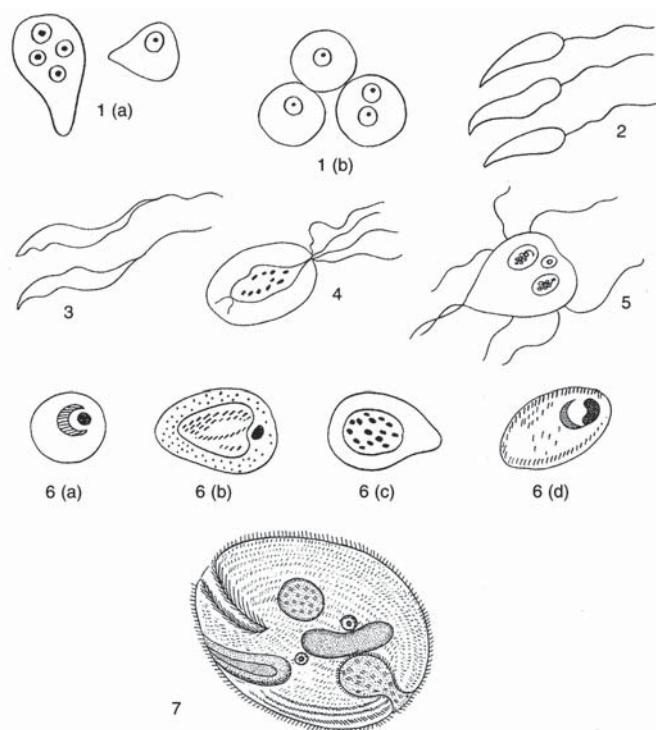


Рис. 42. *Protozoa*: 1 — *Entamoeba histolytica*, вегетативные формы (а) и цисты (б); 2 — *Leishmania donovani*; 3 — *Trypanosoma gambiense*; 4 — *Trichomonas vaginalis*; 5 — *Lamblia intestinalis*; 6 — *Plasmodium vivax* в эритроците, стадии развития: а) юная форма плазмодия, б) взрослый шизонт, в) форма деления, г) гаметоциты; 7. *Balantidium coli*.

6.1 Споровики

Споровики принадлежат к типу *Apicomplexa*, классу *Sporozoa*, который составляют только паразитические виды. Для них характерны как исключительно половой путь развития, так и чередование полового и бесполого циклов, обычно связанное с переменой хозяев. Своим названием споровики обязаны способности образовывать особые структуры, защищенные плотной оболочкой, условно называемые спорами. Наибольший ущерб здоровью человека наносят малярийные плазмодии и токсоплазмы, поражающие до 35% населения Земли.

Под *Plasmodium* включает более 100 видов, паразитирующих в организмах рептилий, птиц и животных. Четыре вида патогенны для человека и вызывают малярию: *Plasmodium vivax* — возбудитель трехдневной малярии, *P. malariae* — возбудитель четырехдневной малярии, *P. falciparum* — тропической малярии, *P. ovale* — малярии овале (типа трехдневной).

Жизненные циклы различных видов плазмодиев практически одинаковы, включают бесполую стадию (шизогония), проходящую в организме человека, и половую стадию (спорогония) в организме переносчика — самок комаров рода *Anopheles*.

Спорогония происходит в клетках эпителия кишечника комара и продолжается 1-3 нед. Процесс начинается с проникновения мужских и женских гамет (гамонтов) в организм комара с кровью больного. Гамонты сливаются попарно в зиготы, проникающие в стенку кишки и образующие там ооцисты. Содержимое ооцист многократно делится с образованием спорозоитов (веретенообразные клетки длиной 11-15 мкм), диссеминирующие по всему организму насекомого. Часть из них проникает в слюнные железы комара, делая его переносчиком болезни.

Гепатоцитарная шизогония плазмодия происходит в гепатоцитах человека и продолжается 1-2 недели. Спорозоиты проникают в клетки печени с кровотоком через час после крососания. Там они делятся, образуя мерозоиты (каждый спорозоит может образовать от 2000 до 40000 мерозоитов), разрушающие гепатоциты и проникающие в кровоток.

Эритроцитарная шизогония происходит после проникновения мерозоитов в эритроциты, где они превращаются в трофозоиты (растущие формы) размером 2 мкм; микроскопия пораженных эритроцитов выявляет покоящиеся формы, содержащие ядро с од-

ним хроматиновым зерном, и формы с псевдовакуолью, внешне напоминающие кольцо или перстень. Трофозоиты позднее увеличиваются и образуют многоядерные шизонты (делящиеся формы). Шизонты образуют новое поколение мерозоитов, инфицирующих другие эритроциты. Каждый шизонт может образовать от 6 до 24 дочерних мерозоитов. Выход мерозоитов из эритроцитов сопровождается их разрушением. Лихорадка наблюдается в момент выхода мерозоитов из разрушенных эритроцитов. Цикл развития для *P. malariae* составляет 72 часа, для других видов — 48 час. С завершением цикла размножение *P. malariae* и *P. falciparum* в печени прекращается, тогда как у *P. vivax* и *P. ovale* часть спорозоитов (гипнозоиты) остается в гепатоцитах, образуя дремлющие очаги, дающие отдаленные рецидивы.

В некоторых эритроцитах развиваются женские и мужские гамонты, завершающие свое развитие только в организме комара в течение 7-45 сут. (в зависимости от температуры воздуха).

Toxoplasma gondii — внутриклеточный паразит, морфологически напоминающий вытянутую дольку апельсина, длина 4-7 мкм, один конец закруглен. Распространен повсеместно, вызывает токсоплазмоз. Заржение человека происходит алиментарным путем при проникновении ооцист и тканевых цист (при употреблении полусырых мясных продуктов, с немытыми овощами и фруктами), через кожу и трансплацентарно. Инфицированность населения разных стран составляет от 4 до 68%; возбудитель выделен практически от всех млекопитающих и многих птиц.

Жизненный цикл включает стадии полового и бесполого размножения. Первичные и основные хозяева — домашние кошки и другие представители семейства кошачьих, в организме которых происходит половое размножение возбудителя. Первичное заражение кошек происходит при поедании грызунов, содержащих ооцисты, из которых выходят паразиты — спорозоиты, проникающие в клетки кишечника и превращающиеся в трофозоиты, размножающиеся делением (шизогония). Половое размножение также происходит в клетках слизистой оболочки кишечника. Образовавшиеся в результате шизогонии мерозоиты трансформируются в гаметоциты. Слияние разнополых гаметоцитов приводит к образованию зиготы (ооцисты). Ооцисты — округлые образования с плотной оболочкой размером 9-14 мкм, выделяются с испражнениями, длительно сохраняются в почве.

В организме человека происходит бесполый цикл размножения. Из ооцист выходят спорозоиты, активно поглощаемые макрофагами (незавершенный фагоцитоз). С макрофагами они диссеминируют по лимфатическим сосудам. В макрофагах происходит процесс шизогонии, на поздней стадии которой макрофаги погибают, а освободившиеся паразиты (таксизоиты) инвади- зируют в клетки организма (подвержены любые ядро-содержащие клетки).

Большинство случаев токсоплазмоза протекает бессимптомно, однако у людей с иммунодефицитами он приобретает тяжелый, преимущественно фатальный характер.

Под *Sarcocystis* представлен кокцидиями, близкими к токсоплазмам, также имеющими несколько хозяев. Человек заражается, поедая термически недостаточно обработанную говядину или свинину, содержащую саркоцисты, при этом может развиваться кишечный или мышечный саркоцистоз.

Под *Babesia* включает виды, патогенные для животных и человека, вызывающие бабезии — маляриеподобные заболевания, особенно часто у спленэктомированных пациентов.

Под *Cryptosporidium* объединяет виды, паразитирующие в эпителиальных клетках кишечника теплокровных. Заражение происходит с загрязненной водой и пищей. У пациентов с иммунодефицитами вызывают хронические поражения желудочно-кишечного тракта.

6.2 Саркодовые

Саркодовые включены в тип Sarcomastigophora, класс Lobosea, отряд *Amoebia*. Это наиболее примитивные организмы, в большинстве свободноживущие, но некоторые обитают в кишечнике человека и животных. Среди патогенных амеб наиболее распространена *Entamoeba histolytica*.

Под *Entamoeba* включает единственный патогенный для человека вид — *E. histolytica*, вызывающий амебиаз (амебную дизентерию). Возбудитель существует в виде различных форм.

Большая вегетативная форма — крупная (20-60 мкм) клетка. От прочих амеб отличается толчкообразным поступательным движением, при котором образует псевдоподии. Выделяется с испражнениями при остром амебиазе.

Тканевая форма — мелкая (20-25 мкм) патогенная форма инвазирует стенку толстой кишки с развитием специфических поражений.

Просветная форма — основная форма существования, образует цисты.

Цисты — неподвижные круглые (8-15 мкм) прозрачные образования, иногда содержат хроматоидные тельца (скопления РНК и протеинов). При окрашивании раствором Люголя видны 4 ядра в виде колец.

Жизненный цикл. Основной хозяин — человек. Просветные формы амебы обитают в верхнем отделе толстой кишки, питаясь бактериями и клеточным детритом. Пассивно передвигаясь с кишечным содержимым, проникают в дистальные отделы кишечника и при определенных условиях (обезвоживание, нарушение микробного ценоза, изменение pH) образуют цисты.

Из кишечника цисты попадают в воду, на руки, в пищу (переносятся мухами) и проникают в организм человека. В тонкой кишке оболочка цисты растворяется, каждое ядро делится, образуя 8 дочерних особей.

Амебы проникают в подслизистую оболочку кишечника, нарушая межклеточные взаимодействия, образуют некротоксин, разрушающий эпителиальные клетки и вызывающие некроз прилежащих тканей. Амебы проникают в кровеносные и лимфатические сосуды, а из них и в другие органы.

Менее распространены другие патогенные виды саркодовых: *Naegleria fowleri* вызывает амебный менингоэнцефалит; амебы родов *Acanthamoeba* и *Hartmarella* — возбудители спорадических заболеваний, проявляющихся некротическими поражениями кожи, роговицы и внутренних органов, наиболее часто у ослабленных лиц или у пациентов с иммунодефицитами. Они обитают в воде, колонизируют увлажнители кондиционеров, что может приводить к попаданию амеб в воздух.

6.3 Жгутиконосцы

Отличительной чертой представителей этого класса является наличие жгутиков, обеспечивающих их движение. У некоторых видов эту функцию выполняет ундулирующая мембрана — тонкая перепонка, образованная продольным соединением одного из жгутиков с телом простейшего. Жгутиконосцы включают большое количество видов, паразитирующих в организме человека, однако патогенными признаны лишь некоторые из них.

Trichomonas vaginalis имеет грушевидное тело 14-30 мкм длиной, удлиненное ядро, смещенное в передний конец и вакуолизированную цитоплазму. На переднем концу имеется 4 жгутика и ундулирующая мембрана, доходящая до середины тела. Сквозь все тело проходит осевая нить — аксостиль, выступающая на заднем конце в виде шипика.

Вызывает трихомоноз (трихомониаз), передающийся половым путем.

В организме человека обитают и другие трихомонады: *T. tenax* — комменсал ротовой полости и *T. hominis* — комменсал толстой кишки.

Giardia lamblia (*Lamblia intestinalis*) имеет грушевидное тело 5-15×9-21 мкм, толщина 2-4 мкм, существует в виде вегетативной формы — трофозоита, образует цисты.

Трофозоиты имеют 2 ядра, 4 пары жгутиков, расположенных сверху, снизу, сзади и на боковых поверхностях. В верхнепереднем отделе расположен присасывательный диск, окруженный фибрillами, для прикрепления к клеточному эпителию. Пищу всасывают всей поверхностью тела. Размножаются продольным делением. Обитают в верхних отделах тонкой кишки.

Цисты неподвижные овальные, длина 10-14 мкм, имеют 4 ядра и присасывательный диск, выделяются с испражнениями.

Вызывают гиардиоз (лямблиоз), протекающий в виде латентного паразитоносительства, проявляется преимущественно в виде дисфункций кишечника.

Род *Leishmania*. Все виды этого рода — облигатные внутриклеточные паразиты млекопитающих, у человека некоторые виды вызывают лейшманиозы. Выделяют 4 группы возбудителей.

1. Группа *L. tropica* — возбудители кожного лейшманиоза Старого Света (Африка, Азия).

2. Группа *L. mexicana* — возбудители кожных и диффузных кожных лейшманиозов Нового Света (Америка).

3. Группа *L. brasiliensis* — возбудители кожнослизистых лейшманиозов Нового Света.

4. Группа *L. donovani* — возбудители висцерального лейшманиоза Старого Света.

Жизненный цикл. Лейшмании проходят две стадии развития: безжгутиковую и жгутиковую. Жгутиковые формы (промастиготы) подвижные развиваются в теле насекомого переносчика (москита). Тело веретенообразное длиной 10-20 мкм. Размножаются продольным делением.

Безжгутиковые формы (амастиготы) паразитируют в клетках млекопитающих. Клетки овальные длиной 2-6 мкм. Размножаются простым делением.

Переносчиком заболевания служат москиты родов *Phlebotomus* и *Lutzomyia*, которые заражаются при кровососании на больных людях и животных. В первые же сутки заглощенные амастиготы в кишечнике москита превращаются в промастиготы, размножаются и через 6-8 сут. скапливаются в глотке москита. При укусе человека или животного возбудитель внедряется в клетки кожи или внутренних органов (в зависимости от вида лейшманий), где промастиготы превращаются в амастиготы.

Род *Trypanosoma*. Все виды патогенны для млекопитающих, у человека вызывают трипаносомозы, инфекции, весьма напоминающие лейшманиозы. Жизненный цикл возбудителя проходит в организме человека и животных, у которых трипаносомы вызывают тяжелые, часто смертельные заболевания.

Тело трипаносом продолговатое, узкое, имеет жгутики и ундулирующую мембрану. Размножаются исключительно бесполым путем — продольным либо множественным делением (шизогония).

Цикл развития связан с полиморфизмом и переменой хозяев. В кишечнике насекомых-переносчиков трипаносомы существуют в форме эпимастигот — вытянутых клеток, у которых жгутик начинается в передней части тела, ундулирующая мембрана не выражена. В крови человека и животных циркулируют трипомастиготы — удлиненные клетки, жгутик которых начи-

нается в задней части, ундулирующая мембрана выражена четко.

Выделяют *африканские и американский трипаносомозы*. Африканские трипаносомозы вызывает *T. brucei* (подвиды *rhodesiense* и *gambiense*). Переносчиком является муха цеце (*Glossina spp.*). При кровососании трипомастиготы проникают в организм мухи, превращаются в эпимастиготы и размножаются в кишечнике и слюнных железах. Через несколько недель в организме насекомого скапливаются дочерние популяции возбудителя, и оно становится способным переносить трипаносомы на млекопитающих.

Возбудителем американского трипаносомоза является *T. cruzi*, переносчиками — клопы-хищники рода *Triatoma*. Жизненный цикл *T. cruzi* напоминает цикл прочих трипаносом, однако этот вид не образует трипомастиготы, в клетках теплокровных размножение происходит в форме амastiгот.

Dientamoeba fragilis длительное время считали непатогенной амебой, позднее была установлена его принадлежность к жгутиконосцам. Вызывает диареи. В кишечнике человека присутствует в амебовидной безжгутиковой форме. Наличие цист не установлено, но доказан факт передачи заболевания от человека человеку.

6.4 Инфузории

Из всех видов инфузорий, обитающих в кишечнике человека, безусловно патогенным видом является

Balantidium coli, вызывающим балантидиаз (инфузорную дизентерию).

Вегетативная форма представляет собой ресничную инфузорию, тело вытянутое, яйцеобразное, 30–100 x 30–150 мкм. Питается бактериями, грибами и другими пищевыми частицами, для заглатывания которых служит цитостом (клеточный рот), окруженный ресничками. Ядерный аппарат представлен большим и малым ядром.

Цисты округлые с тонкой оболочкой, в окружающей среде могут сохраняться несколько недель. *B. coli* обитает в кишечнике свиней, для которых малопатогенна. Цисты выделяются с испражнениями. Источник заражения — загрязненные вода и пища.

Больных и носителей не следует рассматривать как источник заражения, т.к. в организме человека цисты образуются редко, а заражение вегетативными формами практически невозможно.

Лечение протозойных инфекций

Метаболизм простейших как эукариотических организмов близок к метаболизму высших животных, что уменьшает количество мишней для фармакологического воздействия, и делает простейших нечувствительными к большинству антибактериальных препаратов. Способность к формированию резистентности у простейших, особенно у малярийных плазмодиев, выражена более чем у бактерий.

Основные препараты для лечения протозойных инфекций приведены в таблице 18.

Препараты для лечения протозойных инфекций

Таблица 18.

Препарат	Заболевание
Метронидазол	Амебиаз, трихомониаз, циклоспоридиоз, гиардиоз
Хинакрин гидрохлорид	Гиардиоз
Йодохинол	Носительство <i>Entamoeba histolytica</i> ; инфекции, вызванные <i>Dientamoeba fragilis</i>
Амфотерицин В	Первичный амебный менингоэнцефалит; поражения ЦНС, вызванные акантоамебами; лейшманиозы
Пропамедин изотионат в комбинации с неомицином	Акантамебные кератиты
Нифуртимокс	Американский трипаносомоз
Аллопуринол	Американский трипаносомоз, лейшманиозы
Сурамин	Африканские трипаносомозы
Меларсопрол	то же
Эфлорнитин	то же
Стибиоглюконат натрия, метлумин антимонат (пятивалентные соединения окиси сурьмы)	Лейшманиозы
Хлорохин	Неосложненные формы малярии
Гидроксихлорохин	Малярия
Фансидар (сульфадоксин-пираметамин)	Осложненные формы малярии, вызванные хлорохинрезистентными плазмодиями
Примахин	Малярия, для элиминации возбудителя из печени
Прогуанил	Профилактика малярии
Хингхаосу (артемизинин)	Малярия
Пираметамин	Токсоплазмоз
Триметоприм-сульфаметоксазол	то же
Доксициклин	Малярия, балантидиаз
Клиндамицин	Малярия, амебиаз
Тетрациклины	то же

Глава 7. ОСНОВЫ ПАТОГЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ. ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

7.1 Патогенность и вирулентность

Патогенные (pathos — страдание, болезнь) или болезнестворные микроорганизмы способны вызывать заболевания (человека, животных, растений). Патогенными могут быть бактерии, грибы, простейшие, вирусы.

Условно-патогенными называют микроорганизмы, вызывающие заболевания в неблагоприятных для макроорганизма условиях. Для человека такими условиями могут оказаться переохлаждение, радиация, нарушение питания, интоксикация, другое заболевание и т. п.

Патогенность — это потенциальная способность определенных видов микроорганизмов вызывать инфекционные заболевания, видовой генетически детерминированный признак, результат эволюционного приспособления микроорганизма к паразитическому существованию.

Вирулентность — это степень патогенности данного штамма, его индивидуальный признак, изменяющийся под влиянием внешних условий. Вирулентность можно повысить пассажами (последовательным заражением) через восприимчивых животных, или ослабить путем воздействия неблагоприятных для микроорганизма факторов (иммунных сывороток, биоцидов и т. п.). Последнее используют для получения авирулентных вакцинных штаммов. Кроме того, вирулентность можно изменить методом генетических рекомбинаций.

Для характеристики вирулентности используют следующие показатели:

- Dcl (Dosis certa letalis) — доза (количество микробных клеток), вызывающая гибель всех зараженных животных;

- Dlm (Dosis letalis minima) — доза, вызывающая гибель около 80% зараженных животных;

- D₅₀ — доза, вызывающая гибель 50% зараженных животных, которую определяют статистическим методом.

7.2 Факторы защиты и агрессии

Патогенность и вирулентность микроорганизма связана с генетически детерминированными особенностями его структуры и метаболизма. Гены вирулентности образуют кластеры (островки патогенности) в хромосомах и плазмидах, способные к горизонтальному переносу. Сходные гены вирулентности обнаруживаются у таксономически далеких видов. Патогенность и вирулентность определяется способностью микроорганизма уклоняться от защитных механизмов своих хозяев и продуцировать вещества, определяющие их инвазивность (способность к распространению в организме) и агрессивные свойства. Все эти особенности носят название факторов вирулентности или факторов защиты и агрессии. Существуют разнообразные способы избежать действия защитных механизмов хозяина:

- Включение генома некоторых вирусов в хромосому хозяина с последующей вертикальной передачей (наследованием).

- Локализация паразитов (вирусов, возбудителей туберкулеза, лепры, бруцеллеза, лейшманиоза и др.) в клетках иммунной системы (макрофагах, лимфоцитах).

- Синтез иммунодепрессантов, т. е. веществ, подавляющих синтез и активность антител, комплемента, лизоцима, активность иммунокомпетентных клеток.

- Изменение поверхностных антигенов инфекционного агента в сторону сближения с антигенами хозяина (молекулярная мимикрия).

- Антигенная изменчивость паразита на протяжении инфекционного процесса, связанная с генетической рекомбинацией с участием фагов, плазмид, транспозонов, IS-элементов, позволяет микробам ускользать от иммунной системы хозяина.

- Образование устойчивых к внешним воздействиям стадий покоя (споры, цисты).

- Особенности клеточной поверхности, обусловливающие защиту клетки: капсула у патогенных клебсиелл, клостридий, иерсиний, стрептококков, возбудителя сибирской язвы; внешняя мембрана у грамотрицательных бактерий; корд-фактор микобактерий туберкулеза; Fc-рецепторные белки стафилококков и стрептококков и др. Капсула защищает микробные клетки от фагоцитоза, обеспечивает их прикрепление к тканям организма. Липополисахариды внешней мембранны блокируют антитела, обладают свойствами

эндотоксинов. Корд-фактор (липид, димиколат трегользы) обеспечивает склеивание клеток, их кислотоустойчивость. Fc-рецепторные белки, неспецифически связывающие иммуноглобулин, защищают клетку от действия специфических антител, подавляют фагоцитоз и иммунный ответ, инактивируют систему комплемента.

• Ворсинки (пили) обеспечивают адгезию клеток и образование микроколоний. Адгезия происходит за счет особых белков или гликопротеинов, названных адгезинами, которые расположены на клеточной поверхности, часто на пиях, и взаимодействуют с эукариотической клеткой по типу лектинов, осуществляющих углевод-белковое узнавание. Такое взаимодействие является лиганд-рецепторным, где роль лиганда выполняет адгезин, а рецептора — соответствующая структура углеводной природы на клетке хозяина. Механизм биологического узнавания лежит в основе специфичности как процесса поражения ткани микробом, так и функционирования защитных сил организма.

• Подвижность является существенным фактором инвазии, она обеспечивает проникновение микроорганизмов в клетки и ткани.

Токсины. По локализации различают экзо- и эндотоксины. Экзотоксины синтезируются возбудителями столбняка, ботулизма, анаэробной инфекции, дифтерии, коклюша, холеры, чумы, а также некоторыми видами шигелл, стафилококков, стрептококков, псевдомонад и др. Это протеины, которые вырабатываются клеткой в виде неактивных предшественников, их активация проходит по типу ограниченного протеолиза под действием ферментов микробной клетки или хозяина. В результате активации токсины приобретают ферментативную активность АДФ-рибозилтрансферазы, которая запускает каскад реакций, ведущих к нарушению синтеза циклического АМФ, следовательно, к нарушению регуляции синтеза белка в клетке хозяина. Многие экзотоксины обладают избирательным действием на органы и ткани: дифтерийный токсин повреждает надпочечники и мышцу сердца, столбнячный — двигательные нервные клетки. Экзотоксины действуют на восприимчивый организм в малых дозах, например, в 1 мл дифтерийного токсина содержится 10000 Dlm для морской свинки (Dlm токсина — его минимальная доза, которая убивает подопытное животное). Некоторые из них термоустойчивы, не разрушаются под влиянием пищеварительных ферментов (ботунический, стафилококковый). Воздействие формалина, блокирующего аминогруппы активного центра, приводит к потере токсичности, что используется для приготовления вакцины препаратов — анатоксинов.

Эндотоксины прочно связаны с клеткой и могут выделяться в среду только после ее разрушения. Обычно это гликоконъюгаты (липополисахариды, гликопротеины, гликолипопротеины) клеточной стен-

ки, чаще — внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Важную роль в токсичности этих веществ играет липид А. Их токсичность проявляется значительно в более высоких концентрациях, чем экзотоксины. Эндотоксины обладают пирогенным действием, на чем основан метод их определения, например, в инъекционных растворах. Эндотоксины способны активировать систему комплемента, систему свертывания крови, влияют на ферментные системы организма, нарушая углеводный обмен, функции печени и др. Рецепторы эндотоксинов присутствуют на мембранах тромбоцитов, макрофагов, лимфоцитов, эндотелия капилляров. Действие эндотоксинов зависит от их концентрации: в малых дозах они способны активировать фагоцитоз и другие защитные реакции организма, с чем связано применение некоторых из них в качестве иммуномодуляторов (пирогенал).

Ферменты патогенности катализируют реакции, ведущие к образованию токсичных продуктов или разрушению клеток и тканей организма.

Лецитиназа С (фосфолипаза) *Clostridium perfringens* гидролизует лецитин (фосфолипид) клеточных мембран, повреждая эритроциты, и другие клетки, вызывая некроз тканей.

Нейраминидаза холерного вибриона, возбудителей анаэробной инфекции, стрептококков, вириуса гриппа и др. гидролизует соединения, содержащие сиаловые кислоты. Эти вещества обусловливают вязкость органических жидкостей, участвуют в агрегации клеток, процессах биологического узнавания, внутриклеточного транспорта и др., поэтому действие нейраминидазы может привести к нарушению разнообразных функций организма.

Фибринолизин и **гиалуронидаза** стрептококков и других микроорганизмов являются факторами распространения, облегчая микробным клеткам проникновение в ткани организма. Гиалуронидаза гидролизует гиалуроновую кислоту — сложный мукополисахарид, придающий вязкость межклеточному веществу. Поэтому фермент может быть использован для совместного введения с лекарственными препаратами для ускорения их проникновения в ткани, для ликвидации рубцов и т. п.

Гемолизины и **лейкоцидины** стафилококков и стрептококков разрушают эритроциты и лейкоциты.

Плазмокоагулаза стафилококков и других микроорганизмов — пептидаза, активирующая систему свертывания крови путем каталитического превращения протромбина в тромбин, обеспечивает создание защитного фибринового чехла вокруг микробных клеток.

Уреаза пневмококков, клебсиелл, иерсиний гидролизует амиды с образованием токсичного иона аммония.

Декарбоксилазы возбудителей анаэробной инфекции и других микроорганизмов катализируют реакции с образованием токсичных аминов.

7.3 Инфекционные болезни

Инфекционные болезни — это группа заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами — вирусами, бактериями, простейшими. Общим признаком для большинства инфекционных болезней является возможность передачи возбудителя от больного здоровому и возможность их массового (эпидемического) распространения. В результате взаимодействия с возбудителем в организме развивается совокупность физиологических (адаптационных) и патологических процессов, сопровождающихся нарушением гомеостаза. Симбиотические взаимоотношения, наносящие хозяину вред, называют антагонистическим симбиозом, крайним проявлением которого является паразитизм. Облигатными внутриклеточными паразитами являются вирусы, риккетсии и хламидии.

Источником инфекции является среда, в которой возбудитель заболевания может обитать и размножаться в естественных условиях. Заболевания, основным источником возбудителя которого является человек, называются *антропонозами*; заболевания, передающиеся от животных — *зоонозам*; заболевания, вызванные микроорганизмами, обитающими в воде, почве и других объектах внешней среды — *сапронозы*. Возможны случаи заражения из разных источников (от человека или животного и от зараженных объектов внешней среды, благоприятных для размножения возбудителя): почва может служить источником возбудителей сальмонеллезов, дизентерии, сибирской язвы, столбняка, анаэробной инфекции; вода — кишечных инфекций, туляремии, гепатита А; пищевые продукты — кишечных инфекций, туберкулеза, бруцеллеза, скарлатины, дифтерии, пищевых токсикоинфекций.

Пути проникновения инфекционного агента в организм определяются его природой. Возбудители кишечных инфекций проникают через рот с водой и пищей; респираторных — через дыхательные пути; через кровь (укусы насекомых, загрязненные инструменты, инъекционные растворы) передаются малярия, риккетсиозы, энцефалит, СПИД, гепатит В и др.; через кожу и слизистые оболочки — дерматомикозы, венерические болезни. Возбудители чумы, сибирской язвы, туберкулеза, дифтерии, скарлатины способны проникать в организм любым из перечисленных путей. Некоторые заболевания способны передаваться от матери плоду, т. е. вертикально. Передача возбудителя (сифилиса, гонореи, брюшного и возвратного тифа, токсоплазмоза, стафилококков и др.) может осуществляться через плаценту или при прохождении через родовые пути.

Периоды развития инфекционной болезни. Период от момента заражения до появления первых признаков заболевания называется *инкубационным*. В этот период происходит размножение возбудителя, синтез микробных токсинов, а также развитие защитных ре-

акций хозяина. При установлении равновесия между факторами агрессии возбудителя и защитными силами организма болезнь может протекать без явных признаков (латентно) или вообще не проявляться. В условиях, снижающих резистентность (стресс, переохлаждение, нарушение питания и т. п.) микроорганизмы приобретают возможность оказывать патогенное действие.

Период предвестников болезни — *продромальный* характеризуется проявлением самых начальных неспецифических признаков болезни (недомогание, легкая лихорадка).

В стационарном периоде проявляются основные симптомы, характерные для данного заболевания. Иногда болезнь может протекать атипично, например, при интенсивном лечении антибиотиками.

В период угасания болезни наблюдается снижение интенсивности патологических процессов, исчезновение ее клинических признаков. Период угасания болезни заканчивается выздоровлением или переходом в хроническое состояние. После выздоровления человек может оставаться носителем инфекционного агента.

Тактика лечения строится в зависимости от периода инфекционной болезни. Большое значение имеют профилактические мероприятия: соблюдение правил санитарии и гигиены, здоровый образ жизни, закаливание организма, а также профилактическая вакцинация.

Формы инфекционных заболеваний

По источнику инфекционного агента различают *экзогенную инфекцию* (при внесении возбудителя извне) и *эндогенную*, которая возникает в результате активации собственной микробиоты при нарушении относительного постоянства ее состава (дисбактериоз) и воздействия внешних факторов, снижающих резистентность. К эндогенным инфекциям относятся ангиня, аппендицит, холецистит, остеомиелит, гнойничковые заболевания кожи и др.

По локализации в организме инфекционные болезни подразделяют на *очаговые* (местные) и *генерализованные* (общие). В неблагоприятных для больного условиях местная инфекция может перейти в генерализованную, например, при фурункулезе, туберкулезе, сифилисе, кандидозе и др.

При распространении микробов или их токсинов по всему организму говорят о *бактериемии*, *вирусемии*, *септициемии*, *токсикемии*.

По типу инфицирующих агентов различают *моноинфекцию* и *смешанную инфекцию*. Последние отличаются качественно иным течением по сравнению с моноинфекциами, а взаимоотношения возбудителей достаточно вариабельны. Наиболее неблагоприятны для больного симбиотические отношения, например, между трихомонадами и гонококками, когда бактерии поселяются в клетках простейших, осложняя лечение заболевания.

Повторные проявления заболевания характеризуются как *вторичная инфекция* при осложнении после первого заболевания, например, бактериальная пневмония после гриппа или кори; *реинфекция* — повторное заражение тем же видом микроорганизма после выздоровления, например, при венерических заболеваниях; *рецидив* — возобновление болезни после клинического выздоровления, вызванное персистирующими возбудителями.

По продолжительности пребывания инфекционного агента в организме различают *острые, хронические, персистирующие* инфекции и *микробоносительство*. Персистенция (persistence — постоянство) характеризуется длительным сохранением микроорганизмов в организме хозяина. Наблюдается при гепатите В, герпесе, краснухе, туберкулезе, малярии, токсоплазмозе и др. Бактерии могут персистировать в виде L-форм и интактных клеток в тканях и клетках организма, в том числе в макрофагах. Способность персистировать в макрофагах присуща всем неспорообразующим микроорганизмам — возбудителям антропонозных инфекций, являясь одним из факторов их выживания и сохранения вида. Персистенции способствуют такие механизмы защиты и агрессии микроорганизма, как молекулярная мимикрия, способность инактивировать лизоцим, комплемент, иммуноглобулины и другие важные белковые молекулы с помощью внеклеточных протеаз.

Микробоносительство — одна из форм взаимоотношений между микро- и макроорганизмом при которой не наблюдается явных признаков болезни. Оно связано с относительной невосприимчивостью организма или с низким уровнем иммунитета (толерантностью), характерно для кишечных инфекций, скарлатины, менингита, малярии, полиомиелита и др.; возникает у переболевших или у здоровых, бывших в контакте с больными.

Все носители являются эпидемически опасными. Лечение, как персистирующих инфекций, так и микробоносительства направлено на стимуляцию иммунной системы организма.

По проявлению признаков различают *явные и скрытые (латентные, бессимптомные)* заболевания. При неблагоприятных для человека условиях скрытая инфекция может перейти в явную. Бессимптомные или атипичные инфекционные заболевания появляются при лечении антибиотиками и другими активными антимикробными препаратами. Отсут-

ствие характерных признаков заболевания затрудняет диагностику, а, следовательно, выбор средств лечения и организацию противоэпидемических мероприятий.

По степени распространения среди населения инфекционные заболевания могут быть *спорадическими* (появление отдельных случаев) и *эпидемическими* (превышающими средний уровень спорадической заболеваемости). Последнюю форму заболеваний среди животных называют *эпизоотией*. Когда эпидемия достигает чрезвычайно больших размеров и охватывает страны и континенты, говорят о *пандемии*. *Эндемическими* называют инфекции, возбудитель которых длительное время сохраняется в какой-либо местности (клещевой энцефалит, туляремия, малярия и др.).

Эпидемиология инфекционных заболеваний.

Инфекционные заболевания могут распространяться вертикально (от одного поколения к другому) и горизонтально (среди неродственных членов популяции). В последнем случае заражение может происходить из какого-то общего источника (вода, пищевые продукты) или от человека к человеку, когда каждый индивидуум служит источником инфекции для других.

При заражении из общего источника наблюдается резкий скачок заболеваемости, сходные инкубационный период и течение инфекционной болезни у всех больных. При передаче инфекционного агента от больного здоровому происходит постепенное нарастание числа заболевших, а инкубационный период и течение болезни зависят от индивидуальной чувствительности индивидуума.

Факторы, определяющие возникновение эпидемии, это

- а) инфекционность возбудителя (способность к быстрому распространению и преодолению защитных сил организма);
- б) плотность популяции в данном регионе;
- в) число чувствительных индивидуумов в данной популяции.

Изменение хотя бы одного из этих факторов влияет на возможность возникновения эпидемии. Например, эпидемические вспышки кори, ветряной оспы в начале осени среди детей, возвращающихся в школу после каникул, связаны с концентрацией чувствительных индивидуумов в одном месте. Возможность возникновения эпидемии снижают или предотвращают профилактические прививки (снижение числа людей, чувствительных к данному заболеванию).

ЧАСТЬ II

АНТИМИКРОБНЫЕ АГЕНТЫ

Глава 8. АНТИБИОТИКИ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

8.1 Антибиотики

Общие представления

Термин «антибиотический» впервые употребил в 1889 г. Поль Вюйемен, говоря об антагонистических взаимоотношениях растений и животных. В 1942 г. Ваксман определил антибиотик как «химическое вещество, произведенное микроорганизмами, которое способно угнетать рост или даже разрушать другие микроорганизмы в разбавленных растворах». Это вторичные метаболиты, которые необходимы их продуцентам для выживания в условиях конкуренции с другими микроорганизмами.

Помимо антимикробной активности они могут обладать другими фармакологическими свойствами: действовать как иммунодепрессанты, ингибиторы ферментов, противоопухолевые и цитотоксические средства, инсектициды и гербициды. К настоящему времени описано около 20000 антибиотических веществ, однако, в клинике используется не более 160 антибиотиков, из них 30% составляют природные продукты, 30% — полусинтетические и остальные — синтетические. Химический синтез часто бывает экономически более выгодным для получения аналогов природных соединений, чем биосинтез. Однако биосинтез незаменим для получения природных продуктов, предшественников полусинтетических антибиотиков и ферментов, необходимых для энзиматической трансформации природных или синтетических соединений. Постоянное появление микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, требует изыскания новых продуцентов и новых антимикробных препаратов.

Активность антибиотиков, т. е. способность подавлять рост микробной популяции определяется разнообразными методами (см. главу 9).

По спектру действия антибиотики подразделяют на противовирусные, антибактериальные, антифунгальные, антипротозойные. Некоторые из них обладают широким спектром действия, другие активны против определенных групп микроорганизмов, например, только против грамположительных бактерий. Антибиотики весьма разнообразны по структуре и механизму действия.

8.1.1 β -лактамные антибиотики

Пенициллины. Общее строение молекулы пенициллинов показано на рис. 43. Существуют природные и полусинтетические пенициллины. Природные (бензилпенициллин G, феноксиметилпенициллин или пенициллин V) синтезируются при ферментации *Penicillium notatum* и *P. chrysogenum*. Полусинтетические являются производными основы молекулы пенициллина — 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК), в которых боковая цепь представлена различными радикалами, введенными путем ацилирования 6-АПК. Они различаются по своей активности и другим свойствам (табл. 19). Так, в отличие от природного бензилпенициллина многие полусинтетические пенициллины не разрушаются в кислой среде желудка и могут быть использованы перорально. Такие производные бензилпенициллина, как безатин, бенетамин, прокайн медленно освобождают пенициллин, длительное время поддерживая его высокую концентрацию в крови, поэтому не требуют многократного введения в организм больного. Эфиры карбенициллина и ампциллина подвергаются ферментному гидролизу после абсорбции из слизистой оболочки кишечника и создают высокий уровень активного антибиотика в крови.

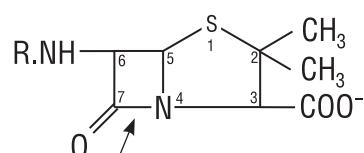


Рис. 43. Общее строение молекулы пенициллинов. Стрелкой показана связь, гидролизуемая β -лактамазой.

Некоторые полусинтетические пенициллины в отличие от бензилпенициллина устойчивы к действию микробной β -лактамазы (пенициллиназы) — фермента, инактивирующего пенициллин за счет разрыва β -лактамного кольца. Имеются препараты, активные как против грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, включая *Pseudomonas aeruginosa* (бактерия высокорезистентная ко многим антибактериальным агентам).

Мециллинам, 6- β -аминопенициллановые кислоты и их эфир пивмекиллинам имеют необычный

Пенициллин	Эффективен при оральном применении	Устойчив к β -лактамазе		Активен против	
		St. aureus	Γ^- бактерий	Γ^- бактерий, кроме P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
Бензилпенициллин	-	-	-	-	-
Феноксиметилпенициллин	+	-	-	-	-
Метициллин	-	+	+	-	-
Оксациллин	+	+	+	-	-
Клоксациллин	+	+	+	-	-
Флуклоксациллин	+	+	+	-	-
Ампициллин	+	-	-	+	-
Амоксициллин	+	-	-	+	-
Карбенициллин	-	-	+	+	+
Тикарциллин	-	-	+	+	+
Карфециллин ^{1*}	+	-	+	+	+
Инданил карбенициллин [*]	+	-	+	+	+
Пивампициллин ^{2**}	+	-	-	+	-
Талампициллин ^{**}	+	-	-	+	-
Бакампициллин ^{**}	+	-	-	+	-
Пиперациллин ^{3***}	-	-	-	+	+
Азлоциллин ^{***}	-	-	-	+	+
Мезлоциллин ^{***}	-	-	-	+	+
Мециллинам ^{4****}	-	..	-	+	-
Пивлюциллинам ^{****}	+	..	-	+	-

* — эфиры карбенициллина;

** — эфиры ампициллина;

*** — замещенные ампициллины;

**** — 6- β -амидинопенициллины;

.. — не действуют на Γ^+ бактерии.

спектр антибактериальной активности не действуют на грамположительные микроорганизмы, как классические пенициллины, а лишь на грамотрицательные.

8.1.2 Цефалоспорины

Цефалоспорины (цефемы), подобно пенициллинам, относят к группе β -лактамных антибиотиков. Они имеют более широкий спектр действия по сравнению с пенициллинами и более устойчивы к β -лактамазам. Люди, страдающие аллергией к пенициллину, обычно не чувствительны к цефемам. Продуцентом природного антибиотика цефалоспорина С является гриб *Acremonium chrysogenum*, первоначально названный *Cephalosporium acremonium*. На основе природного цефалоспорина получены многочисленные полусинтетические препараты (рис. 44).

Клавами отличаются от пенициллинов (рис. 45) замещением серы в тиазолидиновом кольце пенициллина на кислород в оксазолидиновом кольце клавами и отсутствием боковой цепи в 6-м положении. Клавулановая кислота (рис. 45, А), продуцентом которой является *Streptomyces clavuligerus*, обладает низкой антибактериальной активностью, но является сильным ингибитором стафилококковой β -лактамазы и большинства типов β -лактамаз, продуцируемых грамотрицательными бактериями, особенно с «пенициллиназной», но не «цефалоспориназной» активностью.

В клинической практике используют аугментин — комбинированный препарат клавулановой кислоты с амоксициллином — полусинтетическим пенициллином, обладающим широким спектром действия, но чувствительным к β -лактамазе.

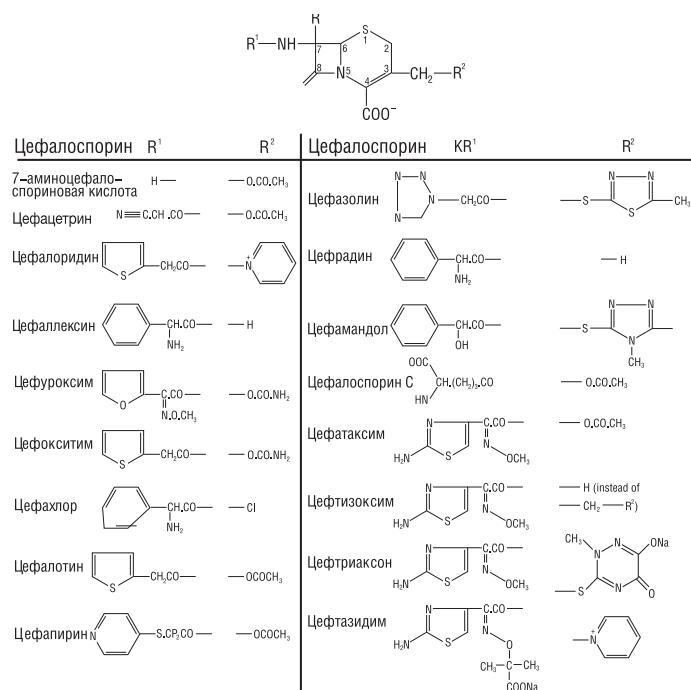


Рис. 44. Структура цефалоспоринов.

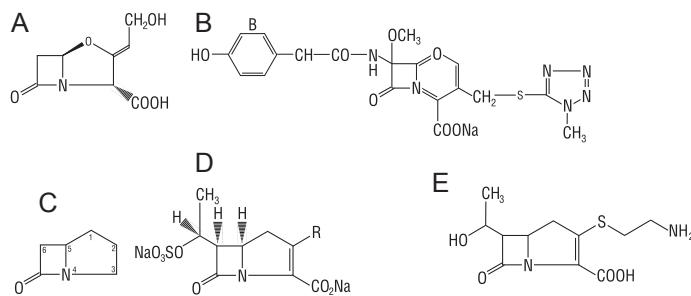


Рис. 45. Клавамы: А — клавулановая кислота; В — латамоксиф; С — карбапенемы; Д — оливановые кислоты; Е — тиенамицин.

В 1-оксацефемах атом серы в дигидротиазиновом кольце цефалоспорина замещен кислородом. Такая молекула чувствительна к β-лактамазам, однако, введение 7-а-метоксигруппы (как у цефокситина), делает соединение более стабильным. К этой же группе принадлежит латамоксиф (рис. 45, В) — антибиотик широкого спектра, устойчивый к β-лактамазам.

Карбапенемы (рис. 45, С) являются аналогами пенициллинов или клавамов, у которых атом серы (пенициллинов) или кислорода (клавамов) замещен углеродом. К ним принадлежат оливановые кислоты (рис. 45, Д), продуцируемые *Streptomyces olivaceus* — антибиотики широкого спектра, сильные ингибиторы β-лактамаз, а также тиенамицин (рис. 45, Е), обладающий такими же свойствами, но нестабильный. Его производные N-формимиодильтиенамицин лишен этого недостатка.

Нокардицины (А — Д) продуцируются *Nocardia sp.*, наиболее активен антибиотик широкого спектра нокардицин А (рис. 46, А).

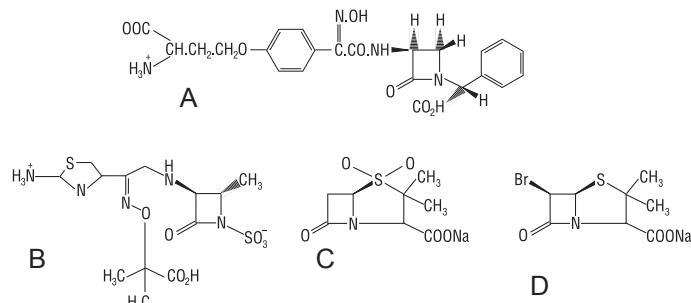


Рис. 46. А — Нокардицин А; В — азтреонам; С — сульфонпенициллановая кислота (Na соль); Д — бромпенициллановая кислота (Na соль).

Монобактамы — это моноциклические β-лактамы, не содержащие тиазолидинового кольца, синтезируются различными штаммами бактерий. Из антибиотиков этой группы наиболее эффективным оказался азтреонам (рис. 46, В), действующий на многие грамотрицательные бактерии и устойчивый к β-лактамазам, однако, не обладающий активностью по отношению к бактериоидам и грамотрицательным анаэробам.

Другие β-лактамы. Производные пенициллановой кислоты, например, сульфон- и бромопенициллановые кислоты (рис. 46, С, Д, Е) являются ингибиторами некоторых типов β-лактамаз.

8.1.3 Тетрациклины

Тетрациклины продуцируются некоторыми видами стрептомицетов, а также получаются как полусинтетические препараты (рис. 47). Так хлортетрациклин образуется при ферментации *S. aureofaciens*, из него путем катализитического гидрогенизирования получают тетрациклин и кломоциклин. Химическая модификация тетрациклина дает миноциклин. Окситетрациклин продуцируется *S. rimosus*, из него получают метациклин, гидрогенизация которого дает доксициклин. Мутант *Str. aureofaciens* продуцирует метилхлортетрациклин. Тиатетрациклины, например, тиациклин, содержат атом серы в 6-м положении молекулы, активны против бактерий, устойчивых к тетрациклину. В настоящее время природные тетрациклины практически не применяются, их вытеснили полусинтетические препараты (доксициклин и миноциклин).

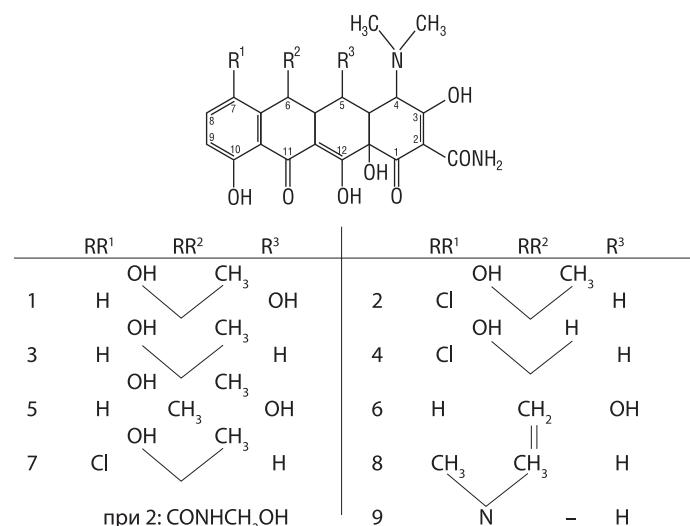


Рис. 47. Тетрациклины: 1 — окситетрациклин; 2 — хлортетрациклин; 3 — тетрациклин; 4 — диметилхлортетрациклин; 5 — доксициклин; 6 — метациклин; 7 — кломоциклин; 8 — миноциклин; 9 — тиациклин.

Тетрациклины — антибиотики широкого спектра. Резистентность к ним развивается относительно медленно. Однако, существует перекрестная резистентность, т. е. микроорганизм, устойчивый к одному из тетрациклинов, устойчив также ко всем членам этой группы.

Следствием употребления тетрациклинов может быть дисбактериоз, в том числе развитие кандидоза.

8.1.4 Рифапицины

Рифапицины в виде комплекса антибиотиков производит *Streptomyces mediterranei*, из них наиболее перспективен рифампицин В, на основе которого создан полусинтетический аналог рифампицин (рис. 48).

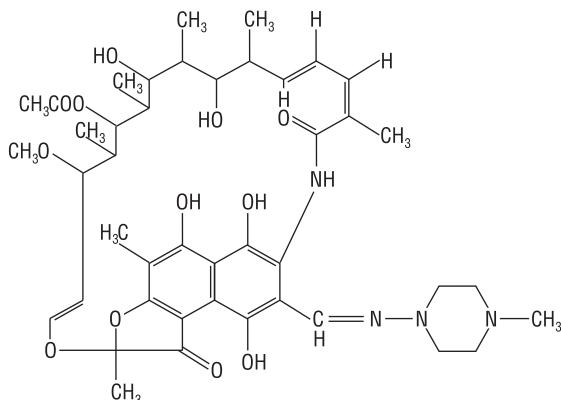


Рис. 48. Рифампицин.

Рифампицин — антибиотик широкого спектра действия. Резистентность развивается довольно быстро, поэтому его рекомендуют использовать ограниченно, в основном при микобактериозах. Препарат плохо всасывается при приеме внутрь, поэтому применяется парентерально или местно.

8.1.5 Аминогликозидные антибиотики

Аминогликозидные антибиотики – это большой класс соединений, образуемых некоторыми актиномицетами и бациллами. Аминогликозиды содержат в своей структуре аминосахара: дезоксистрептамин – в молекулах неомицина, фрамицетина, гентамицина, канамицина, тобрамицина, амикацина, нетилмицина, сизомицина и стрептидина в молекулах стрептомицина и дигидрострептомицина. Аминоциклический стрептомицин не имеет углеводного компонента (рис. 49). Это антибиотики широкого спектра действия. Стрептомицин и канамицин эффективны при туберкулезе. Аминогликозиды слабо действуют на стрептококки, не действуют на энтерококки, провиденции, бактероиды и другие анаэробы.

Модификация аминогликозидных антибиотиков позволяет получить препараты, устойчивые к инактивирующему действию ферментов резистентных штаммов микроорганизмов: 3-дезоксикианамицин (тобрамицин), амикацин, имеющий замещенный аминобутирил в аминогруппе 2-дезоксистрептамина, N-метилсизомицин (нетилмицин).

8.1.6 Макролиды

Молекулы макролидов содержат большие лактонные кольца, соединенные с аминосахарами гликозидными связями. Наиболее важные представители этой группы — это эритромицин, олеандромицин, триацети-

полеандомицин и спирамицин. **Эритромицин** (рис. 50), продуцентом которого является *Streptomyces erythreus*, активен против грамположительных бактерий, нейссерий, *Haemophilus influenzae* и *Legionella pneumophila*, но не действует на энтеробактерии. Его активность увеличивается с повышением рН до 8,5, тиоцианит эритромицина более стабилен, чем свободное основание в кислой среде желудка и применяется орально, он длительно сохраняется в крови и более эффективно проникает в ткани, чем другие формы; *in vivo* гидролизуется до свободного основания.

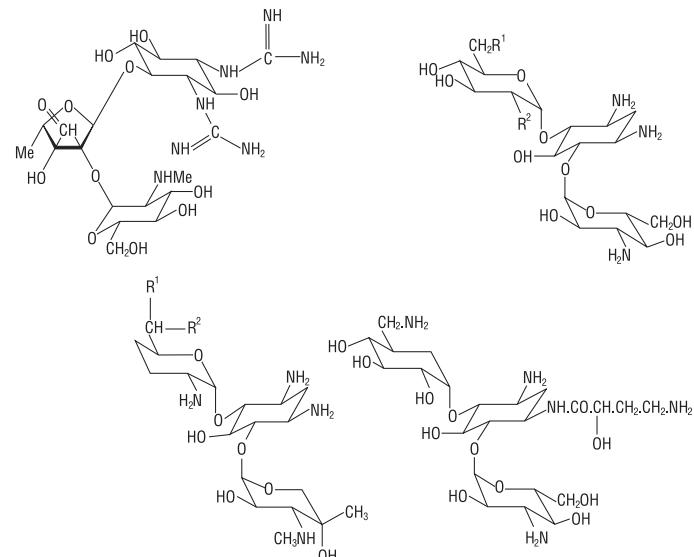


Рис. 49. Аминогликозидные антибиотики.

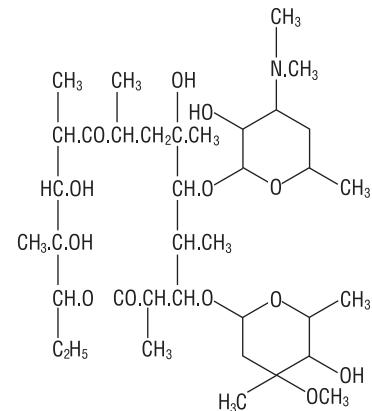


Рис. 50. Эритромицин.

Staphylococcus aureus менее чувствителен к эритромицину, чем пневмококки или гемолитические стрептококки, и быстро образует резистентные формы. Поэтому этот антибиотик не следует применять длительное время.

Олеандомицин (продуцент *S. antibioticus*), его эфир (триацетилолеандомицин) и спиромицин имеют такой же спектр антибактериальной активности, как и эритромицин, но менее активен. Резистентность в клинической практике развивается медленно, однако, существует перекрестная резистентность к антибиотикам всей группы.

8.1.7 Полипептидные антибиотики

Полипептидные антибиотики представляют довольно разнообразную группу соединений, синтезируемых бациллами и актиномицетами. Они включают **бацитрацин**, активный против грамположительных и грамотрицательных кокков, но не бактерий; **полимиксины**, активные против многих грамотрицательных бактерий, исключая *Serratia marcescens* и *Proteus spp.*; **капреомицин** и **виомицин**, действующие на *Mycobacterium tuberculosis*.

Бацитрацин из-за высокой токсичности разрешен к применению только в случаях крайней необходимости.

Полимиксины обладают нефротоксичностью, в меньшей степени токсичны полимиксины В и Е (ко-листины). Для парентерального введения используют сульфометат натрия колистина. Натрия сульфомиксин — смесь сульфометилированного полимиксина В и натрия бисульфита менее токсичен, чем полимиксина В сульфат при сохранении его активности.

Катионные пептиды — новый класс антибиотиков, получаемых как из природных источников, так и химическим синтезом. В природе они присутствуют повсюду — у бактерий, грибов, растений, животных и человека.

У человека катионные пептиды (дефенсины) представлены группой пептидов, содержащих от 23 до 35 аминокислот; присутствуют в лейкоцитах и других тканях, активны против бактерий, простейших, грибов и вирусов, обладают хемотаксической активностью.

У растений это тионины, которые образуются в ответ на инфекцию, активны против некоторых бактерий и грибов.

У бактерий они выполняют функции бактериоцинов: колицин *E. coli*, низин *Lactococcus lactis*, субтиллин *B. subtilis* и др. Они менее активны по сравнению с другими антибиотиками, однако, действуют на устойчивые к другим антибиотикам штаммы, вызывают быструю гибель микроорганизмов, индуцируют развитие резистентности.

Катионные пептиды нейтрализуют отрицательный заряд липополисахаридов бактерий, связываются с ними, препятствуя их взаимодействию с клетками организма, предотвращая таким образом развитие эндотоксического шока у пациентов.

Катионные пептиды слабоиммуногенные, так как имеют общие антигены с макроорганизмом. Разрушаются пептидазами кишечника, поэтому не попадают в окружающую среду.

Низин получают при ферментации *L. lactis* или рекомбинантного штамма *B. subtilis*, используют для консервации пищевых продуктов, для лечения мастита у коров.

8.1.8 Другие антибактериальные антибиотики

Описанные ниже антибиотики (рис. 51) не могут быть отнесены ни к одной рассмотренной ранее группе.

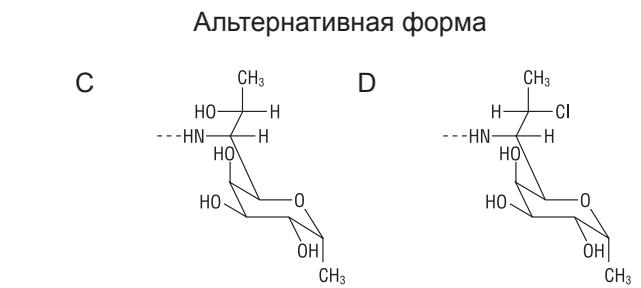
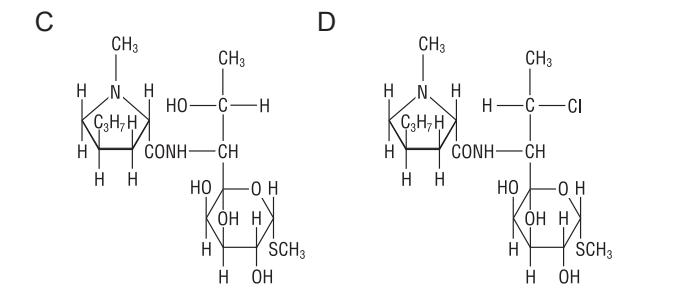
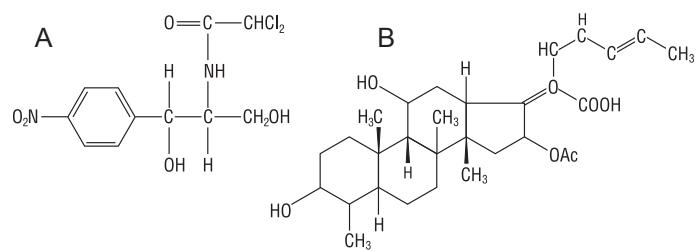


Рис. 51. Антибиотики: А — хлорамфеникол; В — фузидиевая кислота; С — линкомицин; Д — клиндамицин.

Хлорамфеникол (левомицетин), синтезируемый *S. venezuelae*, антибиотик широкого спектра, оказывает только бактериостатическое действие, активен против спирохет, риккетсий, хламидий. У части пациентов вызывает апластическую анемию, поэтому рекомендован к применению только при отсутствии альтернативных средств. Его фторированные производные активны против резистентных микроорганизмов.

Фузидиевая кислота, выделяется из культуры гриба *Fusidium coccineum*, используемая в форме натриевой соли, активна против грамположительных бактерий, особенно стафилококков, хотя стрептококки относительно устойчивы. Действует на полирезистентные штаммы стафилококков, однако, и к этому препарату могут появляться устойчивые формы бактерий.

Линкомицины. Линкомицин (продуцент *S. lincolnensis*) и его синтетический аналог клиндамицин по спектру активности сходны с макролидами, однако, не эффективны в отношении *E. coli*. Применение клин-

дамицина сопряжено в риском чрезмерного размножения в кишечнике *Clostridium difficile* — возбудителя диарейной инфекции. Возможна перекрестная резистентность между линкомицинами и эритромицином.

8.1.9 Антифунгальные антибиотики

В отличие от большого разнообразия антибактериальных антибиотиков, имеется лишь небольшое количество антифунгальных антибиотиков для системного применения (рис. 52).

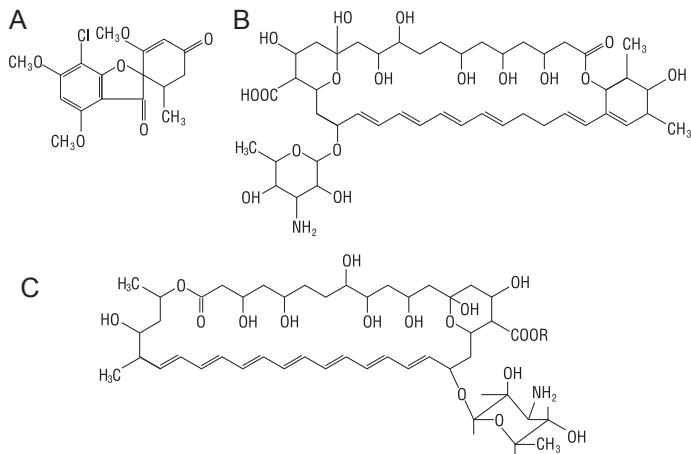


Рис. 52. Антифунгальные антибиотики: А — гризофульвин; Б — нистатин; С — амфотерицин В (R=H) и его метиловый эфир (R=CH₃).

Гризофульвин продуцируется *Penicillium griseofulvum*, активен против дерматофитов, не действует на *Candida spp.* и бактерии. Применяется орально в форме таблеток. Проникает в глубокие слои кожи и кератин волос, поэтому эффективен при терапии дерматомикозов.

Полиены. Полиеновые антибиотики продуцируются стрептомицетами, характеризуются наличием в своей структуре большого лактонного кольца и гидрофобной области, состоящей из последовательности от 4 до 7 конъюгированных двойных связей. Наиболее важные из них — амфотерицин В и нистатин.

Нистатин активен против *Candida spp.* и применяется при кандидозе ротовой полости и желудочно-кишечного тракта, поскольку плохо всасывается из кишечника и неэффективен при других формах кандидоза.

Амфотерицин В эффективен при системных мицозах. Плохо всасывается из кишечника, поэтому его вводят внутривенно под строгим медицинским контролем, учитывая его нефротоксичность. Метиловый эфир амфотерицина менее токсичен с сохранением антифунгальной активности.

Эхинокандины — новый класс антибиотиков, представленный многочисленными продуктами ферментации *Aspergillus nidulans* и *A. rugulosus* и их полусинтетическими аналогами. Активны против грибов рода *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis*. Это семейство

циклических липопептидов, различающихся боковыми радикалами (остатками жирных кислот) у гексапептидного кольца. Считают, что в ближайшем будущем они найдут клиническое применение.

8.1.10 Синтетические химиотерапевтические препараты

Сульфонамиды — большая группа химиотерапевтических веществ (рис. 53), действуют на стрептококки, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, обычно неактивны в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, индолположительных штаммов протея и *Klebsiella spp.* Резистентные штаммы появляются у *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria honorrhoea*, *N. meningitidis*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* и др.

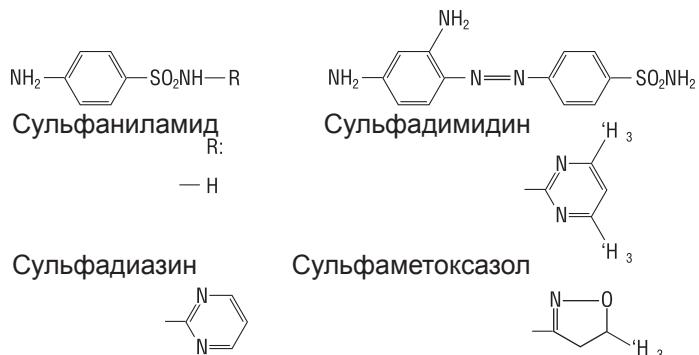


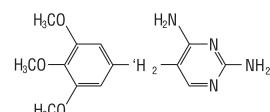
Рис. 53. Сульфонамиды.

Сульфонамиды различаются по способности всасываться из желудочно-кишечного тракта, например, сульфадимидин и сульфадиазин всасываются быстро, тогда как сукцинилсульфатиазон и фталилсульфатиазол — очень плохо.

Их используют при лечении различных инфекционных заболеваний, вызванных грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами.

Производные диаминопиримидина (рис. 54) составляют группу веществ с противоопухолевой (метотрексат), антипротозойной (пираметамин) и антибактериальной (триметоприм, тетроксоприм) активностью. Последние обладают широким спектром действия, однако, к ним появляются резистентные формы бактерий.

Триметоприм



Тетроксоприм

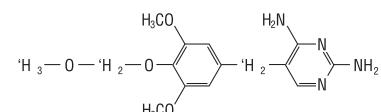


Рис. 54. Диаминобензилпиримидины.

Производные изоникотиновой кислоты (изониазид, этионамид, протионамид) как и парааминосалиловая кислота (рис. 55) эффективны против микобактерий, применяются при туберкулезе. Этиона-

мид менее активен, чем изониазид, однако действует на устойчивые к изониазиду штаммы бактерий. Протионамид по активности не отличается от этионамида, но лучше переносится больными.

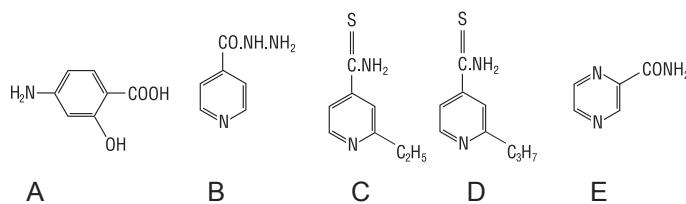


Рис. 55. Парааминосалициловая кислота (А); производные изоникотиновой кислоты: изониазид (В), этионамид (С), протионамид (Д) и пиразинамид (Е).

Пиразинкарбоновой кислоты амид – пиразинамид (рис. 55) действует на туберкулезные бактерии, устойчивые к другим противотуберкулезным препаратам.

Соединения нитрофурана. Синтезировано несколько сотен соединений нитрофурана, однако, терапевтическими свойствами обладают лишь немногие из них. При этом важное значение имеет наличие группы $-\text{CH}=\text{N}-$ у С-2 и нитрогруппы у С-5, менее существенно наличие $-\text{CH}=\text{CH}-$ у С-2. Биологическая активность утрачивается, если (а) редуцировано нитрокольцо, (б) гидролизована связь $-\text{CH}=\text{N}-$ или (в) окислена связь $-\text{CH}=\text{CH}-$.

Нитрофураны действуют на широкий спектр микроорганизмов. *Фуразолидон* высокоэффективен против энтеробактерий и применяется при лечении диареи и желудочно-кишечных расстройств бактериальной этиологии. *Нитрофурантион* используют при инфекции мочевыводящих путей, поскольку препарат концентрируется в моче. Он наиболее активен при кислом значении рН. *Нитрофуразон* в основном используют местно при обработке ран и ожогов, а также некоторых типов заболеваний уха.

Хинолоны. Налидиксовая кислота применялась некоторое время для лечения инфекций мочевого тракта. В дальнейшем были синтезированы другие, более активные производные 4-хинолона: ципрофлоксацин, норфлоксацин, оксолиновая кислота, офлоксацин, циноксацин и др. (рис. 56).

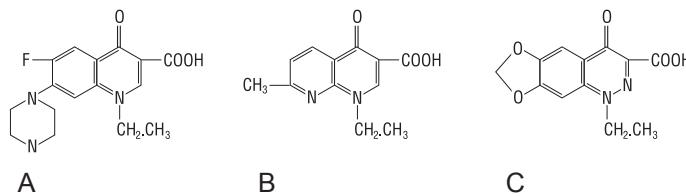


Рис. 56. Хинолоны: А — норфлоксацин, В — налидиксовая кислота, С — циноксацин.

Налидиксовая кислота действует только на грамотрицательные бактерии, тогда как новые производные активны также против стафилококков, но не стрептококков. Норфлоксацин обладает широким спектром действия, концентрируется в моче при оральном применении, что делает его перспективным средством при лечении инфекций мочевыводящей системы.

Производные имидазола (рис. 57). *Метронидазол* угнетает рост патогенных простейших, например, *Trichomonas vaginalis* и *Entamoeba histolyticum*. При оральном применении высокоэффективен при урогенитальных инфекциях, вызванных *T. vaginalis*. Эффективен против анаэробных бактерий и факультативных анаэробов в анаэробных, но не аэробных условиях. Вводится орально или в форме суппозиториев.

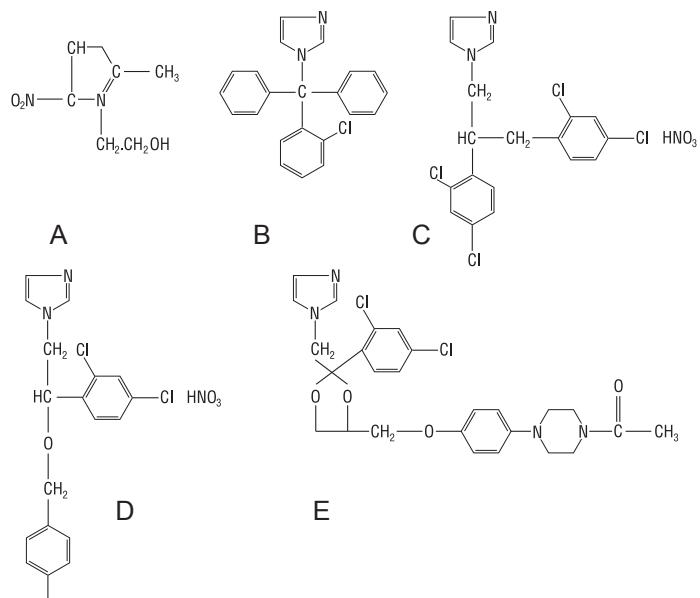


Рис. 57. Производные имидазола: А — метронидазол, В — клотриазол, С — миконазол, Д — эконазол, Е — кетоконазол.

Клотrimазол, миконазол, эконазол, кетоконазол активны против патогенных грибов и некоторых бактерий, применяются местно. Не отмечено развития резистентности *in vitro* или *in vivo*.

5-Фторцитозин (рис. 58) с наибольшей активностью действует на дрожжевые грибы — *Candida* и *Cryptococcus*.

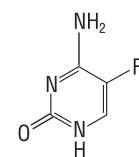


Рис. 58. 5-фторцитозин.

Глава 9. ПРОИЗВОДСТВО ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

9.1 Общие представления о промышленном производстве лекарственных препаратов

Промышленное производство лекарственных препаратов включает широкое использование машин, аппаратов, поточных механизированных и автоматизированных линий. Оно предусматривает массовый, серийный выпуск препаратов по стандартным прописям, рассчитанным на среднего потребителя.

Укрупненное фармацевтическое производство состоит из комплекса специализированных цехов. Цех — основное производственное подразделение, специализированное для выполнения однородных процессов (дробильный, экстракционный, фасовочный и т. д.) или для выпуска однотипной продукции (таблеточный, ампульный, аэрозольный и др.). Каждый цех имеет несколько участков, где осуществляются однотипные

операции, составляющие технологический процесс. Например, таблеточный цех имеет участки смешивания ингредиентов, гранулирования, сушки гранулята, прессования и др.

Работа промышленных предприятий характеризуется строгой регламентацией и планированием производства. Производственный процесс проводится в определенных стандартных условиях, предусмотренных точными инструкциями, объединенными в один сводный документ — *регламент*. Регламент представляет собой совокупность правил, определяющих порядок деятельности фармацевтического предприятия по выпуску готовой продукции. В нем дается характеристика исходных продуктов, полуфабрикатов и готового продукта, указаны последовательность стадий технологического процесса, режим обработки материалов по стадиям, аппаратурная схема, методы анализа, правила по технике безопасности, производственной



Рис. 59. Этапы получения продуктов микробиологического синтеза.

гигиене и другие условия производства. Регламент является законом производства, отступление от него недопустимо. За соблюдением регламента следит отдел технического контроля.

В фармацевтическом производстве *технологические процессы* подразделяются на химические, связанные с химическим синтезом лекарственных веществ и физические. К последним относятся механические, связанные с обработкой твердых материалов (измельчение, просеивание, смешивание, дозирование, прессование), гидромеханические (перемешивание жидкостей, эмульгирование, фильтрование), тепловые (испарение, конденсация, плавление), массообменные (растворение, кристаллизация, сушка, экстракция, ректификация). Все эти процессы требуют соответствующего аппаратурного оформления, т. е. выполняются с использованием специальных машин и аппаратов.

Основным исходным материалом для изготовления лекарственных препаратов являются *активные фармацевтические субстанции*, которые могут быть получены путем химического или биологического синтеза, а также путем переработки лекарственного растительного сырья или тканей и органов животных.

Лекарственные препараты имеют определенную лекарственную форму, т. е. удобное для применения состояние. Существуют твердые (порошки, таблетки, гранулы), жидкые (растворы, супспензии, эмульсии) и мягкие (мази, суппозитории) лекарственные формы. Этапы химического синтеза определенного лекарственного вещества могут включать процессы смешивания ингредиентов реакции, их термической обработки, экстракционного или хроматографического разделения продуктов реакции, упаривания, кристаллизации, сушки и т. п.

Основные этапы микробиологического синтеза антибиотиков, ферментов, органических кислот и т. п. показаны на схеме (рис. 59).

Из лекарственного растительного сырья готовят сборы, порошки, настойки, экстракты, а также получают максимально очищенные экстракционные препараты или препараты индивидуальных веществ.

Из животного сырья получают гормоны, ферменты и препараты неспецифического действия. Они могут представлять собой высушенные, обезжиренные и измельченные ткани или экстракты (максимально очищенные или препараты индивидуальных веществ).

В основу *гомеопатической фармации* положен принцип потенцирования (динамизации) — особая технология приготовления гомеопатических лекарств. Сущность этого принципа состоит в том, что процесс включает в себя поэтапное снижение концентрации исходного гомеопатического вещества в носителе (растворе или порошке) в 10 или 100 раз на каждом этапе путем интенсивного встряхивания, растирания и перемешивания. В результате получают препараты,

в которых содержание исходной субстанции снижено до ничтожных значений.

Для современной фармацевтической промышленности характерно непрерывное совершенствование и комплексное применение новых технологических подходов, основанных на понимании механизма действия и фармакологического эффекта лекарственного вещества и направленных к общей цели — созданию более эффективных и безопасных медицинских препаратов.

Современное фармацевтическое производство требует от персонала понимания смысла и значения каждой ступени технологического процесса и строгого контроля выполнения требований регламента. В связи с этим центральное место в общем направлении развития фармацевтической технологии наряду с химией и биотехнологией принадлежит микробиологии, научный поиск и развитие этих направлений определяют успех развития всей отрасли.

Существенная часть требований к качеству фармацевтической продукции и к условиям производства контролируется микробиологом: стерильность, микробная контаминация сырья и нестерильных лекарственных средств, соблюдение правил производственной гигиены, предусмотренных GMP. Эти требования должны быть хорошо известны всем участникам производственного процесса и неукоснительно соблюдаться с сознанием важности тщательного выполнения каждого из них.

С появлением фармацевтических препаратов, получаемых с использованием методов генетической инженерии, более 80% стерильных лекарственных форм готовят асептично, поскольку эти вещества лабильны и не могут быть простерилизованы в готовом виде. Лекарственные препараты, приготовленные с использованием асептичной технологии, превосходят по своему качеству препараты, производимые ранее.

Техникой работы в асептических условиях должны владеть не только микробиологи, но и химики, а также весь персонал, от которого зависит выпуск микробиологически безопасной продукции.

9.2 Производство антибиотиков

Получение препаратов антибиотиков — сложный и многоступенчатый процесс. Он слагается из комплекса последовательных исследований, которые можно свести в основном к следующим этапам:

1) изыскание микроорганизмов-антагонистов в природе и выделение их в чистую культуру;

2) изучение спектра действия и определение антибиотической активности выделенных культур антагонистов;

3) подбор условий культивирования производителей антибиотиков;

4) первичная идентификация антибиотика на ранних этапах изучения;

5) выделение и химическая очистка активно действующего начала из культуральной жидкости и клеток, а также сравнение полученного антибиотика по биологическим и химическим показателям с уже известными препаратами для выявления новых свойств полученных веществ;

6) изучение механизма действия и испытание токсических и лечебных качеств антибиотиков на животных;

7) разработка технологии получения антибиотика в лаборатории и внедрение ее в промышленное производство;

8) получение из исходных штаммов новых генотипов микроорганизмов, обладающих повышенной активностью, путем мутаций и рекомбинаций методами генетической и клеточной инженерии (рис. 60).

Для получения новых антибиотиков помимо изыскания новых или генетически измененных продуцентов используют следующие методические подходы:

1) получение из исходного антибиотика препарата с новыми свойствами путем химической или биохимической модификации его молекулы;

2) направленный биосинтез путем биохимической модификации структуры, полученной химическим методом;

3) химический синтез с использованием природных структур в качестве шаблонов;

4) мутасинтез. Этот метод включает следующие этапы:

а) получение мутантов — идиотрофов, требующих для образования антибиотика определенный фрагмент его молекулы (предшественник);

б) получение химическими методами аналога этого предшественника (мутасинтона);

в) культивирование идиотрофа на среде, содержащей мутасинтон. При этом идиотроф включает мутасинтон в молекулу продуцируемого им антибиотика. В результате получаются новые (мутасинтетические) структуры.

5) Получение гибридных антибиотиков, т.е. веществ, продуцируемых генетическими гибридами; гибридный антибиотик может содержать структуры двух различных метаболитов. От антибиотиков, получаемых перечисленными выше методами, они отличаются тем, что представляют собой продукт комбинации генов.

Основные этапы получения гибридных антибиотиков:

а) выбор продуцента, образующего известный антибиотик;

б) изыскание нового микроорганизма для гибридизации;

в) исследование биохимических путей синтеза антибиотика, интермедиатов и ферментов;

г) определение генов, контролирующих образование ферментов биосинтеза и его регуляторов;

д) получение рекомбинантной ДНК, содержащей комбинацию генов, благоприятную для процесса биосинтеза;

е) клонирование новой генетической структуры в культуре реципиента;

ж) химическое, микробиологическое и фармакологическое исследование нового антибиотика.

Природные антибиотики получают путем культивирования микроорганизма — продуцента с использованием методов биотехнологии. По объему выпускаемых антибиотиков антибиотическая промышленность является самым крупным биотехнологическим производством.

Цель любой биотехнологии — на базе понимания физиологических и генетических свойств продуцента

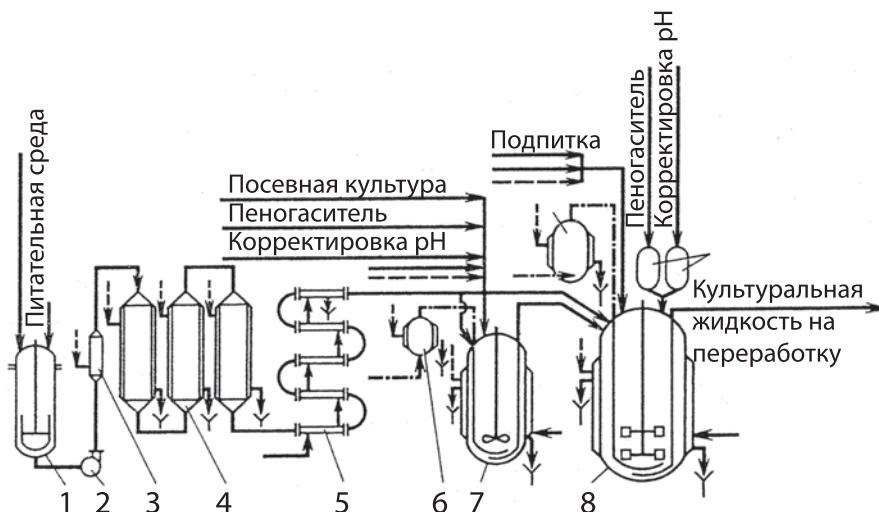


Рис. 60. Аппаратно-технологическая схема периодического культивирования микроорганизмов в стерильных условиях: 1 — реактор для приготовления питательной среды; 2 — насос; 3 — нагреватель среды — стерилизационная колонка; 4 — выдерживатель; 5 — охладитель среды; 6 — индивидуальный фильтр воздуха; 7 — посевной ферментатор; 8 — рабочий ферментатор; 9 — мерник. вода; ----- пар; воздух

получить максимальный выход конечного продукта. Необходимые для этого биотехнологические манипуляции реализуются в соответствующей аппаратуре (рис. 60). Управление процессами метаболизма продуцента может осуществляться следующими способами:

- 1) изменением состава питательной среды;
- 2) изменением условий внешней среды (температура, pH, аэрация);
- 3) конструкцией биореактора (ферментера);
- 4) регламентированием введения дополнительного субстрата;
- 5) фиксацией физиологического состояния культуры применением метода непрерывного культивирования;
- 6) использованием генетически модифицированных штаммов продуцента.

Реализация этих способов требует специальных инженерно-технологических подходов, обеспечивающих биохимическую регуляцию биосинтеза при сохранении свойств популяции продуцента (отсутствие повреждений клеток, автолиза, инфекции и др.).

Ферментация антибиотиков (рис. 61), как правило, аэробный процесс, требующий подачи воздуха в ферментационную среду и перемешивания.

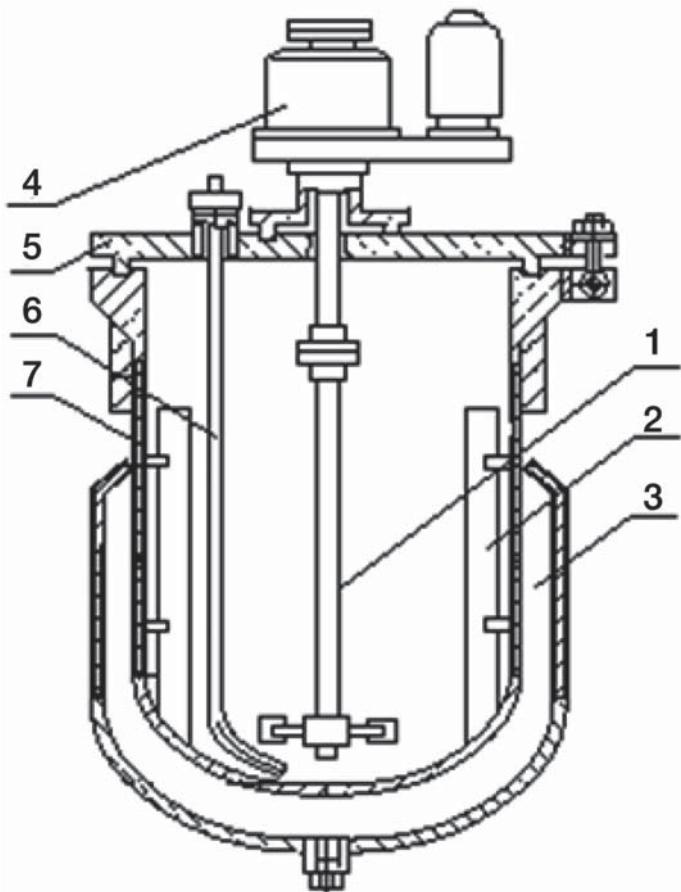


Рис. 61. Ферментатор. 1 — мешалка одноярусная; 2 — отражательная перегородка; 3 — рубашка; 4 — привод мешалки; 5 — крышка; 6 — труба для подачи воздуха (барботер); 7 — корпус.

В антибиотической промышленности преимущественно применяют биореакторы объемом от 30 до 200 м³ с механической мешалкой, снабженные системой автоматического контроля и управления процессом ферментации. Температуру ферментации (обычно 24-26°C) обеспечивает система охлаждения. После ферментации биомассу отделяют, антибиотик выделяют из фильтрата (для некоторых антибиотиков — из клеток продуцента) путем экстракции, ионообмена, ультрафильтрации, осаждения и кристаллизации. Процесс подготовки посевного материала, ферментации и многие из дальнейших операций проводят в асептических условиях.

Культура продуцента. Исходный штамм микроба, производящего антибиотик или другие БАВ, выделяют из природных источников (почва, растительные субстраты и др.) специальными методами скрининга; природный (дикий) штамм обладает низкой активностью, поэтому требуется длительная генетико-селекционная работа, обычно с применением мутагенов для повышения его активности. Полученный производственный штамм хранится в состоянии анабиоза (например, при низкой температуре в лиофилизированном состоянии). Такая культура может быть возвращена в активное состояние путем посева на соответствующую питательную среду и использована для приготовления посевного материала.

Приготовление посевного материала. Культуру с поверхности скошенного агара асептично переносят в колбу с посевной средой. При работе с грибами и актиномицетами используют споровый посевной материал (500-5000 спор на 1 л среды). Колбы инкубируют в термостате на качалке. Материал из колб переносят в инокулятор объемом 0,5-1 м³ (0,1% посевного материала от объема среды) и выращивают 1-4 суток. Далее посевной материал асептично переносят в посевной ферментатор объемом 5-20 м³ (10-12% инокулята от объема питательной среды, время культивирования от 1 суток.). Постоянно отбирают пробы для микробиологического и биохимического анализа. Посевной материал для главной ферментации готовят в количестве 5-10% от объема питательной среды. Ступенчатая подготовка посевного материала позволяет получить его в количестве, необходимом для обеспечения быстрого и продуктивного роста в биореакторе, и поддерживает культуру в фазе логарифмического роста.

Питательная среда конструируется, таким образом, чтобы обеспечить быстрый рост микроорганизма в начальной стадии и максимальный выход продукта в конце ферментации. Среду стерилизуют паром под давлением при 120-140°C непосредственно в ферментаторе или в специальной установке непрерывной стерилизации.

Ферментация. Схема промышленного периодического процесса показана на рис. 61. Ферментер и си-

систему трубопроводов перед заполнением средой моют, проверяют на герметичность и стерилизуют острым паром. Для обеспечения стерильности часто применяют предварительную обработку ферментера химическими дезинфицирующими веществами.

Количество стерильной охлажденной питательной среды в ферментере не должно превышать 70% от его объема. Через линию посевного материала с помощью стерильного воздуха в ферментатор вводят посевной материал. Температура и pH питательной среды до подачи посевного материала должны быть доведены до оптимальных значений для данной культуры.

Ферментацию проводят при аэрации (аэробный процесс) путем подачи стерильного воздуха или без подачи воздуха (анаэробный процесс) и перемешивании, которое способствует растворению кислорода в жидкой среде и полному контакту клеток с питательными веществами. Для предотвращения попадания нестерильного атмосферного воздуха в аппарат давление воздуха над поверхностью жидкости повышают

до 20-30 кПа (0,2-0,3 кгс/см²). При необходимости вводят химические пеногасители.

Во время ферментации автоматически регулируются температура и pH среды, по специальной программе вводятся добавочные компоненты питательной среды. Систематически берут контрольные пробы жидкости из ферментатора, в которых определяют необходимые физико-химические показатели, активность и отсутствие посторонних микроорганизмов.

Ферментацию прекращают, когда в среде накапливается максимальное количество полезного продукта. По окончании ферментации культуральную жидкость охлаждают до 10-25°C и перекачивают в резервуары, из которых она подается на дальнейшую обработку.

Способы выделения и очистки антибиотиков индивидуальны и определяются его физико-химическими характеристиками. Например, пенициллин выделяют из культуральной жидкости экстракционным методом (бутилацетатная экстракция), стрептомицин и тетрациклин — методом ионообменной хроматографии.

Глава 10. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

10.1 Рекомбинантные ДНК

Генетическая инженерия или технология рекомбинантной ДНК основана на конструировании фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением новых (рекомбинантных) генетических структур в живую клетку и их экспрессией. Техника генетической инженерии используется при исследовании строения генов организмов, разработке методов генной терапии, методов молекулярной диагностики. Технологию рекомбинантной ДНК используют для создания новых продуцентов антибиотиков, производящих антимикробные препараты с измененными свойствами. Генетическая инженерия дает возможность получать препараты крови от трансгенных животных, производить белки человека путем культивирования рекомбинантных штаммов микроорганизмов (табл. 20).

10.2 Методы генетического конструирования микроорганизмов *in vitro*

Типовой эксперимент в генетической инженерии состоит из следующих этапов:

1) получение фрагментов ДНК; 2) конструирование *in vitro* рекомбинантных молекул ДНК, состоящих

из фрагментов, полученных на первом этапе, и векторов — небольших автономно реплицирующихся в клетке-реципиенте структур (плазмид, фагов, вирусов); 3) введение рекомбинантных ДНК в клетку-реципиент; 4) отбор клонов, несущих нужную рекомбинантную ДНК (рис. 62).

10.3 Источники ДНК для клонирования

Существуют три источника молекул ДНК, используемых в генетической инженерии: фрагменты генетического материала различных организмов; двунитевые ДНК, полученные на основе однонитевой ДНК, комплементарной мРНК (кДНК); ДНК, полученная путем химико-ферментативного синтеза. Получение кДНК необходимо для экспрессии в бактериях генов белков человека: гены эукариот содержат интраны, а в клетках бактерий отсутствует механизм, обеспечивающий сплайсинг, поэтому применяют специальные приемы для получения ДНК, состоящей из последовательностей нуклеотидов, соответствующих экзонам.

Для синтеза кДНК в качестве матрицы используют зрелую мРНК (не содержащую интранов), которую предварительно полиаденилируют (рис. 63). Далее ее отжигают с олиго-*dT*, который служит затравкой при копировании нити обратной транскриптазой. От-

Рекомбинантные белки – коммерческие и проходящие клинические испытания препараты

Таблица 20.

Белок	Система экспрессии	Показания к применению
Инсулин	<i>E. coli</i>	Диабет
Соматотропин	<i>E. coli</i>	Гипофизарная карликовость, остеопороз
Интерферон α_2	<i>E. coli</i>	Лейкемия, профилактика простудных заболеваний
Интерферон γ	<i>E. coli</i>	Опухолевые и вирусные заболевания
Активатор тканевого плазминогена	<i>E. coli</i> , дрожжи, клетки животных	Тромбоз
α_1 -антитрипсин	<i>E. coli</i> , дрожжи	Эмфизема
Интерлейкин-2	<i>E. coli</i> , дрожжи, клетки животных	Опухолевые заболевания
Фактор некроза опухоли	<i>E. coli</i> , клетки животных	Опухолевые заболевания
Сывороточный альбумин человека	дрожжи	Плазмозаместительная терапия
Фактор VIII	клетки животных	Гемофилия
Фактор IX	то же	Болезнь Кристмаса
Эритропоэтин	то же	Анемия
Поверхностный антиген вируса гепатита В	дрожжи, клетки животных	Вакцинация

жиг — это процесс реассоциации ДНК с образованием водородных связей между парами оснований. После обработки обратной транскриптазой мРНК удаляют щелочным гидролизом. Образовавшаяся кДНК имеет на 3'-конце шпилечную структуру, которая может служить затравкой при построении второй нити ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Для удаления олиго-*dT* и однонитевой петли используют *SI*-нуклеазу, расщепляющую однонитевую ДНК.

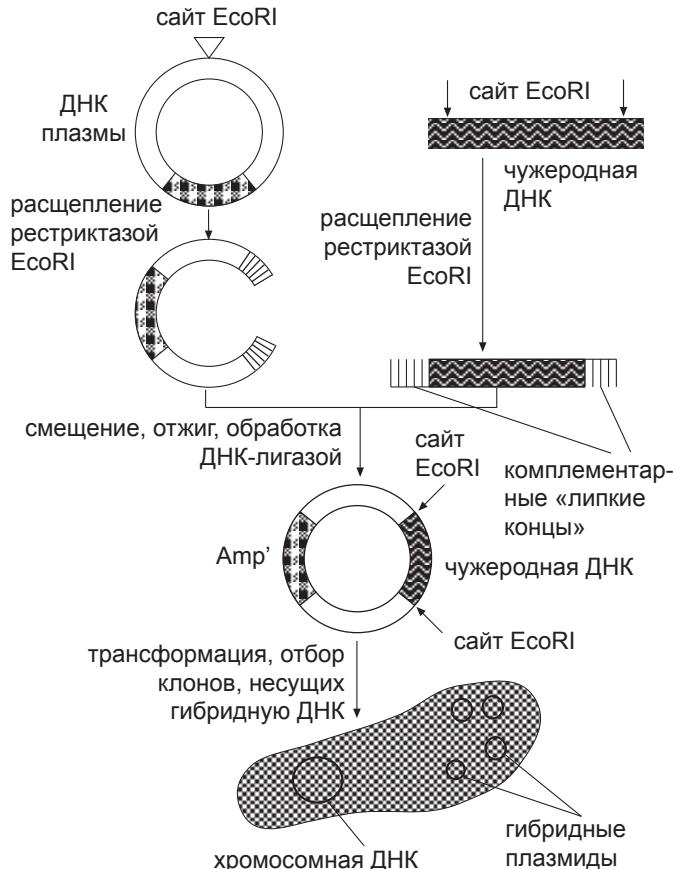


Рис. 62. Схема типового опыта по генной инженерии: Amp' — устойчивость к ампицилину — генетический маркер плазмиды.

10.4 Рестриктазы

Ферменты рестриктазы являются необходимым инструментом при манипулировании с генами. Это специфические эндонуклеазы, которые являются составной частью системы рестрикции — модификации прокариотических клеток. Эта система связана с защищенной клеток от проникновения чужеродной ДНК. Система модификации осуществляет метилирование собственной ДНК немедленно после репликации. Чужеродную ДНК, проникающую в клетки, бактерии гидролизуют с помощью рестриктаз. Эти эндонуклеазы связываются с ДНК в определенных участках (сайты узнавания) и расщепляют ее на фрагменты (рестрикты). Собственную ДНК рестриктазы не разрушают, поскольку ее сайты узнавания метилированы. Системы рестрикции-модификации обнаружены у всех исследованных бактерий и у некоторых дрожжей.

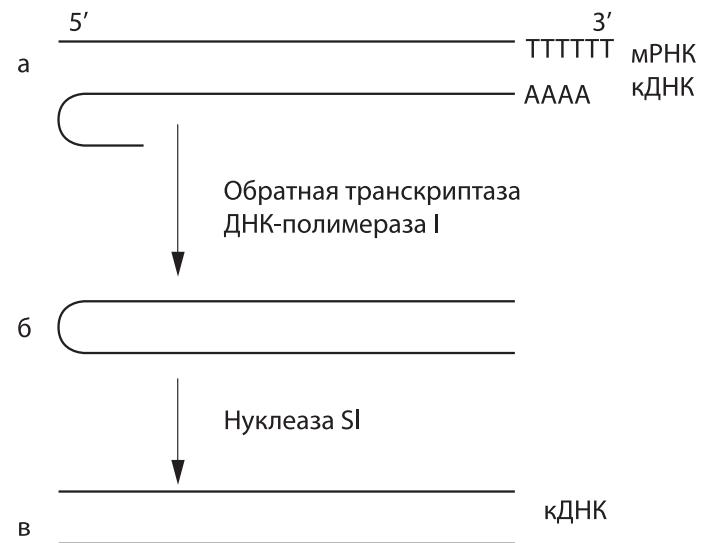


Рис. 63. Схема синтеза двуцепочечной кДНК на мРНК.

Различают три основных класса рестриктаз. Все они узнают на двусpirальной ДНК строго определенные последовательности нуклеотидов. Однако рестриктазы класса I разрывают молекул ДНК в произвольных точках, а классов II и III — в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии. Ферменты классов I и III имеют сложную субъединичную структуру и обладают двумя типами активностей — метилирующей и эндонуклеазной. Ферменты II класса состоят из двух отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы. По этим причинам в генетической инженерии используют исключительно рестриктазы класса II.

Существует общепринятая номенклатура, в соответствии с которой рестриктазы и метилазы обозначаются, соответственно, буквами R и M. Название фермента складывается из первой буквы рода и двух первых букв вида бактерии, из которой он был выделен, например, *Bacillus subtilis* — *Bsu*, *Escherichia coli* — *Eco*. При необходимости дается типовая характеристика штамма, например, *Hinc* — фермент из *Haemophilus influenzae*, серотип С. Если в определенном штамме бактерии имеется несколько систем рестрикции, дается дополнительно цифровое обозначение. Если фермент закодирован в генах плазмиды или фага, к названию фермента добавляется название внекромосомного элемента: *EcoRI*, *EcoPI* — ферменты *E. coli*, кодируемые плазмидой *RI* и фагом *PI*, соответственно.

В табл. 21 приведена характеристика некоторых рестриктаз, используемых в генетической инженерии. Разрывы цепей ДНК могут происходить по оси симметрии, и тогда образуются фрагменты с тупыми концами (например, рестриктаза *BamI*), либо на некотором расстоянии от оси, и тогда образуются фрагменты с однонитевыми липкими 5' (рестриктазы *EcoRI*) или 3' (рестриктазы *PstI*) концами.

Рестриктазы, используемые в генной инженерии.

Таблица 21.

Обозначение рестриктазы	Последовательность, узнаваемая рестриктазой	Обозначение рестриктазы	Последовательность, узнаваемая рестриктазой
1	2	3	4
EcoRI	G AATTC	Xho I	C TCGAG
	CTTAA G		GAGCT C
Hind III	AAGCTT	Hind II	GPyC GPuC
	TTCGAA		CPuG CPyG
1	2	3	4

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз класса II, однако среди них имеются ферменты, которые узнают в ДНК одни и те же последовательности. Такие группы называют изоизомерами. Различают истинную изоизомерию, когда ферменты узнают одну и ту же последовательность нуклеотидов и разрывают ДНК в одинаковых точках, и ложную, когда ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта.

Если предположить, что участки распознавания расположены в цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов, узнающих сайт из четырех нуклеотидов, должна встречаться в среднем один раз через каждые 256 по (пар оснований), а для ферментов, узнающих лишь шесть нуклеотидов — через 4096 по. Очевидно, что если сайт рестрикции окажется внутри гена, обработка рестриктазой приведет к его инактивации. Вероятность такого события очень велика при использовании мелкощепящих рестриктаз и значительна — при употреблении крупнощепящих (узнающих шестерки нуклеотидов). Поэтому для получения неповрежденного гена проводят обработку поочередно несколькими крупнощепящими рестриктазами, либо применяют прием недорестрикции, т. е. обработку в таких условиях, когда происходит расщепление лишь в одном сайте из нескольких возможных.

Особую ценность представляют рестриктазы, под действием которых образуются фрагменты с самокомплементарными липкими концами: они эффективно используются при конструировании рекомбинантных молекул.

10.5 Методы воссоединения фрагментов ДНК

Для соединения фрагментов ДНК, полученных после обработки рестриктазой, используют *отжиг*, в результате которого образуются водородные связи между комплементарными основаниями липких концов, с последующей обработкой ДНК-лигазой. Лигаза катализирует образование фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами. Наличие липких концов не является обязательным условием для воссоединения фрагментов ДНК-лигазой. Имеются фер-

менты, способные соединять полностью двунитевые фрагменты, однако эта реакция протекает лишь при высоких концентрациях ДНК и лигазы [27].

При объединении ДНК донора и вектора при отжиге и лигировании образуются не только гибридные молекулы, но и исходные векторы, что затрудняет дальнейшую работу по клонированию ДНК донора. Поэтому разработаны специальные методы, позволяющие направить процесс преимущественно на получение гибридных молекул. Один из них основан на расщеплении ДНК вектора несколькими рестриктазами, чтобы уменьшить вероятность самосборки вектора. Другой эффективный метод заключается в отщеплении концевых фосфатных групп от линейной ДНК вектора при действии щелочной фосфатазы. Образование лигазой кольцевых молекул ДНК в этом случае возможно только в присутствии фрагментов донорной ДНК, имеющих неповрежденные 5'-фосфатные группы. (рис. 64)

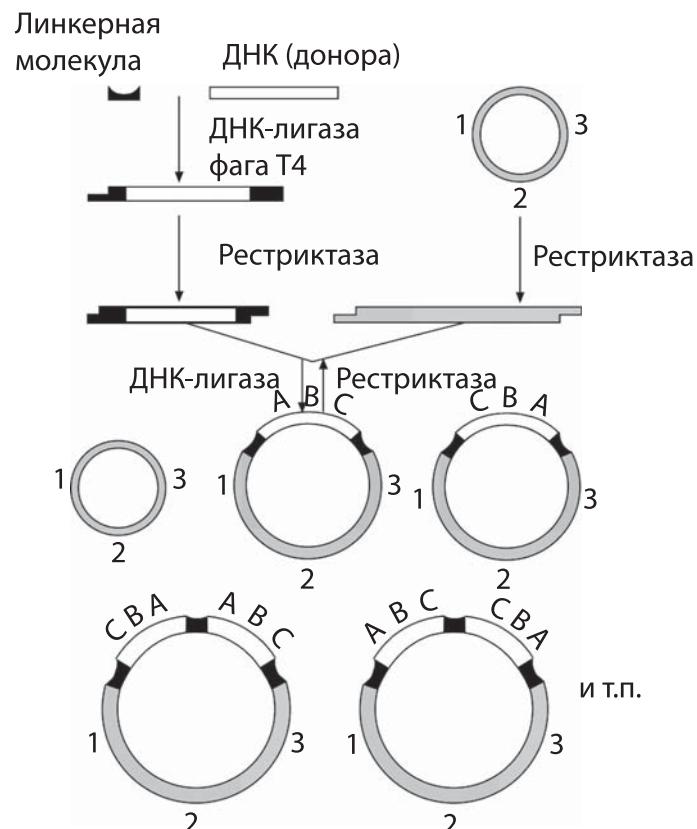


Рис. 64. Схема использования линкерных молекул для конструирования гибридных ДНК. [27].

Идентичные взаимокомплементарные концы двух молекул ДНК, подлежащих объединению, могут быть получены при гидролизе этих молекул одной и той же рестриктазой. Однако часто возникает необходимость клонировать фрагменты ДНК, полученные расщеплением одной рестриктазой, в векторе, имеющем сайт расщепления для другой рестриктазы. Для этого существует метод, позволяющий рекомбинировать практически любые фрагменты ДНК. Он предусматривает использование линкеров — коротких синтетических

двуцепочечных олигонуклеотидов, имеющих сайты узнавания для определенной рестриктазы. Линкеры пришивают с помощью лигазы по концам молекулы ДНК, подлежащей клонированию, и обрабатывают рестриктазой, в результате чего образуются липкие концы. Этой же рестриктазой гидролизуют молекулу вектора. В результате отжига и обработки лигазой получают рекомбинантные молекулы ДНК. Линкерная молекула может иметь больше, чем один сайт узнавания рестриктазой. Тогда ее называют полилинкером или адаптером. Применение таких молекул делает рестриктазно-лигазный метод рекомбинации ДНК универсальным, поскольку исходные фрагменты можно получить самыми различными способами.

Коннекторный метод воссоединения фрагментов основан на свойстве фермента — терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы — достраивать нуклеотидные последовательности к 3'-ОН-концам фрагментов ДНК. К концам одного из соединяемых фрагментов ДНК присоединяют однонитевой полинуклеотид, например, поли-А (dA), а к концам другого — комплементарный ему, например, поли-Т (dT). Достроенные таким образом фрагменты смешивают и отжигают. Возможные бреши ликвидируют обработкой ДНК-полимеразой и лигазой, в результате чего получают ковалентно замкнутые кольцевые молекулы.

10.6 Векторы

Векторами называют молекулы ДНК, способные переносить в клетку-реципиент чужеродную ДНК и обеспечить ее экспрессию. В векторные молекулы с помощью ферментов встраивают определенные гены. Такие молекулярные гибриды называются химерами или рекомбинантными молекулами ДНК. Их вводят в реципиентные клетки, в результате чего происходит разделение молекул. Каждый из выделенных клонов содержит индивидуальную рекомбинантную ДНК. Эта процедура называется клонированием рекомбинантных молекул ДНК (клонированием генов).

Чтобы стабильно существовать в клетке, вектор должен быть репликоном (автономно реплицируясь в клетке). Вектор должен иметь один или несколько маркеров, позволяющих фенотипически определять его присутствие в клетке-реципиенте. Для обеспечения воссоединения с ДНК донора в векторной молекуле необходимо присутствие сайтов расщепления рестриктазами, которые должны локализоваться в области, не существенной для репликации вектора. Кроме того важно, чтобы вектор допускал вставку донорной ДНК различной молекулярной массы и давал большое число копий на клетку, что облегчает выделение и очистку рекомбинантной ДНК. Лучше всего разработана система векторов для *E. coli* в качестве реципиента. Она включает следующие типы векторов:

плазмида, бактериофаг λ , космиды, фазмиды и бактериофаг M13.

Созданы векторы и для других микроорганизмов, в том числе важных для промышленности (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* и др.). Особенно удобны двурепликонные (челночные) гибридные векторы, системы репликации которых принадлежат плазмидам, имеющим разных хозяев. Они способны реплицироваться в различных клетках, например, в *E. coli*, дрожжей или животных. Это позволяет все предварительные операции по клонированию проводить в *E. coli* с последующим перенесением рекомбинантной ДНК в нужный объект.

10.6.1 Плазмида

Плазмида — это внекромосомные генетические элементы, которые существуют обычно в виде замкнутых кольцевых суперспиральных молекул ДНК (рис. 62). В качестве векторов используют чаще всего небольшие плазмиды размером 2-10 тпн. Плазмида содержит специальный участок инициации репликации (*ori*).

В качестве маркеров плазмида может содержать гены, определяющие устойчивость бактерии к антибиотикам. Вставка чужеродного (донорного) гена в маркерный ген приводит к инактивации последнего. Это позволяет отличить трансформированные клетки, получившие векторную плазмиду (утратившие устойчивость к антибиотику), от клеток, получивших рекомбинантную молекулу (сохранившие устойчивость). Этот прием называется инактивацией маркера в результате вставки.

Созданы векторы, позволяющие производить прямой отбор клонов, несущих гибридные молекулы. Для этого используют гены, ответственные за гибель клеток в определенных условиях или кодирующие синтез фермента, определяющего окраску колонии на селективной среде. Клонирование чужеродной ДНК в таком гене приводит к его инактивации, что проявляется в фенотипе.

Недостатком многих плазмид является снижение выхода рекомбинантов с ростом молекулярной массы вставки. Поэтому клонирование в плазмидах фрагментов ДНК, превышающих 10 тпн малоэффективно.

Плазмида вводят в бактериальные клетки методом трансформации. В трансформации участвует одна из 1000-10000 молекул ДНК.

10.6.2 Векторы на основе бактериофага λ

Геном фага λ представлен двуцепочечной ДНК, размером 48,5 тпн, которая упакована в головку фага в виде линейной молекулы с липкими концами длиной 12 нм. В клетке хозяина (*E. coli*) липкие концы объединяются и ДНК замыкается в кольцо. Возможность создания векторов на основе фага λ связана с тем, что

гены центральной части несущественны для литического развития и могут быть замещены фрагментами чужеродной ДНК. Рекомбинантная ДНК может быть упакована в капсид *in vitro*, поэтому ее вводят в клетку хозяина методом инфекции (трансдукции), что намного эффективнее трансформации (инфекционной становится каждая десятая молекула ДНК). В капсид пакуется ДНК определенного размера — не выше 53 и не ниже 38 тп, поэтому фаговые векторы имеют верхний и нижний пределы размеров клонируемых фрагментов ДНК.

Векторы на основе фага λ удобны для создания клонотек (банка генов), но не для тонких манипуляций с фрагментами ДНК. Для детального изучения и преобразования фрагменты ДНК переклонируют в плазмины.

10.6.3 Космиды

Космиды — это плазмины, несущие cos-участок (комплементарные липкие концы) ДНК фага λ . Наличие cos-участка позволяет производить упаковку ДНК в головку фага *in vitro*, поэтому они могут быть введены в клетку путем инфекции, а не трансформации. В космидных векторах можно клонировать фрагменты чужеродной ДНК размером от 33 до 49 тп. Космиды — векторы с наибольшей емкостью, поэтому они специально предназначены для клонирования больших фрагментов эукариотической ДНК и создания клонотек геномов.

10.6.4 Фазмиды

Фазмидами называют гибриды между фагами и плазмидами, способные развиваться как фаг и как плазмида. По клонирующей емкости фазмиды сравнимы с векторами на основе фага λ и значительно уступают космидам. Однако регулируемая возможность развития по фаговому или плазмидному пути дает им ряд преимуществ, главное из которых — относительная простота комплементационного анализа и реорганизации фрагментов ДНК. Фазмиды дают возможность отказаться от переклонирования генов из фаговых в плазмидные векторы.

10.6.5 Векторы на основе бактериофагов, содержащих одноцепочечную ДНК

Лучшие векторы такого типа разработаны на основе фага M13. Фаговая частица содержит одноцепочечную ДНК длиной 6500 нуклеотидов. После проникновения в клетку хозяина ДНК превращается в двухцепочечную репликативную форму (РФ), которую выделяют из клеток и используют как вектор. В инфицированной клетке накапливается 100-200 копий РФ ДНК. После этого синтез становится асимметричным и синтезируется лишь одна нить ДНК, которая входит в состав зрелого фага. Фаг M13 не убивает

клетку, а лишь замедляет ее развитие. Частицы зрелого фага непрерывно выделяются в среду и их титр может достигать 10^{12} в 1 мл.

Основное преимущество фага M13 как вектора заключается в том, что выделяемые клеткой частицы бактериофага содержат одноцепочечную ДНК, гомологичную одной из двух комплементарных цепей клонируемой ДНК. Такая ДНК может быть непосредственно использована для определения последовательности оснований ДНК (секвенирование).

10.6.6 Клетка-реципиент

Клетка-хозяин — это та среда, в которой может функционировать рекомбинантная молекула ДНК. В качестве реципиента рекомбинантной ДНК часто используют *E. coli* — микроорганизм, хорошо изученный и применяющийся в разнообразных исследованиях в области генетики и молекулярной биологии. Но для целей биотехнологии *E. coli* не представляется идеальным продуцентом по следующим причинам. *E. coli* входит в состав нормальной микробиоты человека, поэтому опасно заражение обслуживающего персонала рекомбинантным штаммом с нежелательными для человека свойствами. Помимо этого *E. coli* чувствительна к фагам, образует пирогены и не выделяет продукты биосинтеза в культуральную среду, что затрудняет их очистку. Поэтому перспективны другие микроорганизмы — бациллы (*Bac. subtilis*, *Bac. stearothermophilus*, *Bac. brevis*), стрептомицеты, дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*). Используют также культуры клеток млекопитающих, которые дают продукты, аналогичные природным, что полезно при получении препаратов человеческого белка. Однако широкому применению подобных реципиентов препятствуют трудности их культивирования (медленный рост, высокая стоимость питательных сред, опасность бактериальной и вирусной контаминации).

10.7 Введение молекул ДНК в клетки

Система клонирования состоит из двух компонентов — вектора и реципиентных клеток. Реципиентные клетки служат для выделения из смеси нужного типа рекомбинантных молекул, для последующей идентификации клонируемых генов и получения генов или их продуктов. В качестве реципиентных используют *пермиссивные* клетки, т. е. клетки, обеспечивающие репликацию рекомбинантной ДНК.

Способ введения ДНК в клетки определяется природой вектора. Плазмидные векторы вводят путем трансформации, фаговые — путем трансфекции или трансдукции. Возможна также передача ДНК путем конъюгации.

Трансфекция — это процесс, при котором фаговая ДНК поступает в бактериальные клетки с последующим образованием вирусного потомства. Вирусные

клоны, полученные в результате трансфекции называются трансфектантами. Их выделяют из негативных колоний после высеяния реципиентных клеток на газон культуры, чувствительной к данному фагу.

Трансформация — это процесс генетической рекомбинации, при котором чужеродная ДНК поступает в клетку-реципиент. Генетически трансформированные клетки называют трансформантами. Клетки, способные адсорбировать и поглощать ДНК, называются *компетентными*. Количество компетентных клеток в популяции зависит от видовой принадлежности микроорганизма, условий его культивирования, стадии развития и т. п. Компетентные клетки отличаются изменением свойств клеточной оболочки, у них снижен поверхностный заряд, повышена чувствительность к осмотическому шоку. Последнее связано с тем, что у компетентных клеток *частично обнажены* участки цитоплазматической мембраны, которая принимает непосредственное участие в адсорбции и поглощении ДНК. Особая роль в этих процессах принадлежит мезосомам и *трансформасомам* — производным цитоплазматической мембраны, участвующим в переносе ДНК в цитоплазму.

Компетентность можно повысить или индуцировать ее у микроорганизмов, лишенных естественной компетентности, путем специальной обработки клеток. Широко применяется метод индукции компетентности у *E. coli* с помощью ионов кальция. Клетки выдерживают в присутствии 50 мМ Ca^{2+} при 0°C с последующим кратковременным тепловым воздействием при 37 или 42°C. В этих условиях возникает состояние общей компетентности и возможность трансформации и трансфекции. Эффективно также совместное воздействие ионов Ca^{2+} с Mg^{2+} , Mn^{2+} и Rb^+ , индуцирующее компетентность у многих грамотрицательных и грамположительных бактерий. Клетки дрожжей и мицелиальных грибов становятся компетентными после обработки их солями лития. К физическим методам индукции компетентности относятся их глубокое замораживание (-196°C) и оттаивание ($+42^\circ\text{C}$), а также электропорация. Суть последнего метода заключается в том, что кратковременное воздействие (5-20 мс) электрического поля высокой напряженности (1-15 кВ/см) на клеточную мембрану приводит к образованию в ней пор (электропробой), достаточных для проникновения ДНК в клетку.

Эффективно использование для трансформации и трансфекции протопластов и сферопластов.

10.8 Методы идентификации клонов, содержащих рекомбинантные молекулы

В большинстве экспериментов по молекулярному клонированию в результате действия рестриктаз получается сложная смесь фрагментов ДНК. Существуют специальные приемы, позволяющие отобрать клоны,

содержащие рекомбинантные молекулы ДНК. Например, при использовании фазмид, дают урожай исключительно фаговые частицы, в головки которых пакуются рекомбинантные молекулы. При применении плазмид отбирают клоны с рекомбинантными ДНК по инактивации одного из маркеров вектора и т. д. Следующая, более трудная задача состоит в том, чтобы найти среди рекомбинантов клон, несущий нужный исследователю ген.

Методы скрининга рекомбинантных клонов могут быть основаны на изменении фенотипа клетки под влиянием вновь синтезированного продукта рекомбинантного гена, либо на свойствах самого продукта. Одним из таких приемов является *тест на комплементацию*, который применяется в том случае, когда клонируемый ген обеспечивает комплементацию мутаций генома клетки, например, ее переход из ауксотрофного в прототрофное состояние. При этом гибрид может быть обнаружен простым отбором на селективной среде.

Если продукт гена, т. е. белок, вырабатывается в достаточных количествах, возможен отбор нужного клона иммунологическим методом. Метод прямой радиоиммунологической детекции колоний заключается в следующем. Колонии клеток лизируют на поверхности агара, затем отпечатывают на поливиниловую пластинку, на которой адсорбированы антитела к белку искомого гена. Далее эту пластинку обрабатывают антителами, меченными I^{125} . Так образуется комплекс белка-антисera с двумя молекулами антител, одна из которых присоединена к пластинке, а другая мечена йодом. Образование комплекса тестируется радиоавтографически. Метод очень чувствителен и дает положительный ответ при наличии в клетке всего одной или нескольких молекул белка.

При отсутствии экспрессии гена в клетках реципиента клоны могут быть идентифицированы по первичной структуре ДНК или по характеру белка, синтезированного в подходящей системе (ооциты лягушки, бесклеточные экстракты). Тестирование первичной структуры ДНК осуществляется гибридизацией с меченою мРНК.

Используя метод гибридизационной селекции, денатурируют плавлением клонированную ДНК, иммобилизуют ее на твердой поверхности и гибридизуют с мРНК. Дуплекс ДНК — РНК нагревают для освобождения мРНК, которую затем добавляют в бесклеточную белок синтезирующую систему или вводят в ооциты лягушки для трансляции. Продукты трансляции идентифицируют по биологической активности или иммунологическим методам.

Если известна первичная структура гена или кодируемого им белка, для скрининга клонов можно использовать синтетические олигонуклеотиды — зонды, комплементарные искомому гену. Зонды имеют радиоактивную метку, которая позволяет обнаружить

их присутствие при связывании с искомым фрагментом ДНК.

10.9 Клеточная инженерия

Клеточная инженерия — это важный раздел новой биотехнологии, объектами манипулирования которой являются культуры клеток растений, животных, человека, а также клетки микроорганизмов. Культуры клеток высших организмов могут быть использованы для производства вакцин, моноклональных антител и других иммунологических препаратов, регуляторов роста при выведении новых сортов растений. Получение протопластов дает возможность конструировать генетически новые объекты путем клеточной гибридизации или вводить в них чужеродный генетический материал.

Протопласти — это структуры, которые образуются после полного удаления клеточной стенки. Неполное удаление клеточной стенки приводит к образованию *сферопластов*. В клеточной инженерии используют как протопласти, так и сферопласти. Однако в ряде случаев эксперименты со сферопластами оказываются менее эффективными, чем с протопластами.

Трансформация протопластов является универсальным способом введения молекул ДНК в клетки бактерий, актиномицетов, дрожжей и грибов.

С помощью слияния протопластов можно получать генетические рекомбинанты у тех видов микроорганизмов, которые в естественных условиях никогда не скрещиваются между собой. Таким образом возможно получение гибридных форм у микроорганизмов, имеющих важное значение для микробиологической промышленности, что создает предпосылки для их генетического изучения и расширяет возможность для селекционной работы. Метод слияния протопластов позволяет объединить в одном геноме мутации, положительно влияющие на продуктивность и полученные в разных селекционных линиях, в том числе и такие, которые трудно или даже невозможно индуцировать в одной и той же клетке, а также избавляться от вредных мутаций.

Метод слияния протопластов как способ генетического обмена отличается от конъюгации, трансдукции и трансформации, при которых в реципиентную клетку попадает лишь часть ДНК донора, тем, что при слиянии протопластов объединяются целые геномы и все компоненты цитоплазмы родительских клеток. Кроме того в акте слияния могут участвовать более двух протопластов разных штаммов и в результате сразу получаются рекомбинанты, несущие признаки всех родителей.

Для получения протопластов у микроорганизмов (протопластирования) используют несколько методов. Одни из них основаны на подавлении синтеза клеточной стенки. Для бактерий используют вещества, нару-

шающие образование муреина: пенициллин, фосфомицин, высокие концентрации аминокислот глицина, метионина, треонина и др.; для дрожжей — 2-дезоксиглюкозу, аналог глюкозы, препятствующий образованию у них клеточной стенки.

Вторая группа методов включает ферментативный лизис клеточной стенки. Лизоцим, гидролизующий муреин, используют для получения протопластов у бактерий, часто в сочетании с другими ферментами (протеазами, липазами) и ЭДТА (этилендиаминтетраацетатом). Для протопластирования мицелиальных грибов и дрожжей применяют литические ферменты из актиномицетов, грибов или пищеварительный сок виноградной улитки — (геликазу), который содержит несколько десятков различных ферментов. Используют также смеси, состоящие из геликазы, целлюлазы, хитиназы, пектиназы и других ферментов.

Можно подвергать ферментной обработке клетки, выращенные на среде с ингибитором синтеза клеточной стенки.

Протопласти являются осмотически хрупкими структурами. Поэтому всю работу с протопластами проводят в гипертонических растворах с осмотическими стабилизаторами в концентрации 0,2-0,5 моль. Осмотическими стабилизаторами могут служить минеральные соли (KCl, NaCl, NH₄Cl, NaNO₃), соли органических кислот (сукцинат натрия), многоатомные спирты (маннитол, сорбитол), углеводы (сахароза, рамноза, ксилоза и др.).

Образование и сохранение протопластов зависят от температуры, pH среды, концентрации литического фермента и времени инкубирования с ним, возраста и фазы роста протопластируемой культуры.

В генетическом аппарате протопластов содержится вся информация, необходимая для восстановления (регенерации) клеточной стенки и для возвращения их (реверсии) к клеточной форме с характерной морфологией. Процесс реверсии также зависит от состава среды, температуры, pH, присутствия витаминов, микроэлементов, белков-протекторов (желатин, белки сыворотки крови). Для регенерации клеточной стенки необходим контакт протопластов с каким-либо поддерживающим каркасом, поэтому регенерацию проводят не в жидких средах, а на питательном агаре.

Эффективным индуктором слияния протопластов является полиэтиленгликоль (ПЭГ). Поверхность клеток и протопластов заряжена отрицательно и окружена водным слоем. Действие ПЭГ заключается в снижении поверхностного заряда и удалении воды, что создает условия для тесного контакта и слипания мембран. В местах слипания происходит разрыв мембран и содержимое двух соседних протопластов объединяется. ПЭГ — универсальный агент, вызывающий слияние протопластов различных видов микроорганизмов и обеспечивающий их трансформацию и трансфекцию. Чаще всего применяют полимер со средней молекулярной массой 2000-4000.

кулярной массой 1000-600 Да в концентрации 30-50% (масса/объем). При этом осмотические стабилизаторы можно не использовать, поскольку их функцию выполняет сам ПЭГ. Слияние подавляется высокими концентрациями ионов Na^+ , K^+ , Cl^- , NO_3^- и небольшими примесями EDTA. Слияние протопластов идет уже при 4°C и эффективность его увеличивается при повышении температуры до 30°C. Центрифугирование повышает частоту слияния.

В опыты по слиянию протопластов берут генетически маркованные штаммы, часто несущие мутации ауксотрофности и устойчивости к антибиотикам. Продукты слияния — фузанты (от англ. *fusion* — слияние) отбирают на селективных средах.

Протопластирование и регенерация протопластов могут приводить к утрате плазмид, хромосомным перестройкам и мутациям, среди которых могут быть и полезные.

Глава 11. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ И В ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности широко используются для диагностики, лечения и предупреждения заболеваний. Помимо вакцин, иммунных сывороток и антибиотиков многие другие препараты давно вошли в медицинскую практику. Производятся и разрабатываются новые биологически активные вещества с использованием рекомбинантных штаммов микроорганизмов, полученных методами генетической инженерии (гл. 8, 9). Микроорганизмы используют в аналитических целях при определении мутагенной активности химических веществ, витаминов, аминокислот и т. п. Они служат моделью для испытания влияния на метаболизм некоторых фармацевтических продуктов.

11.1 Медицинские препараты, производимые микроорганизмами

Декстраны вырабатываются молочнокислыми бактериями рода *Leuconostoc* (*L. dextranicum* и *L. mesenteroides*) при росте на сахарозе в качестве источника углерода. Это полимеры, содержащие остатки глюкозы, соединенные α -1,6-связями с вариабельной молекулярной массой от 15000 до 20000000 Да (рис. 64).

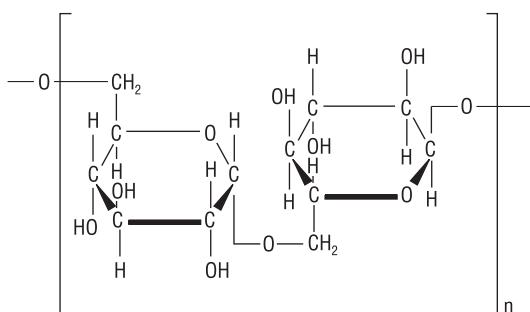


Рис. 64. Структура декстрана.

В медицинских целях может быть использован декстран с определенной молекулярной массой. Его получают путем кислотного гидролиза высокополимеризованного декстрана или используя низкомоле-

кулярные декстраны – предшественники, которые добавляют в культуральную среду. Они служат центрами полимеризации, позволяя получить декстран с низкой молекулярной массой.

Декстраны выпускают в промышленных масштабах и используют как заменители плазмы. Они могут вводиться внутривенно, а также применяться местно при лечении язв и ожогов. В последнем случае они образуют гидрофильную пленку, которая абсорбирует экссудаты. Комплекс железа гидроксида с декстраном с молекулярной массой 5000-7000 Да используют внутривенно при лечении железодефицитной анемии в случаях, когда оральная терапия неэффективна или не может быть применена. Натриевая соль сернокислых эфиров декстрана (натрия декстронсульфат) обладает свойствами антикоагулянта подобно гепарину и применяется внутривенно [11, 13].

Декстраны как плазмозаменители должны иметь молекулярную массу от 40.000 до 300.000 Да. Полимеры с меньшей молекулярной массой быстро выводятся из организма, с большей — потенциально опасны, поскольку могут накапливаться в организме. На практике выпускают инфузионные растворы со средней молекулярной массой 40000, 70000 и 110000 Да.

Растворы содержат 6-10% декстрана, 0,9% натрия хлорида и 5% глюкозы в воде. Их стерилизуют автоклавированием и испытывают на пирогенность, токсичность и стерильность.

Из декстранов готовят сефадексы, которые широко используют в хроматографической практике.

11.2 Витамины, аминокислоты и органические кислоты

Данные соединения, производимые микроорганизмами и применяющиеся в производстве фармацевтических препаратов, представлены в таблице 22. Они получаются методами биотехнологии, развитие которой позволяет постоянно расширять этот ассортимент и делать его более доступным для практики.

Некоторые БАВ, продуцируемые
микроорганизмами

Таблица 22.

БАВ	Продуцент
1	2
Витамины	
Рибофлавин (B ₂)	Eremothecium ashbyii Aschbya gossypii Bacillus subtilis (мутантный штамм)
Цианкобаламин (B ₁₂)	Propionibacterium freudenreichii P. shermanii Brevibacterium flavum Pseudomonas denitrificans
Аскорбиновая кислота (C)	Streptomyces olivaceus Micromonospora spp. Acetobacter xylinum A. suboxydans (превращение D- сорбита в L-сорбозу) Blakeslea trispora Choanephora cucurbitarum
Каротиноиды	
Аминокислоты	
Глутаминовая кислота	Corynebacterium glutamicum
Глутамин, пролин	
L-аланин, L-валин	
Лизин	Corynebacterium spp. Brevibacterium spp.
L-изолейцин	Brevibacterium flavum
L-орнитин	Arthrobacter spp. Brevibacterium spp. Corynebacterium spp.
L-гистидин,	мутанты C. glutamicum
L-аргинин	B. flavum, Bacillus subtilis
L-треонин, L-триптофан	рекомбинантные штаммы Escherichia coli
L-цитрулин	Ауксотрофные мутанты C. glutamicum, Bacillus subtilis
Органические кислоты	
Молочная	Lactobacillus delbrueckii L. bulgaricum, L. brevis Rhizopus oryzae
Глюконовая	Gluconobacter suboxydans Aspergillus niger
Масляная	Clostridium butyricum
Пропионовая	Propionibacterium shermanii P. freudenreichii
Койевая	Aspergillus oryzae
2-кетоглюконовая	Pseudomonas fluorescens
5-кетоглюконовая	Gluconobacter suboxydans
Винная	то же
Пировиноградная	Pseudomonas aeruginosa
Уксусная	Acetobacter spp.
Лимонная	Aspergillus niger

11.3 Железохелирующие агенты

При росте на среде с дефицитом железа многие микроорганизмы продуцируют вещества, способные связывать железо, обычно это феноляты или гидроксаматы, которые называют сидерофорами. Активный продуцент сидерофора десферроксамина (рис. 65) — *Streptomyces pilosus*.

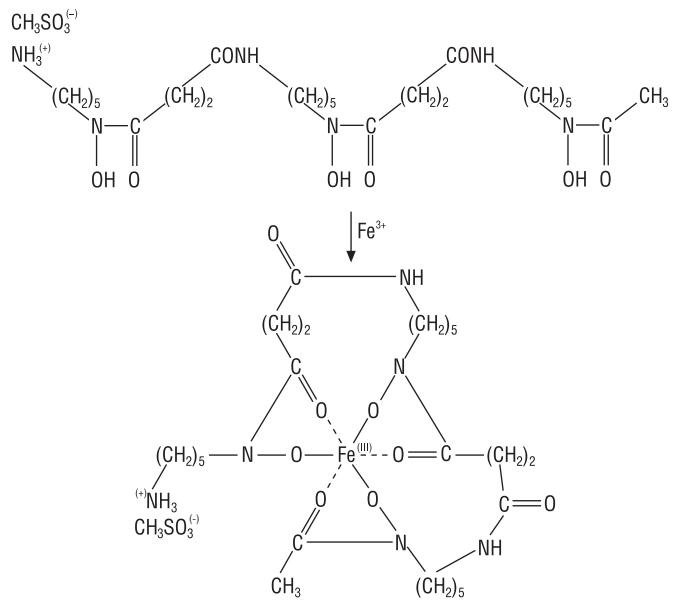


Рис. 65. Структура десферроксамина и его хелатного комплекса.

Десферроксамин (десферол) — активный антидот, который применяется при остром отравлении железом. Последнее может возникать, например, у детей при использовании железа сульфата для лечения неосложненного дефицита этого элемента. Десферол имеет высокое сродство к железу (константа связывания порядка 10³⁰), его комплекс с металлом водорастворим и хорошо выводится из организма. При гемолитической анемии, например, талассемии десферол используют совместно с переливанием крови, чтобы поддержать нормальный уровень железа и гемоглобина в крови. Десферол выпускают в форме стерильного порошка, вводят путем инъекций или орально при остром отравлении железом, чтобы удалить его из кишечника.

Сидерофоры перспективны при лечении злокачественных и вирусных заболеваний. *Paracoccus denitrificans* продуцирует сидерофоры, угнетающие рост опухолевых клеток и репликацию РНК вирусов. Это действие связано с тем, что в среде создается дефицит железа, необходимого для этих процессов.

11.4 Ферменты

Микроорганизмы продуцируют ферменты, которые используются как терапевтические вещества или в диагностических целях. Последние будут рассмотрены ниже.

Стрептокиназа, продуцируемая стрептококками, способна трансформировать плазминоген в плазмин — протеазу, вызывающую растворение сгустков крови. Ее применяют при лечении глубоких венозных острых артериальных тромбозов и острой легочной эмболии. Возможно применение этого фермента при инфаркте миокарда.

Стрептодорназа, также вырабатываемая стрептококками, способствует разжижению гноя. Это де-

зоксирибонуклеаза, гидролизующая дезоксирибонуклеопротеин и ДНК, обуславливающие вязкость гноя. Совместное применение стрептокиназы и стрептодорназы эффективно при заболеваниях грудной полости, сопровождающихся образованием сгустков крови и гноя, и при лечении гнойных ран.

Оба фермента получают при культивировании непатогенных штаммов стрептококков на среде с избытком глюкозы. Ферменты выделяют из культуральной жидкости и выпускают в инъекционной форме.

L-аспарагиназу продуцируют *E. coli* и *Erwinia carotovora*. Фермент используют при химиотерапии некоторых форм лейкемии. *L-аспарагиназа* отщепляет одну аминогруппу от аспарагина, превращая его в аспарагиновую кислоту. Избирательность действия фермента определяется потребностью некоторых форм опухолевых клеток в аспарагине, тогда как нормальные клетки в аспарагине не нуждаются.

Нейраминидазу получают при культивировании *Vibrio cholera*. Фермент отщепляет остатки *N*-ацетилнейраминовой кислоты, входящей в мембрану некоторых опухолевых клеток, повышая таким образом их антигенную активность. Может быть использован при лечении некоторых форм лейкемии.

β -лактамазы, инактивирующие пенициллины и цефалоспорины, используются при определении стерильности этих антибиотиков (см. ниже) или при микробиологическом анализе клинического материала от больных, получающих эти антибиотики. В терапевтических целях их используют в случае тяжелой аллергической реакции на β -лактамные антибиотики. Фермент вводят внутримышечно или внутривенно совместно с другими препаратами (адреналин, антигистаминные средства).

11.5 Микробная трансформация лекарственных веществ.

11.5.1 Микробная трансформация

Ферментные системы микроорганизмов позволяют осуществлять химические превращения биологически активных веществ с целью получения лекарственных препаратов. Подобные реакции в условиях химического синтеза проходят обычно в жестких условиях температуры и pH и являются многостадийными. Микробная трансформация осуществляется в физиологических условиях, что позволяет сохранить активность продукта, и обычно проходит в одну стадию.

Впервые преимущества микробной трансформации были обнаружены при получении стероидных препаратов. Одной из необходимых стадий этого процесса является гидроксилирование молекулы предшественника в определенном положении. Этой способностью обладают многие микроорганизмы. На рис. 66 показан пример биологической трансформации с участием

Rhizopus nigricans. Иммобилизованные клетки используют для биотрансформации стероидов, антибиотиков, для получения антивирусного препарата аденинарабинозида. Процесс включает трансгликозилирования.

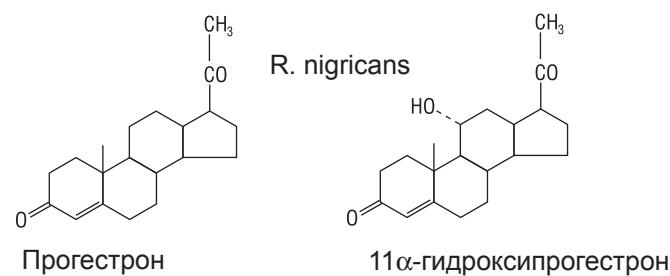


Рис. 66. Трансформация прогестерона ферментной системой *Rhizopus nigricans*

Найдены штаммы микроорганизмов, способные превращать гидрокортизон и кортизон соответственно в преднизолон и преднизон путем дегидрогенирования и т. д.

В процессах биотрансформации могут быть использованы иммобилизованные в полимерном гелевом матриксе клетки, а также мембранные системы, которые позволяют вести процесс непрерывно и упрощают очистку продукта. Иммобилизованные клетки используют для биотрансформации стероидов, антибиотиков, для получения антивирусного препарата аденинарабинозида. Процесс получения последнего вещества включает реакцию трансгликозилирования (урациларабинозид + аденин \rightarrow аденинарабинозид), которую осуществляют клетки *Enterobacter aerogenes*, иммобилизованные в полиуретане.

В производстве антибиотиков необходимой стадией получения некоторых пенициллинов является гидролиз бензилпенициллина до 6-аминопенициллановой кислоты с помощью микробной пенициллиназы. При этом хорошие результаты дает использование рекомбинантных штаммов с высокой ферментативной активностью. Иммобилизация клеток увеличивает их стабильность и повышает выход продукта.

11.5.2 Инсектициды

Энтомопатогенные бактерии, вирусы и грибы могут быть использованы для борьбы с вредными насекомыми. Методы биологической защиты от насекомых экологически более безопасны, чем методы химической защиты. Однако, к микроорганизмам, предлагаемым для этой цели предъявляются строгие требования их безопасности для млекопитающих и растений.

Наиболее изучены токсины *Bacillus thuringiensis*. Токсин δ — это протеин, который содержится в спорах в форме кристаллических включений, активен против личинок *Lepidopterae* (молей, бабочек). Активация токсина происходит при его ограниченном гидролизе

в кишечнике личинок, после чего стенки кишечника разрушаются, что сопровождается гибелью насекомых. Инсектицидный препарат выпускают в форме порошка, содержащего споры и кристаллы токсина. Он не токсичен для человека и животных и применяется для защиты урожая от гусениц. Найден новый штамм *B. thuringiensis*, δ-токсин которого имеет более широкий спектр действия и активен против *Coleoptera* (жуков) в большей степени, чем *Lepidoptera* и *Diptera* (мух и комаров).

Второй токсин *B. thuringiensis* — β-токсин действует на все перечисленные семейства насекомых, это адениннуклеотид, возможно, аналог АТФ, который конкурентно ингибит ферменты, участвующие в гидролизе АТФ. Он токсичен для млекопитающих, поэтому в производстве инсектицида используют штамм *B. thuringiensis*, который продуцирует только δ-токсин.

11.6 Использование микроорганизмов и их продуктов в лабораторных исследованиях

11.6.1 Определение витаминов и аминокислот

В качестве тест-культур используют ауксотрофные штаммы микроорганизмов, т. е. такие, для которых определяемое вещество является необходимым фактором роста. Питательная среда должна содержать все необходимые для тест-организма вещества, помимо определяемого. Последнее вносят в лунки агаризованной среды в чашках Петри. В определенных границах диаметр зоны роста культуры вокруг лунки будет пропорционален концентрации фактора роста, которую определяют с помощью стандартной кривой. Этот метод в основном используют при анализе витаминов т. к. аминокислоты обычно определяют химическими методами.

11.6.2 Фенилкетонурия

Это врожденное нарушение метаболизма, при котором организм не способен к конверсии избытка фенилаланина (ФА) в тирозин, необходимый для биосинтеза тироксина, адреналина и норадреналина. Диагностическим признаком заболевания является присутствие фенилпироноградной кислоты (ФПВК) в моче и повышенный уровень ФА и ФПВК в крови. Больному назначают диету с низким содержанием ФА. Без принятия необходимых мер развивается слабоумие. Для диагностики фенилкетонурии предложено использовать *Bacillus subtilis*, рост которой на минимальной среде подавляется β-2-тиенилаланином (thyenil), но восстанавливается в присутствии ФА или ФПВК. Исследуемые образцы крови или мочи наносят на диски фильтровальной бумаги, которые помещают

на засеянную среду в чашках Петри. При положительном результате отмечают зоны роста микроорганизма вокруг дисков. Диаметр зон пропорционален содержанию исследуемых веществ, количество которых определяют по стандартной кривой.

11.6.3 Определение канцерогенов и мутагенов

Все химиотерапевтические препараты должны проходить проверку на мутагенную, потенциально канцерогенную активность. Для этой цели предложен быстрый метод с использованием мутантных штаммов *Salmonella typhimurium*. Эти штаммы имеют мутации в гистидиновом опероне и не могут синтезировать гистидин. Две дополнительные мутации увеличивают чувствительность тест-системы. Первая определяет нарушение структуры липополисахарида клеточной стенки, в результате которого повышается ее проницаемость для больших гидрофобных молекул. Вторая мутация нарушает систему репарации ДНК, в результате чего невозможно восстановление структуры ДНК после воздействия мутагена.

Тест-культуру смешивают с испытуемым веществом в расплавленной (45°C) агаризованной среде минимального состава и выливают на чашку Петри. Поверх наносят слой агаризованной среды, содержащей следы гистидина и позволяющей клеткам пройти несколько циклов деления, что необходимо для выявления действия некоторых мутагенов. После 48-часовой инкубации при 37°C подсчитывают колонии-ревертантов и сравнивают их количество с результатами посева на контрольной чашке, не содержащей мутагена. Колония-ревертант — это потомство клетки, мутировавшей к дикому типу и способной синтезировать гистидин (расти на минимальной среде).

11.6.4 Использование микробных ферментов при определении стерильности

При испытании эффективности стерилизации в составе тест-систем используют спорообразующие микроорганизмы. При определении стерильности препаратов антибиотиков применяют микробные ферменты, инактивирующие эти вещества. Мембранные фильтрации, которую также используют для этой цели, имеет такие недостатки, как возможность случайного микробного загрязнения фильтров и адсорбция антибиотика на фильтре с последующим попаданием его в питательную среду. Применение инактивирующих ферментов является более надежным методом. Для инактивации пенициллинов и цефалоспоринов предложено использовать соответствующие β-лактамазы. Хлорамфеникол возможно инактивировать ацетилтрансферазой. Аминогликозиды — путем ферментного фосфорилирования, ацетилирования или адени-

лирования. Фармакопея рекомендует использовать только β -лактамазы, остальные методы пока не нашли широкого применения.

11.6.5 Применение иммобилизованных ферментов

Применение иммобилизованных ферментов представляется перспективным для создания тест-систем для клинического анализа. Например, глюкозооксидазу, применяемую при определении глюкозы в крови, получают при культивировании *Aspergillus niger*. Предложен способ иммобилизации этого фермента на платиновом электроде, который может измерять потребление кислорода при окислении глюкозы. Однако, эта система имеет ряд недостатков, которые предстоит устранить до внедрения ее в практику.

11.6.6 Использование микроорганизмов как модельных систем при исследовании метаболизма лекарственных веществ

Лекарственные вещества проходят тщательные испытания их эффективности и токсичности, в том

числе исследуют пути их метаболизма в организме млекопитающих: возможные химические превращения, распределение в органах и тканях, скорость выведения из организма и т. д. Эти испытания проводят на животных, в меньшей степени используют микросомальные системы, культуры тканей, перфузированные органы. Предложено использовать микробные клетки как модель метаболизма *in vitro*, поскольку имеется сходство между некоторыми ферментными системами микроорганизмов и печени человека. Большое преимущество таких моделей — их относительно низкая стоимость и возможность получать метаболиты в количествах, достаточных для анализа. Для создания модельных систем проводят скрининг большого количества микроорганизмов на их способность метаболизировать данное вещество. Выбранный штамм выращивают в колбах на качалках, куда вносят исследуемое вещество и через определенные промежутки времени отбирают пробы, определяя в них присутствие метаболитов лекарственного вещества. При необходимости процесс масштабируют с целью получения большого количества метаболитов для изучения их структуры и биологической активности.

Глава 12. ПРИМЕНЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

12.1 Химиотерапия инфекционных заболеваний

Термин “химиотерапия” относится к лечению инфекционных болезней путем системного применения антибиотиков или других лекарственных препаратов (табл. 26). В ее основе лежит избирательное действие химиотерапевтического препарата, подавляющего размножение патогенного микроорганизма без нарушения функций организма хозяина, что помогает его защитным силам справиться с инфекцией.

Химиотерапевтический препарат будет эффективным при следующих условиях:

- 1) при его использовании для лечения или профилактики заболевания, вызванного чувствительным к данному препарату микроорганизмом;
- 2) при достижении в тканях его концентрации, достаточной для подавления роста инфицирующего агента;
- 3) при достаточно продолжительном периоде лечения;
- 4) при отсутствии тяжелых побочных реакций.

Терапевтическое действие препарата обеспечивают следующие факторы: сохранение стабильности структуры при введении в организм, скорость абсорбции и элиминации, способность к проникновению в ткани и биологические жидкости. Основными критериями оценки эффективности антимикробных препаратов являются терапевтический индекс и достигаемая концентрация в сыворотке.

Терапевтический индекс — частное от деления величины минимальной токсической дозы препарата на величину минимальной дозы, проявляющей антимикробную активность; более высокое значение соответствует большей эффективности препарата.

Достигаемая концентрация в сыворотке — величина, зависящая от массы тела пациента, дозы препарата, способа и схемы введения и скорости его элиминации из организма. Этот показатель не отражает концентрацию препаратов в тканях организма, которая может значительно превышать концентрацию в сыворотке.

Факторы, которые необходимо учитывать при выборе химиотерапевтического средства, представлены в таблице 23, ниже приводится более подробное описание выделенных факторов.

Факторы, которые необходимо учитывать при назначении химиотерапевтического препарата

Таблица 23.

Фактор	Показатели
Микробиологический	Природа инфицирующего агента, его чувствительность к химиотерапевтическим препаратам.
Фармакологический	Дозировка, интервал между приемами препарата, продолжительность лечения.
Общий клинический и токсикологический	Общее состояние больного: возраст, беременность, генетические факторы, сопутствующие заболевания и лечение, состояние печени, почек, иммунной системы и т. д.
Побочные реакции	Вторичные инфекции, авитаминоз, дисбактериоз, иммунные реакции и т. д.
Эпидемиологический	Частота распространения устойчивых штаммов в среде, окружающей больного. Предотвращение распространения устойчивости.

12.2 Микробиологический фактор

Природа инфицирующего агента и его чувствительность к химиотерапевтическим препаратам является основой для их выбора. Следует также учитывать возможность развития резистентности возбудителя в процессе инфекционного заболевания. Поэтому в идеальных условиях микробиологический анализ должен предшествовать назначению терапевтического средства. Однако на практике в большинстве случаев необходимо начинать лечение до получения антибиотикограмм, выбирая лекарственный препарат на основании клинических признаков заболевания и, назначая подходящий антибиотик уже после определения чувствительности микробиоты данного больного. Важно помнить, что инфекционный материал для анализа должен быть собран до начала лечения.

Бывают ситуации, когда лекарственный препарат выбрать трудно, поскольку заболевания одного типа могут быть вызваны несколькими микроорганизмами (например, септицемии, бактериальные пневмонии) или микроорганизмами, чувствительными к нескольким антибиотикам, так что выбор препарата должен основываться на клинических и фармакологических данных.

12.3 Фармакологический фактор

Химиотерапевтические препараты эффективны только в том случае, если они присутствуют в очаге инфекции в концентрации, обеспечивающей подавление роста микроорганизма. Дозы и интервалы между приемами подбираются на основании тщательного фармакологического и клинического исследования и должны гарантировать выполнение этого условия. Низкие дозы препарата и большие интервалы между его введениями делают лечение неэффективным и приводят к развитию микробной резистентности.

Продолжительность лечения определяется клиническим опытом. Недостаточная продолжительность лечения может привести к рецидивам заболевания, развитию его осложнений.

12.4 Токсикологический фактор и побочное действие

Химиотерапевтические препараты в применяемых дозах малотоксичны и нетоксичны, хотя некоторые из них вызывают побочные действия, например, ототоксическое у аминогликозидов или фотосенсибилизирующее у тетрациклических. Основным побочным действием антибиотиков является дисбактериоз в результате подавления нормальной микробиоты, в основном, кишечника. Результатом этого может явиться авитаминоз и вторичная инфекция, например, кандидоз. Поэтому антибактериальные антибиотики часто назначают совместно с противогрибковыми (нистатином) и витаминами.

Кроме того, все лекарственные препараты могут вызывать иммунный ответ с появлением аллергических реакций. Частота и интенсивность таких реакций зависит как от вида антибиотика, так и от индивидуальной чувствительности пациента. Больному, у которого хоть раз отмечалась аллергическая реакция к данному антибиотику, никогда нельзя назначать повторно этот препарат или препараты той же химической группы, но это не служит противопоказанием к применению препаратов других групп.

12.5 Эпидемиологический фактор и резистентность

Проблемы возникновения резистентных и полирезистентных штаммов микроорганизмов рассматриваются в главе 13. Врач должен быть в курсе самых последних данных о распространенности бактерий, устойчивых к разным антибиотикам, в том географическом регионе, где он работает. Если врач знает, что 80% популяции стафилококков в его регионе устойчивы к пенициллину, он не назначит этот антибиотик для лечения стафилококковой ин-

фекции, если только сначала не будет установлено, что культура, выделенная от больного, чувствительна к пенициллину.

Распространенность устойчивости к антибиотику для данной бактериальной популяции не остается постоянной, а изменяется в зависимости от того, насколько широко используется антибиотик в данном регионе: частота устойчивых штаммов увеличивается при увеличении интенсивности использования антибиотика.

Частота штаммов с трансмиссивной устойчивостью зависит от плотности микробной популяции, поэтому наибольшая частота резистентных и полирезистентных штаммов наблюдается в больницах (госпитальные штаммы), где больше всего используются антимикробные препараты, а плотность микробной популяции максимальна.

12.6 Профилактическое использование химиотерапевтических препаратов

Учитывая возможность развития нежелательных побочных реакций (см. выше), профилактическое применение антибиотиков можно считать целесообразным только в том случае, если выполняются следующие положения.

1. Наличие условий, в которых действительно можно ожидать развития данного заболевания. Примерами могут служить:

а) обширные ожоги (заражение *Staphylococcus aureus* или *Pseudomonas aeruginosa*);

б) такие хирургические операции, как ампутация нижней конечности (анаэробная инфекция, вызываемая *Clostridium perfringens*), операции на сердце (эндокардиты, вызываемые *S. aureus*), стоматологические операции у больных с протезом клапана сердца;

в) стрептококковые инфекции горла, инфекции почек, ревматоидный полиартрит;

г) наличие менингококков и *Haemophilus influenzae* у здоровых носителей. Этот список далеко не полон, можно привести множество других примеров.

2. Правильный выбор препарата с учетом чувствительности к нему возбудителя заболевания. Возможно как системное, так и местное применение (при ожогах, при хирургических операциях).

3. Правильное время введения, обеспечивающее нахождение антимикробного препарата в очаге инфекции именно в то время, когда она может начаться. Если это время трудно предсказать, например, момент наступления рецидива при ревматоидном полиартрите, лекарственный препарат следует применять длительное время.

12.7 Комбинированное применение химиотерапевтических препаратов

Одновременное применение двух или более химиотерапевтических препаратов можно считать целесообразным по следующим причинам.

1. Снижение частоты появления резистентных штаммов. Для достижения этой цели следует применять препараты с разными механизмами действия (имеющие разные мишени в микробной клетке), иначе мутации, обусловливающие устойчивость к одному препарату, приведут к развитию устойчивости к другому препарату с аналогичным механизмом действия.

2. Расширение антибактериального спектра при лечении смешанных инфекций или тяжелых инфекций неизвестной этиологии. В этом случае препараты должны иметь различающиеся антибактериальные спектры действия, чтобы суммарный спектр был достаточно широким.

3. Снижение дозы компонентов в смеси может быть достигнуто при их синергидном эффекте, тогда возможно уменьшение дозы потенциально токсичного препарата.

4. Увеличение терапевтической эффективности. При совместном применении антимикробных препаратов могут наблюдаться эффекты трех типов: синергизм, аддитивность и антагонизм. При *синергизме* результат совместного действия препаратов превосходит суммарный результат действия каждого из них в отдельности. *Аддитивность* означает, что эффект комбинации равен сумме эффектов компонентов. В случае *антагонизма* один из компонентов смеси снижает эффективность другого. Биохимические основы этих явлений можно определить, зная механизм действия антимикробных агентов. Например, антагонизм между пенициллином и тетрациклином связан с тем, что пенициллин действует только на растущие бактерии. Тетрациклин блокирует рост, поддерживая бактерии в физиологической фазе, когда они нечувствительны к пенициллину.

Типичным примером синергизма является комбинация двух антиметаболитов — сульфонамидов и триметоприма, когда синергизм обусловлен двойным метаболическим блоком (см. гл. 10). При наличии синергизма концентрация каждого препарата в смеси, необходимая для подавления роста микроорганизмов, меньше, чем подавляющая рост концентрация каждого из них в отдельности. Однако необходимо, чтобы фармакокинетические свойства двух компонентов обеспечивали сохранение в очаге инфекции таких концентраций каждого из них, при которых наблюдается синергизм. Кроме того, комбинации препаратов могут отличаться по характеру токсичности от компонентов, используемых раздельно, а присутствие одного препарата может влиять на фармакокинетику другого. Поэтому каждую новую комбинацию следует рассматривать

как новый лекарственный препарат и исследовать его токсикологию и фармакокинетику.

12.8 Применение антибиотиков для лечения инфекционных заболеваний

Антибиотики по спектру своего действия подразделяются на антибактериальные, антифунгальные, антипротозойные и противовирусные. В данном разделе представлены материалы о терапевтическом применении антибактериальных антибиотиков, т. к. средства для лечения других инфекционных заболеваний рассмотрены в соответствующих разделах (часть I).

Существует несколько поколений антибиотических препаратов, различающихся по спектру своего действия, способности воздействовать на резистентные штаммы микроорганизмов и фармакологическим свойствам. В соответствии с этим их рекомендуют применять при определенных инфекционных заболеваниях (рис. 43, 44, 45).

Большинство антибиотиков оказывает бактерицидное действие (табл. 19), но применяют и антибиотики, оказывающие бактериостатическое действие (левомицетин, тетрациклины, макролиды), поскольку защитные силы организма способствуют уничтожению возбудителя, размножение которого подавлено химиотерапевтическим агентом.

12.9 Применение синтетических химиотерапевтических препаратов.

Синтетические химиотерапевтические препараты подобно антибиотикам отличаются избирательностью своего действия, которая зависит от наличия специфической мишени в клетках инфекционного агента, определяющей спектр антимикробного действия препарата и его терапевтическое применение (табл. 24) [25]. В таблице указаны только основные антибактериальные препараты; вещества с антивирусной, антифунгальной и антипротозойной активностью рассматриваются в соответствующих разделах.

12.10 Применение антибиотиков в сельском хозяйстве

В *ветеринарии* антибиотики используют как для индивидуального лечения, так и для массовой обработки животных.

Индивидуальное применение практикуется при лечении как мелких (кошек, собак и т. п.), так и крупных домашних животных (коров, лошадей, овец и т. п.), страдающих от инфекционных заболеваний (пневмонии, бронхиты, маститы, кишечные инфекции и т. д.).

При лечении мелких животных применяются те же принципы, что и в химиотерапии инфекционных заболеваний человека и используются те же

Применение антибактериальных синтетических
химиотерапевтических препаратов

Таблица 24.

Препарат	Спектр действия	Заболевание
ХИНОЛОНЫ		
налидиксовая кислота	грамотрицательные бактерии	
оксолиниевая кислота	широкий спектр действия	Инфекции, вызванные видами <i>Pseudomonas</i> и <i>Proteus</i>
промидиевая кислота		
циноксацин		
милоксацин		
ФТОРХИНОЛОНЫ		
ломефлоксацин	Действуют на грамотрицательные бактерии; большинство анаэробов резистентно или умеренно	Инфекции мочевых путей, осложненные инфекции дыхательных путей; болезни, вызванные сальмонеллами, шигеллами, <i>Pseudomonas spp.</i>
норфлоксацин		
певлоксацин		
офлоксацин		
ципрофлоксацин		
НИТРОИМИДАЗОЛА ПРОИЗВОДНЫЕ	Анаэробы и простейшие	Анаэробные инфекции, трихомоноз
метронидазол		
СУЛЬФАНИЛАМИДЫ (СУЛЬФОНАМИДЫ)	Виды <i>Streptococcus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Yersinea enterocolytica</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i>	Инфекции, вызванные грамположительными и грамотрицательными бактериями, хламидиями; малярия, токсоплазмоз
ПАРААМИНОСАЛИЦИ-ЛОВАЯ КИСЛОТА ДИАМИНОПИРИМИДИНЫ	Микобактерии	Различные микобактериозы
триметоприм в комбинации с сульфаметоксазолом	Широкий спектр действия	Инфекции мочеполовой системы и ЖКТ; профилактика бактериальных инфекций у пациентов с иммунодефицитами
бисептол		
септрин		
НИТРОФУРАНЫ		Диареи, желудочно-кишечные расстройства, инфекции мочевыводящих путей
фуразолидон		
нитрофурантион		

лекарственные препараты. При лечении крупных животных тоже используются принципы химиотерапии человека, но если животное служит источником пищевых продуктов, необходимо отменять антибиотики заранее перед убоем, чтобы они не попали в пищу. При большинстве заболеваний животных применяют как ветеринарные (гризин, бацитрацин), так и медицинские (стрептомицин, пенициллины, левомицетин, тетрациклины) антибиотики и другие химиотерапевтические препараты (сульфонамиды, нитрофураны).

Профилактическая массовая обработка может проводиться для всех животных в данном хозяйстве, тогда как массовое лечение только на ферме, где появилось инфекционное заболевание. При этом антибиотики дают с кормом или питьевой водой.

Массовая обработка позволяет прервать инфекционный цикл, уничтожить очаг инфекции, борясь как с активной формой заболевания, так и с бессимптомными инфекциями.

Антибиотики широко используются в качестве добавок к корму для увеличения скорости роста животных, связанной с их влиянием на микробиоту ки-

шечника. Предполагают, что антибиотики подавляют образование токсинов кишечными бактериями, подавляют рост потенциально патогенных бактерий и микроорганизмов, разрушающих и потребляющих важные компоненты пищи животных, и стимулируют рост бактерий, синтезирующих витамины и другие полезные вещества, что приводит к изменению физиологии животных. В России в качестве кормовых добавок используют гризин и бацитрацин.

Однако массовое использование антибиотиков в животноводстве может привести к последствиям, опасным для здоровья человека и животных. Бактериологические последствия связаны с отбором и распространением полирезистентных штаммов микроорганизмов; фармакологические последствия — с накоплением в продуктах животноводства антибиотиков, способных вызывать аллергические или другие отрицательные реакции у человека.

Некоторые антибиотики используют для защиты растений от заболеваний, вызванных фитопатогенными бактериями (стрептомицин против *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*) и грибами (циклогексимид, касугамицин, ауреофунгин).

Глава 13. ПРИНЦИПЫ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ И ДРУГИХ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Антибиотической активностью препарата называют его способность убивать или задерживать рост микробного организма. В связи с этим различают бактерицидное и бактериостатическое действие вещества. В отношении противогрибковых препаратов говорят о фунгицидной и фунгистатической активности [28].

Активность антибиотиков и других антибиотических препаратов определяют:

- а) в процессе производства (активность продукта, контроль качества продукта);
- б) при изучении фармакокинетики препарата у животных или человека;
- в) при выборе препарата для химиотерапии и ее контроле.

При этом антибиотик может присутствовать в культуральной жидкости, находиться в виде химически чистого вещества, иметь различные лекарственные формы или содержаться в биологических жидкостях (кровь, моча и др.). В каждом случае необходим правильный выбор методов. Традиционно используют микробиологические методы определения активности, наряду с ними существуют ферментные, иммунологические и хроматографические методы с использованием автоматизированной аппаратуры и компьютерной техники.

Каждый метод предусматривает использование стандартного вещества для сравнения или построения калибровочной кривой. Точность метода может быть достигнута выполнением необходимого числа повторных определений и статистической обработкой их результатов.

13.1 Микробиологические методы

Для количественного выражения биологической активности введено понятие *единицы действия* (ЕД). За единицу действия антибиотика принимают минимальное количество вещества, которое задерживает рост стандартного штамма микроорганизма в строго определенных условиях. ЕД — это активность строго

определенного весового количества вещества, принятого за эталон. Для большинства антибиотиков 1 ЕД соответствует 1 мкг вещества. В 1 мг натриевой соли бензилпенициллина содержится 1670 ЕД, окситетрациклина — 925 ЕД, нистатина — не менее 4000 ЕД. В качестве тест-культуры обычно используют непатогенный или условно-патогенный микроорганизм, проявляющий наибольшую чувствительность к данному веществу. Для оценки спектра действия антибиотика применяют различные микроорганизмы, в том числе и патогенные. Эти штаммы хранят в определенных условиях и постоянно контролируют по их морфолого-физиологическим свойствам.

В качестве питательной среды, пригодной для большинства тест-культур, используют мясо-пептонный бульон или мясо-пептонный агар. Для выращивания дрожжей и грибов в эти среды добавляют 1% глюкозы или используют среду Сабуро. При определении активности методом диффузии в агар используют голодный агар для базисного слоя. Его состав: агар-агар — 1,5-2,0 г, фосфатный буфер с рН 6,8-7,0-100 мл.

13.2 Определение активности антибиотиков методом серийных разведений

Метод серийного титрования может быть выполнен в разных объемах среды (от 1 до 10 мл), в асептических условиях при использовании стерильных пипеток для каждого ингредиента реакции. Титрование можно проводить в плотных и жидкких средах. При титровании в жидкких средах в ряд пробирок наливают питательную среду в строго определенном объеме. В первую пробирку вносят определенное количество раствора антибиотика, перемешивают, затем определенный объем смеси из первой пробирки переносят во вторую, перемешивают и переносят то же количество смеси из второй в третью и т. д. Из последней пробирки, содержащей антибиотик, такой же объем смеси выливают прочь, чтобы во всех пробирках объ-

ем жидкости был одинаков. Пробирка, не содержащая антибиотика, является контрольной. После этого во все пробирки, содержащие серийно разведенный антибиотик, и в контрольную пробирку вносят одинаковое количество взвеси тест-культуры. Штатив с пробирками встряхивают и ставят в термостат при 37°C на 18-20 часов.

Взвесь тест-микробы готовят на изотоническом (0,85%) растворе хлорида натрия при обязательном сравнении со стандартами мутности. При титровании антибактериальных антибиотиков микробная нагрузка обычно составляет $2,5 \times 10^5$ микробных клеток на 1 мл раствора антибиотика в питательном бульоне. При использовании в качестве тест-культуры дрожжей микробная нагрузка составляет 4×10^6 клеток в 1 мл.

Метод серийных разведений в плотных средах отличается тем преимуществом, что микробы-загрязнители здесь легко выявляются и по существу не изменяют общих результатов титрования, тогда как на жидких средах весь опыт может оказаться безрезультатным из-за попадания в пробирки хотя бы единичных клеток посторонних устойчивых микроорганизмов. Этот метод используют также при работе с микроорганизмами, которые не растут на обычных жидкых средах, например, микобактерии туберкулеза, которые выращиваются на среде, содержащей свернутую сыворотку. Вначале готовят ряд серийных разведений антибиотика, а затем вносят по 1 мл каждого разведения в пробирку, содержащую 4 мл расплавленной и охлажденной до 45-50° агаризованной среды. Затем пробирки скашивают до застывания агара, а на поверхность плотной среды петлей засевают взвесь тест-микробы.

Для выявления бактерицидного действия препарата делают высев на свежую питательную среду из всех пробирок, где визуально не отмечен рост микроорганизма. Для стойких antimикробных веществ, которые адсорбируются на микробных клетках и препятствуют их росту даже в свежей питательной среде, применяют соответствующие нейтрализаторы.

13.3 Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар

Этот метод точнее, чем метод серийных разведений, поэтому его чаще используют на практике. Однако методу диффузии присущи определенные недостатки. Критерии для оценки данных, полученных с быстрорастущими микроорганизмами, не применимы к медленнорастущим штаммам. Поэтому если в качестве тест-культуры необходимо использовать медленнорастущий микроорганизм, применяют метод разведений или условия испытания отрабатывают в специальных экспериментах. То же можно сказать и о медленнодиффундирующими антибиотиках.

В чашки Петри разливают питательный агар, смешанный с тест-культурой. Количество последней берут из расчета 20 млн. клеток на 1 мл среды. После застывания агара на его поверхность наносят цилиндры, в которые вносят по 0,1 мл испытуемого раствора антибиотика параллельно со стандартным раствором. Вместо цилиндров можно использовать лунки, которые делают в агаре с помощью специального приспособления. После этого чашки помещают в термостат при 37°C на 16-18 часов. По истечении этого времени измеряют размеры зон задержки роста тест-микробы.

Расчет активности антибиотика по размеру зон задержки может быть произведен на основании расчетных таблиц В. С. Дмитриевой (ГФ) или по стандартным кривым.

Определение чувствительности микробов к антибиотикам методом дисков проводят прежде всего для оценки эффективности антибиотиков в клинических условиях. Клинический материал или микробную культуру, выделенную от больного, засевают на поверхность питательного агара сплошным газоном, накладывают бумажные диски, пропитанные раствором антибиотика (используют коммерческие образцы, содержащие определенные концентрации). После инкубации при 37°C в течение времени, необходимого для роста выделенного возбудителя, определяют диаметр зоны торможения роста. Полученные величины сравнивают с размерами зон задержки роста, указанными в инструкциях, прилагаемых к дискам, после чего выделенные микроорганизмы относят к чувствительным, умеренно чувствительным или резистентным. Прежде чем предложить к реализации любой antimикробный препарат, производитель обязан определить спектр его активности по отношению к тысячам штаммов различных микроорганизмов, учитывая, что фармакокинетические свойства соединения должны поддерживать концентрации в сыворотке, в 2-4 раза превышающие минимальную ингибирующую концентрацию. При выделении конкретных возбудителей используют определенные наборы дисков (табл. 25).

13.4 Ферментные методы

13.4.1 Ускоренный метод определения чувствительности микроорганизма к антибиотику

В чашку Петри наливают 15 мл питательного агара. После застывания агара на него наносят смесь 4 мл такого же агара, 1 мл взвеси тест-культуры, приготовленной по стандарту 1 млрд. клеток в 1 мл, и 1 мл 0,2% водного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (pН 7,2-7,3). Вместо тест-культуры можно использовать клинический материал. Затем на застывший агар яр-

косиного цвета наносят диски, пропитанные антибиотиками, и чашки ставят в термостат при 37°C. Через 2-4 часа учитывают результаты по диаметру синих зон отсутствия роста. Резистентные к антибиотику микрофлоры восстанавливают краситель, обесцвечивая его или трансформируя в желтый цвет.

Данный краситель задерживает рост стафилококков, поэтому при работе с этим микроорганизмом раствор индикатора наливают на поверхность чашки в количестве 2-3 мл уже после выдерживания чашки с дисками в термостате. Избыток индикатора сливают через 5-7 мин. и учитывают результаты.

Наборы дисков для определения чувствительности некоторых микроорганизмов

Таблица 25.

Бактерии	Диски с ХТВ
Enterobacteriaceae и <i>Acinetobacter</i> spp.	Амикацин, ампициллин, цефазолин, цефалотоксин, цефотаксим, гентамицин, тобрамицин, триметоприм-сульфаметоксазол, норфлоксацин
<i>Pseudomonas</i> spp. и <i>Acinetobacter</i> spp.	Амикацин, цефтазидим, гентамицин, мезлоциллин, тобрамицин, триметоприм-сульфаметоксазол, норфлоксацин
<i>Staphylococcus</i> spp.	Ампициллин, цефалотин, клиндамицин, эритромицин, гентамицин, оксациллин, бензилпенициллин, ванкомицин, триметоприм-сульфаметоксазол, норфлоксацин
<i>Enterococcus</i> spp.	Бензилпенициллин, ампициллин, ванкомицин, стрептомицин и гентамицин (синархидность действия), норфлоксацин
<i>Streptococcus</i> spp.	Бензилпенициллин, цефалотин, левомицетин, эритромицин, ванкомицин, норфлоксацин
<i>Haemophilus</i> spp.	Ампициллин, цефотаксим, цефуроксим, левомицетин, триметоприм-сульфаметоксазол

13.4.2 Определение способности микроорганизмов продуцировать β -лактамазу

Устойчивость микроорганизмов к пенициллину может быть связана с их способностью продуцировать фермент β -лактамазу, инактивирующий этот антибиотик.

В чашку Петри вносят 0,5 мл суточной бульонной культуры стандартного штамма *Staphylococcus aureus*, чувствительного к пенициллину, и 20 мл расплавленного и охлажденного до 45°C питательного агара. Быстро перемешивают и оставляют до застывания агара. После этого в центр чашки на поверхность среды помещают бумажный диск, содержащий пенициллин. По радиусам к диску петлей подсевают исследуемые культуры. Посевы инкубируют при 37°C 24 часа. О способности бактерий продуцировать β -лактамазу судят по наличию роста стандартного штамма стафилококка вокруг исследуемой культуры.

13.4.3 Определение способности микроорганизмов продуцировать β -лактамазу

Тест на уреазу

Аминогликозидные антибиотики, являясь ингибиторами синтеза белка, угнетают образование уреазы *Proteus mirabilis*, используемого в качестве тест-организма. Питательную среду, содержащую мочевину, вносят в два ряда пробирок. В один ряд добавляют стандартный раствор испытуемого антибиотика в определенных концентрациях, в другой ряд — испытуемый раствор. Пробирки засевают *P. mirabilis* и через 60-75 мин. инкубации измеряют pH с помощью потенциометра. Значения pH в пробирках, содержащих стандартный раствор, используют для построения стандартной кривой, которая служит для определения количества антибиотика в испытуемом растворе.

Тест на люциферазу

Метод основан на способности аминогликозидных антибиотиков угнетать образование АТФ микробными клетками. Люминесцентный метод определения АТФ в присутствии люциферазы отличается высокой чувствительностью. Бактериальную культуру вносят в пробирки, содержащие стандартный или испытуемый раствор антибиотика, инкубируют 90 мин., после чего определяют количество АТФ в специальном приборе люминометре.

13.4.4 Хроматографические методы

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) Испытуемый раствор пропускают через хроматографическую колонку, заполненную носителем, представляющим собой мелкодисперсный гидрофобизированный сорбент. Гидрофобное покрытие носителя варьируется в зависимости от молекулярной массы разделяемой смеси.

При нанесении микроколичества испытуемого раствора амфи菲尔ные вещества сорбируются на поверхности частиц носителя и вытесняются с нее в градиенте аprotонного растворителя (система вода — ацетонитрил). Вещества разделяются в соответствии со своим сродством к сорбенту (гидрофобностью).

Эффективность анализа определяется микронными размерами частиц носителя, так что время анализа не превышает 5-10 мин.

Раствор на выходе из колонки анализируется в проточном УФ-детекторе с одновременной записью. Положение пика выходящего вещества является его калибровочной характеристикой. Количество вещества в нанесенной пробе определяется автоматическим интегратором.

Преимуществами метода является высокая скорость определения, точность, специфичность и чувствительность.

Количественное определение тетрациклина методом ВЭЖХ

Готовят растворы испытуемого образца и стандартного препарата тетрациклина и хроматографируют их попеременно на жидкостном хроматографе с УФ-детектором, получая не менее 5 хроматограмм каждого раствора в строго определенном режиме температуры и скорости подвижной фазы. Количество тетрациклина в пробе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot S_{обp}}{S_{CT}}, \text{ где}$$

X — количество тетрациклина в испытуемом образце, в граммах;

$S_{обp}$ — среднее значение площадей пиков тетрациклина, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого препарата;

S_{CT} — среднее значение площадей пиков тетрациклина, вычисленное из хроматограмм стандартного образца;

A — содержание тетрациклина в стандартном образце, в граммах.

13.4.5 Спектрофотометрические методы

Количественное определение ампициллина спектрофотометрическим методом основано на том, что ампициллин при нагревании в растворе CuS_0_4 образует окрашенный комплекс. Точную навеску образца антибиотика растворяют в буферном растворе сульфата меди и выдерживают на водяной бане при $80^{\circ}C$ 30 мин., затем быстро охлаждают. Оптическую плотность раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 320 нм, используя в качестве раствора сравнения непрогретый буферный раствор препарата.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца ампициллина, обра-

ботанного таким же образом, как испытуемый препарат.

Содержание ампициллина в препарате в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_0 \cdot a \cdot b}{D_{CT} \cdot a}, \text{ где}$$

D_0 — величина оптической плотности испытуемого раствора препарата;

D_{CT} — величина оптической плотности раствора стандартного образца;

a — навеска стандартного образца ампициллина, в граммах;

b — содержание ампициллина в стандартном образце, в процентах.

13.4.6 Иммунологические методы

Иммунологические методы основаны на использовании специфических антител, поэтому требуют длительной предварительной подготовки (получения антител путем иммунизации животных определенным антибиотиком). Вторым компонентом реакции является меченный препарат, аналогичный определяемому. Метка может быть радиоактивной, флуоресцирующей или ферментной, определяющей способ регистрации результатов анализа. Результат зависит от конкурентного связывания с антителами испытуемого препарата и меченого аналога: чем больше количество испытуемого препарата присутствует в смеси, тем меньшее количество меченого аналога будет связано с антителами. Антитела фиксируют в лунках планшета, куда последовательно вносят испытуемый раствор и тест-систему (меченный аналог и необходимый реагент-детектор). Достоинством иммунологических методов является их высокая специфичность и чувствительность.

Глава 14. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Избирательность действия антимикробных препаратов связана со структурными и метаболическими различиями клеток микро- и макроорганизма. Химиотерапевтический препарат действует на определенный участок системы метаболизма микробной клетки, который является его мишенью. Такими мишениями могут быть отдельные участки синтеза клеточной стенки, белка, нуклеиновых кислот и т. д.

14.1 Ингибиторы биосинтеза компонентов клеточной стенки

14.1.1 Биосинтез пептидогликана

Пептидогликан (муреин) является важнейшей структурой клеточной стенки бактерий, поэтому нарушение его биосинтеза некоторыми антибиотиками приводит к гибели микроорганизма или прекращению размножения клеток. Структура, подобная пептидогликану, отсутствует в клетках млекопитающих, что обеспечивает избирательность действия антибиотика. Молекула пептидогликана состоит из линейных цепей чередующихся единиц N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина, связанных поперечными пептидными мостиками. Предшественники пептидогликана синтезируются в цитоплазме, собираются на молекуле липида-носителя, на цитоплазматической мембране и на первом этапе включаются в клеточную стенку, образуя цепи гликана без поперечных сшивок. На втором этапе эти цепи сшиваются с ранее образованным пептидогликаном с помощью фермента, локализованного на внешней стороне цитоплазматической мембраны. Эти этапы биосинтеза пептидогликана существуют у всех грамположительных и грамотрицательных бактерий, межвидовые различия могут касаться некоторых деталей, в частности, состава аминокислот в пептидных мостиках.

Подробно процесс изучен у *Escherichia coli*. Предшественники пептидогликана — N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамилпентапептид синтезируются в цитоплазме, каждый из них связан с молекулой носителя — уридинифосфата (УДФ), обеспечивающего энергией реакции синтеза. Пентапептид, соединенный с N-ацетилмурамовой кислотой, содержит L-аланин, D-глутаминовую кислоту, мезо-диаминопимелиновую

кислоту и два остатка D-аланина на С-конце пептида. Липидноситель — это высоколипофильный ундеокапренилафосфат, который располагается в цитоплазматической мембране и действует как акцептор предшественников пептидогликана на ее внутренней поверхности. N-ацетилмурамилпентапептид и N-ацетилглюкозамин последовательно переходят от своего УДФ-носителя на липидноситель с освобождением уридинмонофосфата (УМФ) и УДФ, соответственно, и образованием β -1,4-гликозидной связи. Дисахаридпентапептид присоединяется к липидносителю пирофосфатной связью. В этой форме он транслоцируется через цитоплазматическую мембрану и присоединяется к существующему пептидогликану клеточной стенки в зоне ее роста. Соответствующий генетический контроль обеспечивает сохранение характерной формы клетки за счет присоединения вновь синтезированных элементов в определенном локусе.

Предполагают, что линейный гликан, присоединенный к другой молекуле липидносителя, служит в клеточной стенке местом связывания вновь транслоцированного дисахаридпентапептида. Линейный гликан соединяется с ним с образованием гликозидной связи между остатком N-ацетилмурамовой кислоты гликана и N-ацетилглюкозамина вновь транслоцированного дисахаридпентапептида. Реакция трансгликозилирования приводит к увеличению линейного гликана на одну дисахаридную единицу и освобождению липида-носителя в форме пирофосфата. Носитель утрачивает одну молекулу фосфата под действием пирофосфорилазы и возвращается в цикл транслокации дисахаридпентапептида из цитоплазмы к клеточной стенке.

В клеточной стенке происходит образование поперечной сшивки. Вновь синтезированный линейный гликан присоединяется к пептидогликану стенки путем образования пептидных связей. Эту функцию выполняют транспептидазы (ТПазы), расположенные на внешней части цитоплазматической мембраны. Вначале ТПазы связываются с остатком D-аланил-D-аланина пентапептида в линейном гликане. Пептидаза отщепляет терминальный D-аланин, а ТПаза соединяется с С-концом оставшегося D-аланина, образуя активный интермедиат. Следующая стадия ре-

акции транспептидирования заключается в переносе ацильной группы терминального остатка D-аланина к акцепторной аминогруппе диаминопимелиновой кислоты ближайшей цепи пептидогликана. Новая пептидная связь образуется между карбоксильной группой D-аланина вновь синтезированной цепи гликана и аминогруппой диаминопимелиновой кислоты существующего пептидогликана, а ТПаза освобождается. Предполагается, что энергия, освобождающаяся при разрыве связи D-аланил-D-аланин используется для реакции образования пептидной сшивки.

Пептидогликан *E. coli* и многих бацилл имеет лишь 20-30% поперечных сшивок. Однако все свободные пептиды, соединенные N-ацетилмурамовой кислотой, являются тетрапептидами, благодаря действию D, D-Карбоксипептидазы (КПазы), которая подобно ТПазе, отщепляет терминальный D-аланин без образования поперечной сшивки. Помимо этих ферментов в синтезе пептидогликана участвует эндопептидаза, которая расщепляет пептидные сшивки, возможно, создавая локусы для присоединения новых цепей пептидогликана; трансгликозилаза присоединяет к пептидогликану новые цепи гликана, которые затем сшиваются поперечными связями с помощью ТПазы.

14.1.2 Ингибиторы биосинтеза пептидогликана

Ингибиторами биосинтеза пептидогликана являются пенициллины, цефалоспорины и другие β -лактамы — цефокситин (цефамицин), латамоксф (оксацефем), имипенем (карбапенем), азtreонам (монаобактам), угнетающие образование поперечных связей. Такие антибиотики, как ванкомицин, тейхопланин и циклосерин, ингибируют другие стадии биосинтеза.

β -лактамы, являясь структурными аналогами β -аланил- β -аланина, конкурентно ингибируют ТПазы и КПазы путем образования ковалентных связей с активными центрами этих ферментов с расщеплением β -лактамной связи. Связь фермента с β лактамом значительно прочнее связи с его естественным субстратом. Кроме того, эти антибиотики активируют аутолитические ферменты, ответственные за удаление деградирующих компонентов клеточной стенки и разъединение дочерних клеток после деления.

Под действием β -лактамов возникают морфологически измененные клетки и происходит их гибель. Эффект зависит от концентрации антибиотика.

Ванкомицин и тейхопланин имеют сродство к β -аланил- β -аланиновой части предшественников пептидогликана. Они связываются с этой областью и ингибируют перенос линейного гликана в клеточной стенке к дисахаридпентапептиду на его липидном носителе.

Таким образом, сборка пептидогликана останавливается до стадии транспептидирования. Из-за большой

молекулярной массы эти антибиотики не проникают в клетки грамотрицательных бактерий и действуют только на грамположительные микроорганизмы.

Д-циклосерин действует на стадии образования β -аланил- β -аланина, ингибируя активность двух ферментов: аланин-рацемазы, которая конвертирует L-аланин в β -аланин, и синтетазу, которая образует дипептид. Циклосерин действует как конкурентный ингибитор этих ферментов, поскольку имеет структурное сходство с одной из возможных конформаций β -аланина.

Эхинокандины — новый класс антрафунгальных антибиотиков, активных против *Candida spp.*; их полусинтетические аналоги действуют также на аспергиллы и *Pneumocystis carinii*, являясь неконкурентными ингибиторами (1,3)-*p*- β -глюкан синтазы — фермента, участвующего в синтезе глюкана — основного компонента клеточной стенки грибов.

14.2 Ингибиторы синтеза миколовых кислот и арабиногалактана у микобактерий

Клеточная стенка микобактерий содержит ковалентно связанные пептидогликан, арабиногалактан и миколовые кислоты (гидроксилированные жирные кислоты). Нековалентно связанные липидные компоненты представлены гликолипидами, фосфолипидами и восками. Липидные компоненты обеспечивают высокую устойчивость микобактерий к антимикробным агентам.

Изониазид в клетках микобактерий активируется системой ферментов каталаза-пероксидаза. В активированной форме он ингибирует дегидрогеназу, которая катализирует образование двойной связи при C_{24} миколовой кислоты.

Этамбутол блокирует синтез арабиногалактана, ингибируя арабинозилтрансферазу — фермент, обеспечивающий перенос декапрениларабинозы при синтезе полисахарида.

14.3 Ингибиторы синтеза белка

Процессы синтеза белка у млекопитающих и бактерий во многом сходны, однако в них имеются некоторые различия, обеспечивающие избирательность действия многочисленных антибиотиков, антимикробная активность которых связана с подавлением синтеза белка. Многие антибиотики избирательно воздействуют на субъединицы рибосом прокариот (30 S или 50 S).

Аминогликозиды избирательно взаимодействуют с 30 S субъединицей рибосомы. Стрептомицин соединяется с одним из 21 белковых компонентов этой субъединицы, являющимся местом связывания фактора инициации IF-3, препятствуя началу синтеза бел-

ка. Стрептомицин также нарушает аминоацильный участок 30 S субъединицы, препятствуя размещению на нем аминоацил-тРНК. В результате происходит или угнетение синтеза белка, или неправильное считывание генетического кода.

Другие аминогликозиды также соединяются с 30 S субъединицей рибосомы в локусе близком, но не идентичном локусу связывания со стрептомицином, и угнетают синтез белка. Эффективность аминогликозидов возрастает в результате их активного поглощения бактериальной клеткой. Процесс начинается с электростатического связывания антибиотика с отрицательно заряженной поверхностью клетки. При этом аминогликозиды повреждают внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий, что сопровождается высвобождением некоторых липополисахаридов, белков и фосфолипидов. Далее происходит активный транспорт антибиотика через цитоплазматическую мембрану и его связывание с рибосомами. Анаэробные микроорганизмы не обладают системой активного транспорта аминогликозидов, поэтому резистентны к этой группе антибиотиков.

Тетрациклины связываются с 30 S субъединицей рибосомы и препятствуют связыванию аминоацил-тРНК с аминоацильным сайтом. 40 S субъединица рибосом млекопитающих также связывается с тетрациклинами, селективное действие этих антибиотиков основано на избирательный проницаемости. Бактерии активно поглощают тетрациклины, концентрация которых в цитоплазме может в 50 раз превышать концентрацию во внешней среде, тогда как у млекопитающих такая система активного транспорта отсутствует.

Хлорамфеникол избирательно угнетает синтез белка, связывая аминоацильный сайт 50 S субъединицы рибосомы и ингибируя ее пептидилтрансферазу. Этот фермент участвует в образовании новой пептидной связи между растущим пептидом в пептидильном сайте рибосомы и аминокислотой на аминоацил-тРНК в аминоацильном сайте. Хлорамфеникол проникает также и в клетки млекопитающих, но не связывается с 80 S рибосомами. Способность проникать в клетки обеспечивает эффективность его применения при лечении заболеваний, вызванных внутриклеточными паразитами, например, *Salmonella typhi*.

Эритромицин избирательно связывается с 50 S субъединицей рибосомы в сайте, близко расположенному к месту связывания хлорамфеникола, и угнетает процесс транслокации. Эритромицин не препятствует выходу пептидил-тРНК из аминоацильного сайта, но угнетает высвобождение тРНК из пептидильного сайта и препятствует перемещению туда пептидил-тРНК.

Линкомицин и *клиндамицин* связываются с 50 S субъединицей в области, близкой к области связывания хлорамфеникола и эритромицина, и блокируют элонгацию полипептидной цепи, ингибируя пептидилтрансферазу.

14.4 Препараты, нарушающие функции хромосомы

Репликация и транскрипция ДНК у бактерий принципиально не отличаются от этих процессов у млекопитающих, однако существуют и важные различия, на которых основана селективная активность некоторых антибактериальных препаратов.

Хинолоны (синтетические производные налидиксовой кислоты), например, норфлоксацин и ципрофлоксацин ингибируют ДНК-гиразу — фермент, уникальный для бактерий, и таким образом блокируют репликацию хромосомы, но не влияют на механизмы репликации ДНК, которые не зависят от гиразы.

Метронидазол и *нитрофурантион*. Предполагают, что действие этих веществ зависит от нестабильных метаболитов, которые образуются путем восстановления внутри бактериальной клетки. Эти неидентифицированные продукты вызывают разрыв цепи ДНК. Метронидазол обладает специфической активностью против анаэробных бактерий, у которых упомянутый метаболит образуется при низком уровне редокс-потенциала. Резистентность к метронидазолу не описана.

Рифампицин связывается с одним из белков, составляющих комплекс РНК-полимеразы, и блокирует действие этого фермента на стадии инициации транскрипции. Антибиотик не останавливает уже начавшийся процесс транскрипции. Резистентные штаммы появляются быстро в результате изменения строения молекулы РНК-полимеразы, которая более не связывает рифампицин.

Флуцитозин (5-фторцитозин) — это антифунгальный агент, наиболее активный против видов *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*. Внутри клетки гриба флуцитозин деаминируется до 5-фторурацила, который угнетает синтез РНК; сам 5-фторурацил плохо проникает через клеточные барьеры. *Candida albicans* превращает флуцитозин в 5-фтордезоксиуридинмонофосфат, который угнетает синтез ДНК, ингибируя тимидилатсинтетазу.

14.5 Антагонисты фолатов

Существуют принципиальные различия в метаболизме фолатов у бактерий и млекопитающих. Бактерии не способны поглощать экзогенный фолат и должны синтезировать его сами. Процесс синтеза включает синтез дигидроптеровой кислоты из молекул птеридина и *n*-аминобензойной кислоты. Затем из дигидроптеровой и глутаминовой кислот образуется дигидрофолат (ДГФ). ДГФ восстанавливается дигидрофолатредуктазой с участием НАДФН₂ до тетрагидрофолата (ТГФ). ТГФ является переносчиком моноуглеродных радикалов (—СНО и —СН₃) в биосинтезе аденина, гуанина, тимицина и метионина. Та-

ким образом, нарушение синтеза ТГФ влияет на способность клетки синтезировать нуклеиновые кислоты и белки и угнетает ее рост. Клетки млекопитающих способны поглощать ДГФ из продуктов питания и превращать его в ТГФ с помощью дигидрофолатредуктазы (ДГФР). Сульфонамиды и триметоприм селективно угнетают метаболизм фолатов у бактерий. Первые ингибируют синтез дигидроптеровой кислоты, который не происходит у млекопитающих; второй обладает селективным сродством к бактериальной ДГФР. Оба эти вещества активны только в отсутствие в питательной среде аденина, гуанина, тимина и митонона.

Сульфонамиды, являясь структурными аналогами п-аминобензойной кислоты, конкурентно ингибируют ее включение в реакцию образования ДГФ.

Триметоприм — аналог ДГФ ингибирует дигидрофолатредуктазу; бактериальный фермент в несколько тысяч раз более чувствителен к нему, чем фермент млекопитающих, поэтому триметоприм не токсичен в дозах, применяемых при лечении микробных инфекций. Часто триметоприм используют в комбинации с сульфонамидами, обычно с сульфаметоксазолом в форме котримоксазола. Обе стадии, нарушающие метаболизм фолатов, синергичны, таким образом, сочетанное применение препаратов высокоеффективно, однако не предупреждает появление резистентных форм микроорганизмов.

14.6 Антимикробные агенты, воздействующие на цитоплазматическую мембрану

14.6.1 Мембранные бактерии

Мембранные бактерии существенно отличаются от мембран клеток грибов и млекопитающих: бактериальные мембранные не содержат стеролов, мембранные грибов содержат преимущественно эргостерол, а млекопитающих — холестерол. Но в основном мембранные клеток про- и эукариот имеют сходную структуру. У бактерий двойной слой фосфолипидов (фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерол, дифосфатидилглицерол) составляет 20-30% массы мембранных. Протеины (50-70% массы) располагаются по обе стороны мембранных и проникают сквозь слой липидов. Протеины и фосфолипиды соединены ионными, гидрофобными и водородными связями.

Большинство мембраноактивных агентов (спирты, фенолы, четвертичные аммониевые соединения, бисигуаниды) повреждают целостность мембранных, нарушая ее метаболические функции и вызывая утечку содержимого цитоплазмы. Действие этих веществ слабо селективно, т. е. подобный эффект они производят и в отношении мембранных млекопитающих. Поэтому они используются в основном не как терапевтические

средства, а как дезинфицирующие, антисептики и консерванты. Полимиксин — один из мембраноактивных агентов, который может быть использован как терапевтическое средство против инфекций, вызванных *Pseudomonas* spp., однако токсичность этого препарата ограничивает его применение. Полиены и имидазолы являются важными антрафунгальными средствами. Их селективное действие основано на тонких различиях в составе и биосинтезе мембран грибов и млекопитающих.

14.6.2 Полиены

Полиены, из которых наибольшее значение имеют амфотерицин В и нистатин, обладают сильным сродством к эргостеролу, что обеспечивает их селективное действие на клетки грибов. Гидрофобная область полиена связывается со стеролами мембранных, в результате чего гидроксилированная гидрофильная часть молекулы антибиотика втягивается внутрь мембранных. Таким образом в мембране возникают каналы, через которые цитоплазматическое содержимое (ионы K^+ , аминокислоты, нуклеотиды) выходит из клетки. Поскольку резко снижается pH цитоплазмы, макромолекулы разрушаются, и клетка погибает. Сродство полиенов к холестеролу ниже, чем к эргостеролу, поэтому клетки млекопитающих повреждаются меньше, однако при внутривенном введении амфотерицина В при лечении системных инфекций страдают почки.

14.6.3 Имидазолы

Имидазолы, из которых наиболее широко применяются миоконазол и кетоконазол, имеют широкий спектр активности и действуют на дерматофиты, диморфные грибы, дрожжи, а также на грамположительные бактерии, хотя не используются при лечении бактериальных инфекций. Механизм их действия определяется повреждением мембранных при связывании имидазолов с ненасыщенными жирными кислотами, присутствующими в фосфолипидах мембранных. Кроме того имидазолы угнетают биосинтез эргостерола, в частности, деметилирование 14-а-метильного радикала ланостерола, что сопровождается накоплением ланостерола, оказывающего токсичное действие на клетку. Угнетается также синтез триглицеридов и фосфолипидов. Наконец, кетоконазол ингибирует транспорт электронов в дыхательной цепи грибов в аэробных условиях за счет угнетения сукцинат- и НАДН-оксидаз. Важность последнего эффекта подтверждается значительно более низкой ингибирующей концентрацией препарата в аэробных условиях по сравнению с анаэробными.

Производные аллиламина (батрафен, ламизил) ингибируют скваленэпоксидазу в клеточной мембране гриба, в результате подавляется биосинтез эргостерола

на раннем этапе, эффективны в отношении дерматофитов, *Candida spp.*

14.6.4 Катионные пептиды

Катионные пептиды характеризуются высоким содержанием основных и гидрофобных аминокислот, поэтому их молекула амфипатична, т. е. обладает положительно заряженной гидрофильной и гидрофобной областями. Они взаимодействуют с цитоплазматической мембраной за счет электростатических сил,

проникают в ее липидный слой и вызывают ее перестройку с образованием каналов, нарушающих проницаемость мембраны. Избирательность действия зависит от липидного состава мембран микроорганизмов и млекопитающих. Катионные пептиды могут также воздействовать на внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий, конкурентно замещая в ней ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , что приводит к нарушению ее структуры, а также ковалентно связывать сульфогидрильные группы белков клеточной оболочки.

Глава 15. УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ВЕЩЕСТВАМ

15.1 Клеточные и молекулярные механизмы устойчивости

Устойчивость к химиотерапевтическим веществам (ХТВ) определяется комплексом структурных и метаболических особенностей микроорганизма. Различают естественную (природную) и приобретенную резистентность. Последняя имеет огромное значение в практике антимикробной терапии. По мере внедрения нового ХТВ наблюдается короткий период, в течение которого препарат эффективно используется в широких масштабах, далее появляется все большее количество устойчивых микроорганизмов, в результате чего ценность данного ХТВ резко падает. Например, вскоре после внедрения в практику пенициллина только 8% штаммов золотистого стафилококка было к нему устойчиво, сейчас это число превышает 75%. Популяции устойчивых микроорганизмов обычно формируются среди возбудителей госпитальных инфекций. Скорость развития резистентности и ее механизмы зависят от видовой принадлежности микроорганизма.

Механизмы резистентности микроорганизмов к ХТВ могут быть связаны со следующими факторами:

- 1) наличие барьеров проницаемости;
- 2) активный выброс ксенобиотика из клетки;
- 3) наличие инактивирующих ферментов;
- 4) отсутствие или модификация мишени.

15.1.1 Различия в проницаемости клеточных мембран

Различия в проницаемости клеточных мембран определяют разную устойчивость грамположительных и грамотрицательных бактерий к биоцидам. Последние, как правило, более устойчивы, что определяется защитной функцией трудно проницаемой внешней мембраны. Поры мембраны и формирующие их белки порины обеспечивают свободную диффузию гидрофильных молекул с массой до 600-700 Да. Диффузия гидрофобных антибиотиков через поры затруднена. Резистентность *Pseudomonas aeruginosa* даже к гидрофильным биоцидам определяется особенностями ее внешней мембраны, липополисахарид наружной части которой экранирует поры.

Резистентность также может быть связана с нарушением системы транспорта биоцидного агента в клетку и обеспечиваться специальной *системой выброса* ксенобиотиков. Такая система имеется в клетках млекопитающих и обнаружена у бактерий в форме специфических белков — помп, представленных как одиночными белками — транспортерами цитоплазматической мембраны, так и функционально связанными группами транспортеров, периплазматических белков и поринов внешней мембраны.

Более сложная система существует у грамотрицательных бактерий, что связано с необходимостью переноса через внешнюю мембрану. Системы мембранного транспорта, обеспечивающие выброс антимикробных соединений из клетки, активируются в большинстве случаев энергией трансмембранныго градиента протонов и требуют участия АТФ.

15.1.2 Ферменты, инактивирующие антибиотики

Многие микроорганизмы вырабатывают *ферменты, специфически инактивирующие* антибиотики путем их разрушения или химической модификации. (5-лактамазы гидролизуют пенициллины и цефалоспорины (рис. 24, 27). Они синтезируются многими грамположительными и грамотрицательными бактериями. Фермент может быть конститутивным (у *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*) или индуциальным (у *Staphylococcus aureus*, *Serratia spp.* и др.). β -лактамазы разного происхождения существенно различаются по молекулярной массе и аминокислотному составу.

Некоторые производные пенициллина и цефалоспорина (см. выше) устойчивы к β -лактамазам [29]. Кроме того, удается преодолеть устойчивость, вводя антибиотики совместно с ингибиторами лактамаз, например, клавулоновой кислотой (рис. 67).

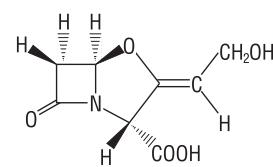


Рис. 67. Клавулоновая кислота.

Хлорамфеникол инактивируется резистентными штаммами бактерий (*Salmonella spp.*, *Haemophilus influenzae* и др.) путем ацетилирования (рис. 68). Ацетилтрансфераза, осуществляющая эту реакцию, индуцируема у грамположительных бактерий и конститутивна у грамотрицательных.

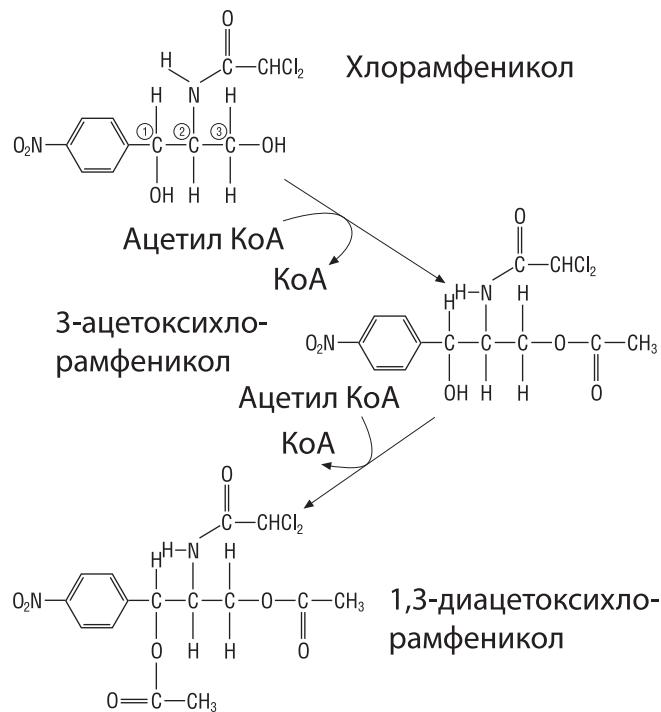


Рис. 68. Инактивация хлорамфеникола путем двухстадийного ацетилирования с участием ацетилтрансферазы.

Аминогликозидные антибиотики инактивируются путем ацетилирования аминогруппы, а также путем аденилирования или фосфорилирования некоторых гидроксильных групп. Большая часть аминогликозидов является субстратом для более чем одного инактивирующего фермента в периплазматическом пространстве или на внешней поверхности цитоплазматической мембраны. Полусинтетический аминогликозид амикацин устойчив к действию многих, но не всех инактивирующих ферментов.

Модификация мишени, приводящая к потере чувствительности к антибиотику, определяется природой взаимодействующих структур. У *E. coli* замена только одной аминокислоты в белке 30 S субъединицы рибосомы делает микроорганизм устойчивым к стрептомицину. Подобный механизм резистентности описан у *Streptococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*.

Устойчивость к метициллину, цефалоспоринам и монобактамам связана с присутствием в микробных клетках пенициллинсвязывающего белка, имеющего сродство и к другим β -лактамам, которые индуцируют его синтез.

Устойчивость к эритромицину зависит от модификации 50 S субъединицы рибосомы (определенная

белков или 23 S РНК, входящих в ее состав), что снижает аффинитет антибиотика к рибосоме.

Триметоприм, который в клинике часто используют в сочетании с сульфонамидом сульфаметаксозолом, является ингибитором бактериальной дигидрофолатредуктазы — ключевого фермента метаболизма фолиевой кислоты. Резистентные штаммы синтезируют дигидрофолатредуктазу, устойчивую к действию антибиотика.

Устойчивость к триметоприму часто сочетается с устойчивостью к сульфонамидом, связанной с модификацией мишени последних — дигидроптероат синтетазе (ДПС). Кроме того, некоторые резистентные к этим препаратам микроорганизмы (*Staphylococcus aureus*) производят необычно большое количество п-аминобензойной кислоты, которая конкурентно вытесняет сульфонамид из активного центра ДПС.

Резистентность к рифамицину определяется модификацией мишени антибиотика — ДНК-зависимой РНК-полимеразы, к налидиксовой кислоте — модификацией ДНК-гиразы.

15.2 Генетические основы устойчивости

Гены, определяющие устойчивость к ХТВ, могут составлять часть бактериальной хромосомы либо располагаться на плазмидах и транспозонах. Плазмиды, несущие эти гены, обозначаются как R-фактор (R-плазмиды). Они обладают не только внутривидовой, но и межвидовой трансмиссионностью, т.е. способны к горизонтальному переносу, приводящему к распространению резистентности от бактерий одного рода, вида или штамма к другим. R-плазмиды определяют множественную устойчивость микроорганизмов, поскольку содержит гены, кодирующие фаноры устойчивости к разнообразным ХТВ. Транспозоны — мобильные генетические элементы, способствуют обмену информацией между плазмидами и хромосомой. В бактериальной клетке постоянно происходит перераспределение локализации генов резистентности: чем более важен ген для обеспечения жизнеспособности клетки, тем менее вероятно, что он может длительное время сохраняться вне хромосомы. Кроме того, локализация генов резистентности до некоторой степени отражает ее биохимические механизмы. Например, устойчивость пневмококков к сульфамидам связана с хромосомной мутацией гена ДПС, устойчивость к стрептомицину — с мутацией хромосомного гена, кодирующего определенный белок рибосомы, тогда как R-плазмиды несут гены, контролирующие синтез ферментов, инактивирующих антибиотики (β -лактамазы, ацетилазы, фосфорилазы, аденилазы и др.).

Геномы бактерий часто являются мозаичными, т.е. содержат вставки чужеродной ДНК различной протяженности. Мозаичность возникает в результате горизонтального переноса генов путем генетической рекомбинации (трансформации, трансдукции, конъюгации).

Наиболее часто такая мозаичность обнаруживается среди генов, определяющих факторы вирулентности, и генов устойчивости к лекарственным препаратам и связана с существованием *генных кассет*. Кассеты с генами резистентности к антибиотикам являются самыми маленькими по размеру мобильными генетическими элементами. Они содержат один ген и специфическую последовательность, выполняющую функцию рекомбинационного сайта. Кассеты являются дискретными генетическими элементами, объединенными в более крупную мобильную структуру — интегрон. Кассетный ген обычно не содержит промотора и его экспрессия зависит от промотора интегрона.

Гены, кодирующие резистентность, могут стабильно существовать, будучи невостребованными, т.е. в отсутствие селективного давления, это подтверждается существованием устойчивых к биоцидам штаммов в природных субстратах, не содержащих ХТВ. Однако не исключается возможность, что факторами отбора могут быть и другие вещества, например, тяжелые металлы, т.к. гены резистентности могут быть интегрированы в генные кассеты (клusterы), являющиеся оперонами, соединяющими гены устойчивости ко многим неблагоприятным факторам. Сохранению генов резистентности в природе благоприятствует широкий круг их хозяев, способность к взаимодействию которых столь выражена, что селекция, определяющая приспособляемость, должна была происходить задолго до эры антибиотиков, созданной человеком (например, в почвенном биоценозе, содержащем продуценты антибиотиков).

Наряду с известными ранее способами горизонтального переноса генов резистентности описан новый механизм передачи генов — *ретранспорт*, на первом этапе которого трансмиссивная плазмида донора проникает в клетку-реципиент и интегрирует с мобилизующей ею плазмидой; на втором этапе она возвращается в клетку донора, обогащенная новыми генами. Мобилизуемыми элементами могут быть не только плазиды, но и сегменты хромосомы, которые вырезаются с участием конъюгативных транспозонов.

15.3 Пути и способы предотвращения развития микробной резистентности к ХТВ

Развитие микробной резистентности и широкое ее распространение требует постоянного поиска новых антимикробных препаратов. Активные исследования, проводимые с начала эры антибиотиков, привели к тому, что скрининг с целью поиска нового продуцента часто заканчивается открытием “старого” антибиотика. Поэтому в настоящее время разрабатываются новые направления поиска:

1) препаратов, действующих на мишени, которые претерпели модификацию под действием “старых” антибиотиков;

2) ингибиторов ферментов, инактивирующих антибиотики;

3) веществ, подавляющих активный выброс антибиотика из клетки патогена;

4) против новых мишеней, например, ферментов, участвующих в синтезе белка и пептидогликана;

5) новая техника скрининга “*in vivo gene expressing technology*” против тех процессов микроорганизма, которые имеют место в организме больного, но не наблюдаются *in vitro*, например, синтез некоторых полисахаридов, факторов адгезии, ферментов патогенности и т.п. Для выявления генов, кодирующих эти процессы, сравнивают РНК-транскрипты, образующиеся *in vivo* и *in vitro*. С помощью обратной транскриптазы получают тотальную ДНК, которую исследуют в реакции гибридизации с библиотекой генов данного микроорганизма. Цель скрининга — идентификация новых генов и поиск способов инактивации их экспрессии. Наиболее перспективные мишени, не имеющие аналогов у эукариот — факторы вирулентности и механизмы регуляции их экспрессии. Последние включают распознавание условий среды (рецепцию), передачу сигнала от рецептора геному и синтез соответствующего фактора вирулентности.

Перспективны также разработки по созданию препаратов, блокирующих адгезию, систему секреции, и систему регуляции транскрипции. Один из универсальных регуляторов последней — механизм чувства кворума у микроорганизмов. Его принцип — активация транскрипции специфических генов при достижении порогового уровня связывания белка — активатора транскрипции с низкомолекулярным аутоиндуктором. Этот механизм обеспечивает быстрый рост культуры при больших посевных дозах и участвует в экспрессии факторов вирулентности. Ингибиторы детерминант вирулентности, вероятно, будут иметь низкую активность *in vitro* и, что ценно, не будут действовать на микроорганизмы, лишенные факторов вирулентности, т.е. на нормальную микробиоту.

В качестве химиотерапевтических веществ предлагаются использовать фрагменты белковых факторов врожденного иммунитета, причем видоспецифических, т.е. не являющихся чужеродными. Одним из таких факторов может быть рекомбинантный фрагмент белка нейтрофилов человека, нейтрализующий эндотоксин грамотрицательных бактерий и обладающий антимикробным действием.

Поиск новых антимикробных средств предусматривает характеристику не только генома, но и протеома, т.е. всех без исключения белков клетки для определения ее состояния в любой момент. Протеомика характеризует фенотип клетки на любой стадии клеточного цикла и в любых внешних условиях, таким образом, дает необходимые знания для таргетированного скрининга — поиска препаратов, направленных на определенную мишень (*target*).

Глава 16. ДЕЗИНФЕКТАНТЫ, АНТИСЕПТИКИ И КОНСЕРВАНТЫ

16.1 Наименование антимикробных агентов

Дезинфектанты, антисептики и консерванты — это химические вещества, которые способны убивать микробные клетки или угнетать их рост [29].

Дезинфектанты используются для обработки помещений, изделий или материалов.

Антисептики применяют для обработки кожи и слизистых оболочек человека, поэтому они не должны быть токсичными в используемых концентрациях [30].

Консерванты включают в состав фармацевтических препаратов, чтобы предупредить их микробную деградацию и поддерживать количество содержащихся в них микроорганизмов на низком и безопасном уровне. Эффективная концентрация консерванта в готовом лекарственном средстве должна быть значительно ниже токсичной дозы для человека.

16.2 Факторы, определяющие выбор антимикробного агента

Факторы, определяющие выбор антимикробного агента — это свойства химического вещества, характер микробиоты и факторы окружающей среды.

Свойства химического вещества. Эффективность действия биоцида определяется его химической природой, концентрацией, температурой, pH и продолжительностью контакта с зараженным объектом. Если вещество используется как антисептик, следует учитывать его токсичность.

Характер микробиоты определяет эффективность действия химического агента. Имеет значение чувствительность микроорганизма к данному веществу и уровень микробной контаминации. На практике не всегда возможно определить, какие микроорганизмы присутствуют в дезинфицируемом объекте, поэтому эффективность действия антимикробного агента оценивают в отношении наиболее устойчивых видов.

Вегетативные формы бактерий. В рабочих концентрациях все дезинфектанты должны убивать вегетативные формы бактерий при определенной экспозиции. Грамотрицательные бактерии обычно более резистентны, чем грамположительные, особенно устойчивы *Pseudomonas aeruginosa*, благодаря при-

существию характерного для внешней мембраны этого микроорганизма липида А, обеспечивающего защиту от проникновения многих химических веществ.

Mycobacterium tuberculosis. Туберкулезная палочка и другие кислотоустойчивые микроорганизмы высокорезистентны ко многим бактерицидным агентам. Туберкулез остается важной проблемой народного здравоохранения. Велик риск заразиться от недиагностированных больных. Возбудитель может присутствовать на оборудовании, применяющемся при обследовании больных, поэтому необходима его надежная дезинфекция.

Споры бацилл наиболее устойчивы к дезинфектантам. Против них активны некоторые альдегиды, гипохлориты и пероксид водорода. Эти вещества могут быть использованы для химической стерилизации термобильного оборудования.

Эффективность дезинфектантов оценивают по способности обезвреживать наиболее устойчивые формы микроорганизмов (табл. 26).

Грибы по своей чувствительности к дезинфектантам сравнимы с вегетативными формами бактерий. В таблице 27 приведены данные о действии некоторых веществ на патогенные грибы (*Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*) и представителя плесневых грибов *Aspergillus niger*.

Вирусы. Чувствительность вирусов к биоцидам с трудом поддается оценке, благодаря особенности их культивирования, поскольку культура ткани также может повреждаться в результате воздействия химических веществ. Как правило, вирусы, имеющие липидную оболочку, более чувствительны, чем безоболочные вирусы (табл. 28).

16.4 Влияние факторов окружающей среды.

Органические вещества (кровь, гной, молоко, остатки пищи и т. п.) резко снижают эффективность биоцидных агентов путем их адсорбции, инактивации, или препятствуя их проникновению в микробные клетки. Поэтому по мере возможности перед дезинфекцией оборудование, посуда, инструменты должны быть тщательно вымыты.

Многие материалы (ткани, резина и другие полимерные материалы) могут адсорбировать биоциды,

Антибактериальная активность некоторых химических веществ

Таблица 26.

Класс соединения	Активность против		Уровень антибактериальной активности в рабочих концентрациях
	<i>M. tuberculosis</i>	спор	
Фенолы			
крезол	+	+	высокий
хлороксиленол	-	-	низкий
бисфенолы	-	-	низкий
Спирты			
этанол	+	-	средний
изопропанол			
Альдегиды			
глутаральдегид	+	+	высокий
формальдегид	+	+	высокий
Галогены			
гипохлорит	+	+	высокий
Хлорамины			
йод, йодофоры	+	+	высокий
Водорода пероксид	+	+	высокий
Бигуаниды			
хлоргексидин	-	-	средний
ЧАС			
бензалкониума хлорид	-	-	средний
цетримид	-	-	средний
Соединения Hg			
тиомерсал (мертиолат)	-	-	низкий

Антифунгальная активность некоторых дезинфицирующих и антисептиков

Таблица 27.

Антимикробный агент	Время гибели (мин) 99,9% клеток		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Candida albicans</i>
Фенол (0,36%)	< 2	< 2	< 2
Хлоргексидина глюконат (0,02% спиртовой)	< 2	< 2	< 2
Йод (1% спиртовой)	< 2	< 2	< 2
Повидон-йод (10% спиртовой и водный)	10	< 2	< 2
Гипохлорит (0,2%)	10	< 2	5
Центримид (1%)	< 2	20	< 2
Хлоргексидина глюконат (0,05%) + цетримид (0,5%)	20	>20	>20
Хлоргексидина глюконат (0,5% водный)	20	>20	>2

снижая их концентрацию. Активность биоцидов [31] требует присутствия воды, обеспечивающей их проникновение в клетку, и зависит от содержания в ней ионов. Некоторые факторы, влияющие на активность наиболее распространенных биоцидов, приведены в табл. 29, табл. 30.

16.5 Группы химических соединений дезинфицирующих и антисептиков (рис. 69)

16.5.1 Фенолы

Фенолы — одни из первых нашли применение как дезинфицирующие и консервантные вещества. Они быстро убивают бактерии, но не их споры. Их активность замет-

но уменьшается при разбавлении растворов и в присутствии органических веществ. Они более активны при кислых значениях pH. Их главный недостаток — токсичность. Замещенные фенолы менее токсичны, но и менее активны, чем простые фенолы, особенно против грамотрицательных бактерий.

Фенол (карболовая кислота) в настоящее время применяется ограниченно. Впервые он был предложен Листером в 1867 г. как антисептик и используется как стандарт при оценке других дезинфицирующих веществ в тесте определения фенольного коэффициента.

Синтетические фенолы. Модификация молекулы фенола (рис. 70) позволяет получить производные с улучшенными свойствами. Например, хлоркрезол используется в концентрации 0,1% для консервации

Антивирусная активность* некоторых дезинфицирующих средств и антисептиков

Таблица 28.

Агент	Оболочечные вирусы оспо-вакцины, герпеса, гриппа	Безоболочечные энtero-, полиококкаки-, рино-, эковирусы	ВИЧ, HTLV III	Вирус гепатита В
Изопропанол	30%	**	20-35%	**
Этанол	40%	70-95%	20-35% (инструменты)	80%
Формальдегид	2%	8%	0,5%	2%
Глутаральдегид	2%	2%	1%	0,1-1%
Натрия гипохлорит	0,2% (акт. Cl ₂)	0,2%	0,05-0,2% (пол, мебель) 0,5% (кровь)	0,05% (чистая поверхность) 0,5% (кровь) 5% (сыворотка) **
Фенолы	1% лизол 5% фенол	**	0,5% лизол	**
Водород пероксид	**	**	0,3% **	0,05% (чистая поверхность)
Йодофоры	0,2%	0,5%		0,5% (кровь)

*Гибель вирусов через 10-30 мин. контакта при 21-25°C, титр с.10

**Нет данных

Особенности некоторых дезинфицирующих средств и антисептиков

Таблица 29.

Биоцид	Влияние на активность органических веществ	Оптимум pH	Другие особенности
Крезол	слабое	кислый	адсорбируется полимерными материалами
Хлороксиленол	сильное		
Этанол, изопропанол	слабое		используется для чистых объектов
Глутаральдегид	слабое	pH 8	не вызывает коррозии, используется для термолабильных материалов
Гипохлорит	сильное	кислый или нейтральный	вызывает коррозию металлов
Йодоформ	сильное	кислый	вызывает коррозию металлов
Цетримид и бензалкониум хлорид	сильное	щелочной	не совместимы с мылом и анионными дeterгентами
Хлоргексидин	сильное	pH 7-8	не совместим с мылом и анионными дeterгентами, инактивируется жесткой водой и полимерными материалами

Основные свойства различных групп микробиологически активных веществ

Таблица 30.

Свойства	Спирты	Альдегиды	Фенолы	Кислород- содержащие	ЧАС	Амфотозиды (ПАВ)	Гуанидины	Галоид- содержащие
Запах	++	++	++	++	+-	+-	++	++
Токсичность	-	+	++	+	-	-	+-	++
Взаимодействие с материалами и антикоррозийная активность	+-	+-	++	++	-	-	+-	++
Стабильность	+-	+	+	-	+	+	+	-
Моющий эффект	-	-	-	+-	++	++	+-	-
Экологическая безопасность	-	+-	++	+	-	-	+-	++

Примечания: (++) — очень выражено; (+) — умеренно выражено; (+-) — слабо выражено; (-) — отсутствует.

Все дезинфицирующие вещества подразделяются на следующие группы: галоидсодержащие соединения, кислородсодержащие соединения, ПАВ, щелочи, кислоты, гуанидины, альдегиды, спирты, фенолы.

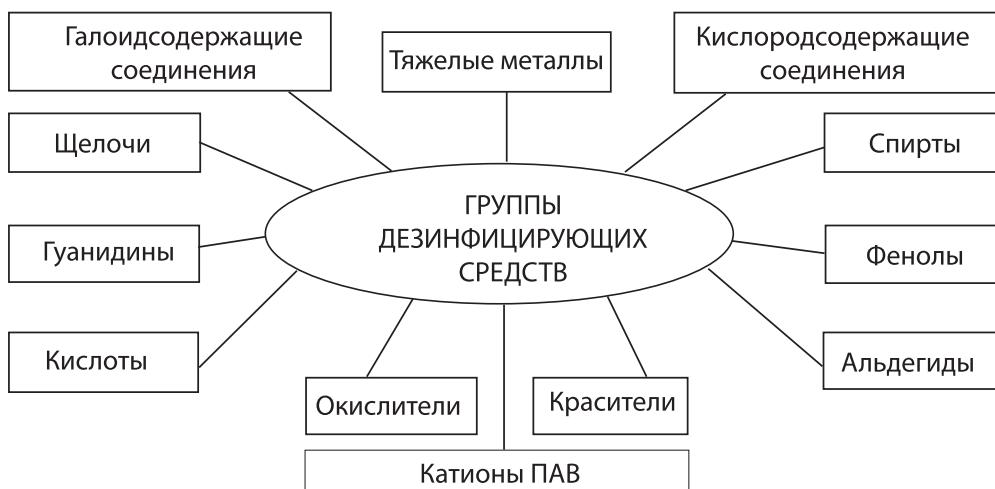


Рис. 69. Классификация ДС по химическому составу [32, 33]

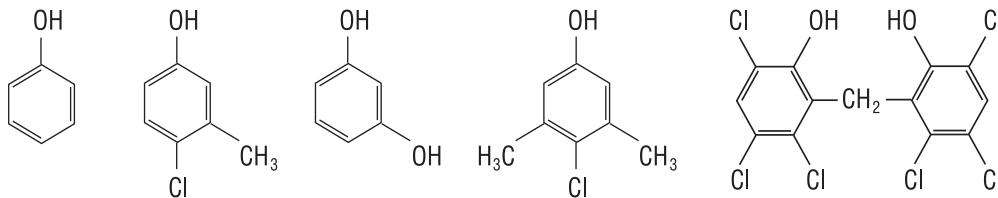


Рис. 70. Фенол и его производные.

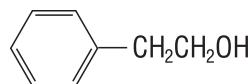
инъекционных растворов, в концентрации 0,2% — при тепловой стерилизации. Хлороксиленол используется для дезинфекции кожи в составах, включающих мыло и терпеноол для повышения растворимости в воде, обладает относительно слабой антимикробной активностью; 2-фенилфенол служит консервантом косметических продуктов; резорцин используется как антисептик.

Производные бисфенолов — гексахлорофен, триклозан используют в медицинских мылах и моющих пастах. Они обладают бактериостатическим действием, но слабо действуют на *Pseudomonas* spp.

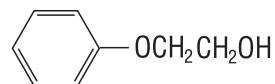
16.5.2 Спирты

Алифатические спирты (этанол, изопропанол) убивают вегетативные формы бактерий, включая мицобактерии, но не споры. Их очищающая способность и летучесть делает их полезными при обработке кожи перед инъекциями или хирургическими процедурами. Производные спиртов (рис. 71) в основном используют как консерванты.

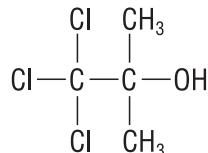
Этанол ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) широко используется как консервант и антисептик, обладает бактерицидным и вируцидным действием в концентрации 60-95%, обычно применяется 70% раствор для обработки кожи, инструментов и поверхностей. Сочетание с йодом и хлоргексидином увеличивает его биоцидную активность. Используется в фармацевтической и косметической промышленности как растворитель и консервант.



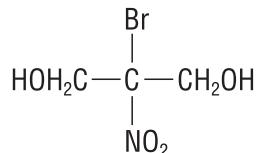
фенилэтанол



феноксиэтанол



хлорбутол



бронопол

Рис. 71. Спирты, используемые как дезинфицирующие и консерванты.

Изопропанол ($\text{CH}_3\text{CHONCH}_3$) обладает большей активностью, чем этанол, но в два раза токсичнее. На вирусы действует слабо. Используется в концентрации 70% при обработке кожи и как консервант косметических продуктов.

Бензиловый спирт ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$) обладает антбактериальным и слабым анестезирующим действием. В 1% концентрации рекомендован для консервации инъекционных растворов.

Хлорбутол (трихлоробутанол) используется как консервант инъекционных растворов и глазных капель в концентрации 0,5%. Кристаллизуется при низкой температуре, разлагается при низком pH при автоклавировании, при щелочном — при комнатной температуре.

Фенилэтанол ($C_6H_5CH_2CH_2OH$) активен против грамотрицательных бактерий, используется как консервант обычно в сочетании с другими биоцидами.

Феноксиэтанол ($C_6H_5OCH_2CH_2OH$) активен против *Pseudomonas aeruginosa*. Используется как консервант в концентрации 1% обычно в сочетании с другими биоцидами.

Бронопол (2-бromo-2-нитропропан-1,3-диол) обладает широким спектром антибактериальной активности, включая псевдомонады, широко используется как консервант в фармацевтических и косметических препаратах в концентрации 0,01-0,02%. Хорошо растворим в воде, активен в широком диапазоне pH и в присутствии поверхностно-активных веществ. Однако при щелочном pH и повышении температуры разлагается с образованием формальдегида и нитритов, последние могут реагировать со вторичными и третичными аминами, образуя потенциально канцерогенные нитрозоамины.

16.5.3 Альдегиды

Многие альдегиды обладают антимикробным действием, однако на практике используют только глутаральдегид и формальдегид, высокая активность которых позволяет их использовать для химической стерилизации.

Глутаральдегид ($CHO(CH_2)_3CHO$) убивает вегетативные формы бактерий в течение минутной экспозиции. Гибель спор наступает через 3 часа и более в зависимости от степени их термоустойчивости. Существенно не инактивируется органическими соединениями. Важное значение имеет присутствие в молекуле двух высокореактивных альдегидных групп. Мономер находится в равновесии с полимерными формами молекулы, это равновесие зависит от температуры и pH среды. При pH 8 биоцидная активность максимальна, но раствор нестабилен из-за полимеризации. Напротив, кислые растворы стабильны, но менее активны, хотя при повышении температуры увеличивается содержание свободного диальдегида и повышается биоцидная активность. На практике глутаральдегид выпускают в виде кислого 2% раствора, стабильного при хранении, который активируют перед использованием, добавляя соответствующую буферную систему. Активированный раствор может храниться 2 недели. Используется для химической стерилизации медицинских материалов, которые нельзя стерилизовать другими методами.

Формальдегид ($HCHO$) для дезинфекции используется в жидком или газообразном состоянии. Газообразный формальдегид применяют для дегидратации инфицированных помещений, а в смеси с паром низкой температуры — для стерилизации термолабильных материалов. Пары формальдегида высокотоксичны и потенциально канцерогенны при

вдыхании, поэтому при работе следует принимать меры предосторожности. Формалин (34-38% водный раствор формальдегида) используют для консервации анатомических препаратов. Токсичность формалина, его раздражающее действие на кожу и способность полимеризоваться на поверхностях ограничивают его применение как дезинфектанта. Эти недостатки могут быть частично устранены путем создания препаратов, содержащих формальдегид в замаскированном виде. Из этой группы веществ наибольшее применение получил **нокситиолин** (N -гидрокси- N -метилтиомочевина). Препарат выпускают в виде порошка. В водных растворах он медленно разлагается на формальдегид и N -метилтиомочевину. Оба компонента обладают антимикробным действием. Нокситиолин используют местно, в полостях и при лечении перитонита. Аналогичными свойствами обладает **полиноксилин** (поли [me -тиленеди (гидроксиметил)мочевина]), выпускаемый в виде геля и таблеток.

Тауоролидин (бис- [$1,1$ -диоксопергидро- $1,2,4$ -тиадиазинил-4]метан) содержит две молекулы таурина и три формальдегида. Он более стабилен в растворе, чем нокситиолин, и применяется для тех же целей. Более активен, чем формальдегид.

Гексамин (**метенамин**) в кислых растворах образует формальдегид за счет трансформации мочевины. Использовался для лечения инфекций мочевого тракта, однако дает побочные эффекты и имеет ограниченное бактериостатическое действие.

Ронгалит (натрия формальдегида сульфоксилат) является восстановителем, его применяют как консервант и антиоксидант.

16.5.4 Бигуаниды

Хлоргексидин-основание (рис. 72) плохо растворяется в воде, поэтому применяется в виде солей — ацетата, глюконата и гидрохлорида. Наибольшую антимикробную активность проявляет при pH 7-8 в виде дикатиона. Его активность снижается в присутствии анионных соединений — мыла и других анионов, образующих нерастворимые соли. Поэтому для приготовления растворов нельзя применять жесткую воду, а только деионизированную или дистиллированную. Органические вещества также снижают его активность. Флаконы с растворами нельзя закрывать корковыми пробками, поскольку содержащийся в них танин инактивирует хлоргексидин. Обладает высокой антибактериальной активностью, однако не действует на вирусы, споры и микобактерии. Широко применяется как антисептик и дезинфектант. Не раздражает кожу и слизистые оболочки.

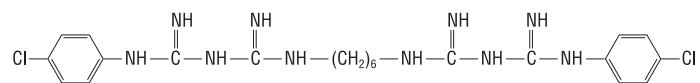
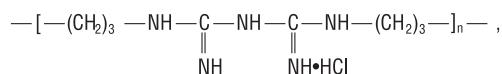


Рис. 72. Хлоргексидин.

Полигексаметиленбигуаниды — это смесь полимеризованных гексаметиленбигуанидов:



где n в среднем составляет 5,5. Обладает высокой антибактериальной активностью и низкой токсичностью.

16.5.5 Поверхностно-активные вещества

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) подразделяют на анионные, катионные и амфолитные (амфотерные) соединения в соответствии с ионизацией гидрофильной группы молекулы, в которой присутствует также гидрофобная группа. Анионные и амфотерные ПАВ слабо действуют на микроорганизмы или полностью неактивны. Однако некоторые из них повышают чувствительность микроорганизмов к другим биоцидам, изменяя проницаемость клеточных мембран. Антимикробной активностью обладают катионные ПАВ, из которых наибольшее значение имеют четвертичные аммониевые основания (ЧАС, рис. 73). Их активность зависит от длины углеродной цепи радикала и максимально у соединений, имеющих радикал от C_8 до C_{18} . Эти вещества наиболее активны при нейтральном или слабощелочном pH, инактивируются при pH ниже 3,5, поэтому они несовместимы с анионными и амфотерными ПАВ, возможно, из-за образования мицелл. Органические вещества инактивируют ЧАС.

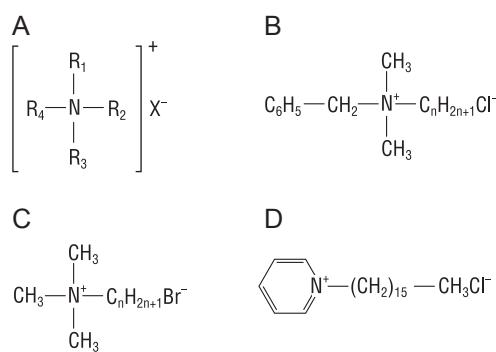


Рис. 73. Четвертичные соединения аммония: А — общая формула; В — бензалкониум хлорид ($n = 8 — 18$); С — цетримид ($n = 12, 14$ или 16); Д — цетилпиридиния хлорид.

Бактерицидное действие против грамположительных бактерий и грибов проявляется в разведении до 1:200 000, грамотрицательных — до 1:30 000; для уничтожения *Pseudomonas aeruginosa* требуется более высокая концентрация. На споры и вирусы ЧАС в рабочих концентрациях не действуют.

ЧАС не раздражают кожу и слизистые оболочки, поэтому их используют при обработке ран, а также в качестве консервантов некоторых препаратов. Бен-

залкониум хлорид и цетримид широко применяют в хирургии, урологии и гинекологии в виде водных и спиртовых растворов и кремов, иногда в сочетании с хлоргексидином. В больницах ЧАС используют для санитарной обработки помещений и оборудования.

16.5.6 Галогены

Препараты хлора и йода использовались в целях дезинфекции с начала XIX в. Позднее были получены их соединения, отличающиеся высокой активностью, стабильностью и удобные для практического применения [4].

Хлор служит источником получения многих антимикробных препаратов. Активность хлорсодержащих дезинфектантов выражают в единицах свободного хлора.

Гипохлориты — одна из наиболее давно известных групп дезинфектантов, быстро действуют на бактерии, грибы и вирусы, в высоких концентрациях и при продолжительной экспозиции — на кислотоустойчивые бактерии и споры бацилл. Совместимы с катионными и анионными ПАВ. Их недостатками являются коррозионная активность, способность инактивироваться органическими веществами и относительная нестабильность. Гипохлориты выпускают в виде порошка или растворов, в основном как соли калия или натрия хлорноватистой кислоты (HOCl). В растворе гипохлорит натрия существует в равновесном состоянии:



Хлорноватистая кислота — сильный окислитель, в состоянии ионизации в кислой среде образуются ионы:



Концентрация иона OC1^- определяет антимикробную активность раствора. Она максимальна при pH — 5, однако в кислой среде препарат нестабилен. Поэтому его хранят в виде щелочного раствора, а перед употреблением переводят в активную форму. Рабочий раствор используют в течение суток.

Органические соединения хлора. К этой группе принадлежат N-хлоропроизводные сульфонамидов, *хлорамин* и *дихлорамин*, *галазон* (рис. 74), N-хлоропроизводные гетероциклических соединений, содержащих в кольце атом азота, например, *дихлоризоциануровая кислота*. Последнюю выпускают в сухом виде как соли натрия или калия. Перед употреблением их растворяют в кислой среде.



Рис. 74. Галазон

Хлороформ (CHCl_3) ограниченно используется для консервации растворов. Благодаря своей летучести он может испаряться из растворов, что может сопровождаться ростом микроорганизмов.

Йод обладает широким спектром антимикробной активности. Его применяют в виде тинктуры, содержащей 2,5% йода и 2,5% калия йодида в 90%-ном этаноле, а также раствора Люголя (5% йода в 10%-ном растворе калия йодида). Активность йода менее, чем хлора, зависит от температуры, pH и присутствия органических веществ. Его недостаток — раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки, а также окрашивание кожи.

Йодофоры — препараты, содержащие йод (*phor* — носитель), обладают меньшим раздражающим действием с сохранением активности йода. В качестве носителей используют полимерные соединения (полиэтиленоксид, полипропилен, поливинилпирролидон) и некоторые ПАВ. Неионные или катионные ПАВ повышают растворимость йода; эти препараты стабильны, добавление перед употреблением фосфорной или лимонной кислоты до pH ниже 5 повышает их активность. Йод в них присутствует в виде мицеллярных агрегатов, которые диспергируются при разбавлении раствора, освобождая йод.

В комплексе с поливинилпирролидоном часть йода связывается с полимером, однако основная его часть существует в форме трийодида. Разбавление раствора приводит к ослаблению связи с носителем и освобождению йода.

16.5.7 Кислоты и эфиры

В фармацевтической практике в основном используют органические кислоты, которые в растворе диссоциируют не полностью. Антимикробной активностью обладает кислота в недиссоциированной форме, поэтому при выборе условий применения необходимо учитывать константу диссоциации K и значение рK (pH, при котором степень диссоциации составляет 50%).

Бензойная кислота ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$) одна или в сочетании с другими консервантами часто используется в фармацевтической практике. Значение рK для бензойной кислоты 4,2, поэтому ее следует использовать для консервации таких растворов, pH которых не более 5,0, предпочтительно 4,0. Для препаратов орального применения ее используют в концентрации 0,05-0,1%. Возможно развитие резистентности. Бензойную кислоту в комбинации, например, с салициловой кислотой используют для лечения поверхностных микозов.

Сорбиновая кислота — широко используемый консервант как в виде кислоты, так и ее калиевой соли, имеет значение рK 4,8; ее активность, как и бензойной кислоты, уменьшается с повышением pH. Наиболее эффективна при pH 4 или ниже. Обычно применяется

для консервации сиропов и гелеобразных фармацевтических продуктов.

Серы диоксид, сульфиты и метабисульфиты. Серы диоксид широко используется как консервант пищевых продуктов и в пивоваренной промышленности. В фармацевтических препаратах натрия сульфит и метабисульфит действуют как консерванты и антиоксиданты.

Борную кислоту используют в качестве антисептика в виде раствора или порошка для обработки кожи и слизистых оболочек. Хорошая всасываемость и медленное выведение из организма ограничивают ее применение.

Уксусная кислота в виде 0,25-2%-ного раствора применяется для обработки наружного уха и нижних отделов мочевыводящих путей. Активна против *Pseudomonas* spp.

Салициловая кислота применяется в спиртовых растворах (1-2%), присыпках, мазях, пастах как антисептик, например, при дерматомикозах.

Эфиры n-гидроксibenзойной кислоты (парабены) имеют значение рK 8-8,5, поэтому их активность менее зависит от pH среды, чем активность кислот. Парабены (метиловый, этиловый, пропиловый и бутиловый эфиры, рис. 75) можно применять для консервации растворов с pH 7-8, однако оптимальная активность проявляется в кислой области pH. Они активны против грибов, в меньшей степени — бактерий; псевдомонады способны использовать парабены как источник углерода. Парабены используют для консервации эмульсий и кремов. Для гетерофазных препаратов удобно использовать комбинации эфиров: водорастворимый метиловый эфир (0,25%) защищает водную фазу, а пропиловый и бутиловый эфиры — гидрофобную фазу. Парабены несовместимы с неионными ПАВ.



Рис. 75. Парабены (R — метил, этил, пропил, бутил или бензил).

16.5.8 Окислители

Водорода пероксид и надкислоты — мощные антимикробные агенты, действуют на споры. В концентрации 3-6% водорода пероксид (H_2O_2) применяется для дезинфекции, в более высокой (до 25%) — для химической стерилизации. Надуксусная кислота — также сильный биоцид, однако корродирует металлы, токсична и инактивируется органическими веществами.

Калия перманганат в 0,01-0,5%-ных растворах обладает сильным бактерицидным действием.

Тяжелые металлы. Препараты, содержащие ртуть и серебро, одними из первых получили применение как антисептики, однако теперь они постепенно выходят из употребления и заменяются менее токсичными. Соединения ртути высокоэффективны, однако

к ним образуются резистентные штаммы, кроме того, они представляют опасность как загрязнители окружающей среды. В медицине используют мертиолат (тиомерсал) и фенилртути нитрат или ацетат (рис. 76). Соли фенилртути в концентрации 0,001-0,004% используют для консервации глазных капель, инъекционных растворов, раствора для контактных линз, иногда в комбинации с другими веществами. Ртутьорганические соединения в значительной степени адсорбируются из растворов резиновыми и полимерными материалами.

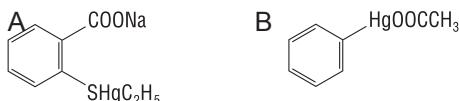


Рис. 76. Органические соединения ртути: А — мертиолат, В — фенилртути ацетат.

Помимо этого в качестве антисептиков применяют серебра нитрат (ляпис), протаргол (содержит 7,8-8,3% серебра), колларгол (коллоидный раствор, содержащий 70% серебра), меди сульфат (0,25%-ный раствор), цинка окись в виде присыпок и мазей.

Диамидины (пропамидин, дигидропропамидин, рис. 77) используют как консерванты; пропамидин (0,1%) — глазных капель, дигидропропамидин (0,15%) — кремов и глазных мазей. Их активность снижается при кислом pH и в присутствии органических веществ. Возможно развитие резистентности.

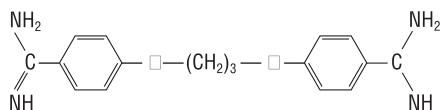


Рис. 77. Пропамидин.

16.5.9 Красители

Производные трифенилметана обладают бактериостатической активностью в основном в отношении грамположительных микроорганизмов. Органические вещества снижают их активность. Наиболее часто применяют кристаллический фиолетовый (генициановый фиолетовый) и бриллиантовый зеленый в виде 0,5%-ных водных или спиртовых растворов для обработки мелких ран, ожогов и при поверхностных бактериальных или микотических заболеваниях кожи.

Акридиновые красители (рис. 78) одинаково действуют на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Действие проявляется медленно. Неактивны в отношении спор бацилл и грибов. Уровень активности зависит от степени ионизации молекулы. Для наиболее часто используемых 3,6-диаминоакридина (профлавина) гемисульфата и 9-аминоакридина (аминакрина) гидрохлорида оптимально значение pH 7,5. Эти вещества не инактивируются сывороткой. Применяются для обработки ран и ожогов.

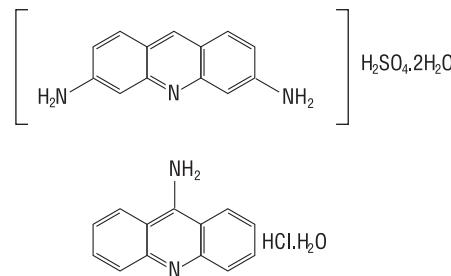


Рис. 78. Акридиновые красители: профлавин (А), аминоакрина гидрохлорид (В).

Производные хинолина наиболее активны против грамположительных бактерий и грибов. Для местного применения используют производные 8-гидроксихинолина: калия гидроксихинолин сульфат, клиохинол, хлорхинальдол и халькинол. Эти вещества являются хелатными агентами и активны только в присутствии двухвалентных металлов, например, меди и железа.

Из производных 4-аминохинальдина используют декалина хлорид (бис-четвертичное аммониевое соединение) при инфекциях ротовой полости и глотки и декалина ацетат в глазных каплях. *Лауролина ацетат* (ЧАС) — дезинфицирующее средство для кожи. Как катионные ПАВ они несовместимы с анионными агентами, фенолом и хлорокрезолом.

Подробное описание дезинфицирующих и антисептиков может оказаться полезным при выборе оптимального средства для борьбы с микробной контаминацией в условиях производства или в клинической практике.

16.6 Применение антимикробных химических веществ в качестве антисептиков

Антисептики в используемых концентрациях оказывают бактериостатическое или бактерицидное действие, которое проявляется достаточно быстро; при правильном применении они не оказывают вредного воздействия на организм человека.

Основные антисептики и область их применения приведены в табл. 31.

16.7 Применение антимикробных химических веществ в качестве консервантов

Консерванты вводят в состав как стерильных, так и нестерильных лекарственных средств для предотвращения роста микроорганизмов, попадающих в них во время технологического процесса, или при неоднократном употреблении. Основные консерванты, применяемые в фармацевтическом производстве, приведены в таблице 32.

Антисептик	Состав препарата	Область применения
Спирты	60-70% раствор	для обработки неповрежденной кожи
Галогены	5% в этаноле	для обработки неповрежденной кожи, при порезах и ссадинах
Йода раствор		
Йодинол	1% водный раствор, содержит 0,1% йода, 0,3% калия йодида, 0,9% поливинилового спирта	при хроническом тонзиллите, гнойном отите, озне, гнойных хирургических заболеваниях, трофических язвах, ожогах
Йодонат	водный раствор ПАВ с йодом	для обработки операционного поля
Повидон-йод	комплекс йода с поливинилпирролидоном раствор	для обработки кожи
	Люголя, раствор йода и калия йодида в глицерине	для обработки слизистых оболочек
Хлорамин Б	0,5-2% раствор 0,25-0,5% раствор	для обработки инфицированных ран для обработки рук
Хлоргексидина биглюконат (гигиантан)	0,5% водно-спиртовой раствор 0,5% водный раствор 0,5% спиртовой раствор или 1% водный раствор мазь "Сибикорт" (содержит 1% хлоргексидина и 1% кортизона)	для обработки операционного поля для обработки ран, ожогов для обработки рук при экземе и дерматитах
Альдегиды		
Формальдегид	водный раствор	для обработки кожи рук и ног (при потливости)
Лизоформ	мыльный раствор формальдегида	в гинекологической практике, для мытья рук
Гексаметилентетрамин	входит в состав препаратов кальцекс, уробесал. В кислой среде распадается с выделением формальдегида	при инфекциях мочевыводящих и желчевыводящих путей, кожных заболеваниях
Циминаль		При пиодермии, трофических язвах, ожогах, инфицированных ранах
Цимизоль	аэрозольный препарат	то же
Цидипол		для индивидуальной профилактики венерических заболеваний
Кислоты и щелочи		
Кислота уксусная	0,25-2% раствор	для обработки наружного уха и нижних отделов мочевыводящих путей
Кислота салициловая	в 1-2% спиртовых растворах входит в состав присыпок, мазей, паст	при дерматомикозах
Аммиака раствор	0,5% раствор (содержит 9,5-10,5% аммиака)	для обработки рук хирурга
Нашатырный спирт		
Тяжелые металлы		
Серебра нитрат (ляпис)	водные растворы	при эрозиях, язвах, конъюнктивите, трахоме, гиперпластическом ларингите
Протаргол	содержит 7,8-8,3% серебра	при конъюнктивите, блефарите, бленорее
Колларгол	коллоидный раствор, содержит 70% серебра	для промывания гнойных ран, уретры, мочевого пузыря, для лечения конъюнктивитов
Меди сульфат	0,25% раствор	при конъюнктивитах, уретритах, вагинитах
Цинка окись	присыпки, мази, пасты	при кожных заболеваниях
Свинцовый пластирь		при гноино-воспалительных заболеваниях кожи
Производные фенолов Резорцин	спиртовые растворы, мази	при кожных заболеваниях
Катионные ПАВ		
Циригель		для обработки рук хирурга
Дегмид	1% раствор	для обработки рук и операционного поля
Этоний		при трофических язвах, дерматозах, кератитах
Роккал		для обработки рук хирурга и операционного поля
Красители		
Метиленовый синий	1-3% раствор	при ожогах, пиодермии, фолликулитах
Бриллиантовый зеленый	0,2% раствор 0,5% раствор	для промывания мочевого пузыря при гнойных заболеваниях кожи

Таблица 31 (продолжение).

Антисептик	Состав препарата	Область применения
Этакридина лактат	0,05-0,2% раствор 1% раствор	для обработки ран, промывания полостей для смазывания слизистых оболочек
Окислители		
Раствор водорода пероксида концентрированный (пергидроль)	содержит 27,5-31% H ₂ O ₂	при ангинах, стоматитах, для лечения гнойных ран
Раствор водорода пероксида	содержит 3% H ₂ O ₂	для полоскания полости рта, очистки ран
Калия перманганат	0,1-0,5% раствор 0,01-0,1% раствор	для промывания ран для полоскания полости рта и горла

Консерванты лекарственных средств

Таблица 32

Консервант	Лекарственные формы и средства	Концентрация, %
Альдегиды		
Формальдегид	Парентеральные Дерматологические	2 0,05-0,2
Ронгалит	Парентеральные	0,05
Гуанидина производные		
Хлоргексидина	Мази	до 0,1
диацетат	Глазные, назальные, ушные капли	0,005-0,01
Хлоргексидина дигидрохлорид	Глазные и назальные ПС	0,005-0,01
Кислоты неорганические и их соли		
Кислота борная	Глазные и назальные капли в многодозовых контейнерах	
Натрия метабисульфат	Парентеральные	
Натрия сульфит		
Кислоты органические и их натриевые соли		
Кислота бензойная	Оральные	0,1-0,2
Кислота дегидроацетовая	Глазные и назальные капли, инъекционные ЛС	0,2
Кислота салициловая	ЛС наружного действия	0,1-0,5
Кислота сорбиновая	Оральные и дерматологические мази	0,005-0,2 0,2
Ртути органические соединения*		
Мертиолат (тимеросал)	Иммунобиологические препараты, назальные, ушные, глазные, инъекционные ЛС	0,01-0,02
Фенилртуть азотнокислая	Глазные капли, инъекционные ЛС	0,1-0,2 0,001-0,002
Фенилртуть борнокислая	Глазные, назальные, инъекционные ЛС, ЛС наружного действия	0,002-0,004 0,01
Фенилртуть уксуснокислая	Глазные, назальные, ушные, инъекционные ЛС, ЛС наружного действия	0,002-0,005 0,007-0,01

Примечание: * — органические соединения ртути могут обладать нейротоксическим действием, вызывать кератопатию, поэтому их не рекомендуют для длительного применения. В производстве вакцин в настоящее время мертиолат заменяют феноксиэтанолом или другими альтернативными соединениями.

Глава 17. МЕТОДЫ ДЕЗИНФЕКЦИИ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ, АНТИСЕПТИКОВ И КОНСЕРВАНТОВ

17.1 Методы дезинфекции

Наши знания о свойствах возбудителей, способах их выведения из организма хозяина, участии тех или иных факторов в передаче заразного начала определяют и выбор метода дезинфекции — физический, химический или биологический (рис. 77) [28].

Физический метод предполагает использование таких дезинфекционных агентов, как механические, тепловые, лучистая энергия, радиоактивное излучение.

При механических способах дезинфекции обеспечивается, в основном, удаление, а не уничтожение микроорганизмов. К ним относятся: вытряхивание, выколачивание, чистка, мытье, фильтрация, вентиляция. Наиболее хороший эффект достигается при использовании пылесосов. Фильтрация, в частности, является одной из составных частей очистки водопроводной воды. Другой пример фильтрации — респиратор, который весьма эффективно защищает человека от микроорганизмов, находящихся в воздухе. Так, повязка из двух слоев марли задерживает до 74% микроорга-

низмов, из четырех — до 88%, а из шести — до 97%. К резкому снижению концентрации микрофлоры в воздухе приводит вентиляция. В то же время проветривание помещений через форточки, фрамуги, окна не может рассматриваться как надежное дезинфекционное мероприятие, так как скорость воздухообмена зависит от многих параметров, трудно поддающихся учету и регулированию (разница между температурой воздуха снаружи и в помещении, скорость движения атмосферного воздуха, величина и месторасположение окон и т. д.). В этой связи вентиляция (проветривание) помещений рассматривается как подсобная мера и используется в практике при условии достаточной продолжительности (не менее 30-60 мин).

Температурное воздействие. Гибель микроорганизмов под воздействием высоких температур связана с коагуляцией белка. Источниками тепла, которые могут применяться в качестве дезинфекционных агентов, являются огонь, вода, сухой или влажный горячий воздух, водяной пар.

Огонь как термический агент используется для уничтожения зараженных предметов, а также для их



Рис. 77. Классификация методов и способов дезинфекции

прокаливания. Сжиганию подвергаются малооцененные предметы. В ряде случаев (при особо опасных инфекциях) сжиганию подвергаются трупы животных. Прокаливание в пламени предметов является обычным способом обеззараживания в лабораторной практике.

Пастеризация используется для уничтожения вегетативных форм микроорганизмов в различных пищевых продуктах путем прогревания до температуры 70-80°C в течение 30 мин.

С целью дезинфекции в качестве термического воздействия используется горячая вода, которая довольно быстро денатурирует белок микроорганизмов. При этом вегетативные формы возбудителей погибают уже при температуре воды +60°C. Ввиду качественных различий белков отдельных микроорганизмов сроки гибели для отдельных видов возбудителей при этой температуре колеблются в пределах 10-45 мин. С повышением температуры воды они, естественно, сокращаются, а при температуре 100°C все вегетативные формы микроорганизмов погибают моментально или через 1-2 мин.

Особое внимание следует обратить на дезинфекцию белья данным методом. Прогревание его водой не может происходить быстро в связи с затрудненным перемещением частиц воды внутри вещей. Прогревание в глубине идет за счет теплопроводности ткани белья. При плохой теплопроводности и высокой теплоемкости, которыми характеризуются ткани, процесс теплопередачи совершается очень медленно. Практически для обеспечения сплошного прогревания белья до температуры кипения белье следует кипятить не менее 30-90 мин. в зависимости от его количества и теплопроводности и теплоемкости тканей. Для ускорения прогревания белья оно должно перемешиваться, что успешно осуществляется в современных стиральных машинах. Дезинфекция белья кипячением является наиболее простым, эффективным и щадящим способом.

Сухой воздух, как и вода, нагревается путем конвекции, однако, в отличие от воды, его теплопроводность в 25 раз ниже. Каждая частица сухого воздуха несет в себе тепла в 4 раза меньше, чем вода. Поэтому прогревание предмета сухим горячим воздухом будет происходить очень медленно. При дезинфекции одежды, имеющей низкую теплопроводность и высокую теплоемкость, для достижения дезинфицирующего эффекта при применении сухого горячего воздуха требуется высокая температура (не менее 140°C) и длительный период времени. При этих условиях одежда может обугливаться. Сухой горячий воздух применяется для стерилизации медицинского инструментария, в микробиологической практике. Под воздействием горячего воздуха выше 100°C протоплазма микробной клетки обезвоживается и свертывается, что приводит к ее гибели. Свойства горячего воздуха используются в воздушных стерилизаторах для стерилизации ИМН в воздушных камерах для дезинфекции вещей, а так-

же при проглаживании разных тканей. Температура утюга, в зависимости от режима нагрева, достигает 200-300°C. Однако горячий воздух по эффективности уступает водяному пару, поскольку в основном оказывает поверхностное действие.

Влажный горячий воздух по сравнению с сухим обладает во много раз большей бактерицидностью. Это связано с действием тепла во влажной среде, а также с тем, что влажный горячий воздух несет в себе большой запас тепла за счет водяного пара, выделяющего скрытую теплоту парообразования при конденсации в вещах. В связи с этим влажный горячий воздух прогревает вещи быстрее и глубже, чем сухой.

Водяной пар — это газообразное состояние воды. Водяной пар с температурой 100°C и выше является одним из лучших обеззараживающих средств по надежности действия, поскольку имеет свойство проникать в глубь обеззараживаемых объектов. Степень обеззараживающего действия водяного пара зависит от его температуры, давления и степени насыщенности. Под воздействием водяного пара белки микробной клетки набухают и свертываются, в результате чего она гибнет. Свойства водяного пара используются в дезинфекционных камерах и паровых стерилизаторах. Испарение, переход воды из жидкого состояния в газообразное, происходит при любой температуре, но только на поверхности воды. При кипении переход воды в пар происходит во всем ее объеме. Для дезинфекции используется водяной пар, образующийся при кипении. Применение водяного пара в дезинфекционной практике основано на том, что он при превращении в воду выделяет большую скрытую теплоту парообразования. Пар чаще всего применяется при камерной дезинфекции. Камерное обеззараживание вещей как обязательное противоэпидемическое мероприятие предусматривается при ряде инфекционных болезней (туберкулез, чума, сибирская язва, холера, сыпной тиф, брюшной тиф и др.). Камерному обеззараживанию подвергают те вещи, которые по тем или иным причинам не могут быть обеззаражены кипячением, замачиванием в химических растворах различных дезинфектантов или другим путем (верхняя одежда, постельные принадлежности (матрас, подушка, одеяло) и другие объемные мягкие вещи).

Для обеззараживания вещей, взятых из квартиры больного для заключительной дезинфекции, и для санитарной обработки людей, контактировавших с больными, санитарно-эпидемиологическая служба располагает санитарными пропускниками, которые оснащены различными дезинфекционными камерами. При санитарной обработке людей их вещи также подлежат камерному обеззараживанию. Дезинфекционные камеры устанавливают в инфекционных и других ЛПУ. В них по мере необходимости, а также в целях профилактики подвергают дезинфекции верхнюю одежду, постельные принадлежности.

17.1.1 Паровой способ

Паровой способ обеззараживания и паровые камеры получили широкое распространение и постепенно вытеснили горячевоздушные камеры, которые используются теперь весьма ограниченно. Недостатком этого способа является практическая трудность использования паровоздушной смеси для обеззараживания меховых и кожаных изделий, так как температура, превышающая 80°C, и относительная влажность 80% и более приводят к порче кожи и меха. В настоящее время найдены более благоприятные сочетания температуры и относительной влажности, позволяющие без применения формалина обеспечить надежную дезинфекцию меховых и кожаных вещей. К отрицательным факторам паровоздушной смеси следует отнести также определенное увлажнение вещей, обеззараживаемых в камере. Однако данные недостатки по сравнению с теми положительными сторонами, которыми этот физический дезинфекционный агент обладает (простота эксплуатации дезинфекционных камер, экономичность, несложные мероприятия по технике безопасности, отсутствие токсикологических факторов и т. д.), незначительны.

Кожаные и меховые изделия, промыщенное сырье (шерсть, щетина), любые носильные вещи, постельные принадлежности и другой мягкий инвентарь можно дезинфицировать в пароформалиновых камерах. Действующим агентом при дезинфекции пароформалиновым способом является паровоздушная смесь в сочетании с формальдегидом при температуре от 40° до 59°C. Использование формальдегида в сочетании с паром позволяет осуществлять дезинфекцию при более низких температурах, которые дают возможность обеззараживать без порчи кожаные, меховые и резиновые изделия. При пароформалиновой камерной дезинфекции на поры тканей оказывают дезинфицирующее воздействие пары формальдегида.

17.1.2 Ультрафиолетовое излучение

Бактерицидное действие солнечной энергии связано с ультрафиолетовыми лучами солнечного спектра. Наибольшей бактерицидностью обладают ультрафиолетовые лучи, имеющие длину волны в пределах 2500-2600 ангстремов. Бактерицидный эффект, скорее всего, связан с прямым фотохимическим действием ультрафиолетовых лучей на протоплазму клеток микроорганизмов. Бактерицидное действие зависит от длины волны, количества лучей, времени облучения, биологических особенностей микроорганизма и качественной характеристики среды, в которой находятся микроорганизмы. Опыты показывают, что после облучения воздуха ультрафиолетовыми лучами в течение более 30 мин. количество микрофлоры резко снижается.

Ультрафиолетовое излучение — это электромагнитные волны, длины которых находятся в интервале

от 205 до 315 нм. Наибольшей бактерицидной активностью обладает излучение при длине волны 265 нм, вызывающее в большей степени фотохимические повреждения ДНК микробной клетки.

Результат воздействия ультрафиолетового излучения на микроорганизм зависит от видовой принадлежности последнего и от энергии излучения, поглощенной клеткой, т. е. от дозы облучения. Отношение энергии излучения к площади облучаемой поверхности обозначается как *поверхностная бактерицидная доза* (Hs); отношение энергии излучения к объему облучаемой среды обозначается как *объемная бактерицидная доза* (Hu).

17.1.3 Ионизирующее излучение

В отдельных случаях применяется ионизирующее излучение.

В мировой практике для ПСО ИМН широко используется *ультразвук*. Под воздействием ультразвука акустические потоки в замкнутом объеме образуют огромное число микропотоков раствора, которые обеспечивают многократное гидромеханическое воздействие на микроучастки обрабатываемой поверхности, проникая в труднодоступные места.

Эффект кавитации — непрерывного появления и захлопывания пузырьков в сочетании с термоударом — вызывает разрушение загрязнения на поверхности.

Полезным физическим явлением при ультразвуковой обработке поверхностей является дегазация, т. е. уменьшение в растворе содержания газа в растворенном состоянии и в виде пузырьков. При большой концентрации газовые пузырьки снижают качество обработки, так как мешают доступу раствора к участкам обрабатываемых поверхностей.

17.1.4 Биологический метод

Биологический метод находит применение на небольшой группе объектов. Примерами такой дезинфекции являются: фильтрация воды на водопроводных станциях (биологическая пленка, образующаяся на поверхности фильтра), обезвреживание сточных фекальных вод (биологические станции очистки сточных вод) и биотермический способ обезвреживания твердых органических отбросов (компостирование, биотермические камеры).

17.1.5 Химический метод

Чаще других для целей дезинфекции применяется химический метод, т. е. используются химические вещества — дезинфектанты.

Они должны обладать широким спектром действия; иметь микробоцидный эффект; хорошо растворяться в воде или образовывать с ней или воздухом стойкие активные сусpenзии, эмульсии, аэрозоли, ту-

маны; обладать низкой токсичностью и низкой аллергенностью; сохранять активность в обеззараживаемой среде; не повреждать обрабатываемые объекты. Сырье, из которого изготавливают дезинфектанты, должно быть доступным, а сам дезинфектант — недорогим.

Более 35% химических средств дезинфекции относятся к группе ПАВ. Обладая рядом ценных качеств (малая токсикологическая и эколого-гигиеническая опасность, наличие моющих свойств, достаточная бактерицидная эффективность в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий и др.), такие ДС характеризуются недостаточной вирулицидной активностью, что ограничивает сферу их применения в современных условиях эпидемиологического неблагополучия по туберкулезу, гепатитам и т. п., а также существующей угрозы биотероризма. Последнее обстоятельство представляется особенно важным в связи с применением споровых форм микробов (сибирская язва) в террористических целях.

17.2 Динамика дезинфекции

Процесс гибели микробных клеток, помещенных в среду с антимикробным агентом, может быть изображен графически (рис. 78).

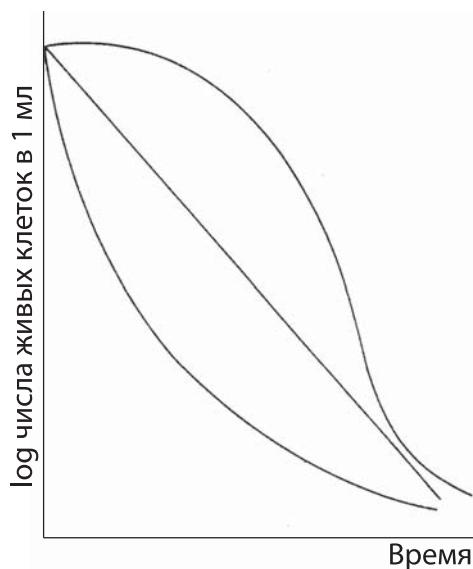


Рис. 78. Динамика гибели микробных клеток в среде с дезинфектантом.

При этом возможна ситуация, когда процесс гибели будет подчиняться законам кинетики первого порядка (А) и эффективность дезинфекции можно оценить, используя константу:

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{N_0}{N},$$

где K — константа скорости гибели клеток;
 N_0 — начальное число живых клеток;
 N — число живых клеток в момент времени t .

Однако чаще наблюдаются случаи, когда график представляет сигмоидную кривую (В), отражающую гибель наименее устойчивой части популяции в начальный период, гибель основной части популяции, обладающей средним уровнем резистентности, в средний период и сохранение наиболее устойчивых клеток в конечной стадии эксперимента.

При высокой концентрации дезинфектанта происходит быстрая гибель основной части популяции в начальный период времени (С).

Генетическая неоднородность бактериальной популяции не позволяет использовать законы кинетики первого порядка для оценки эффективности дезинфектантов, однако методы, основанные на определении количества живых клеток или времени гибели популяции, дают вполне адекватные результаты. При этом необходимо учитывать влияние факторов внешней среды (температуры, pH, состава среды), а также микробную нагрузку (количество микробных клеток в определенном объеме).

17.3 Методы испытания антимикробной активности антисептиков и дезинфектантов

При испытании жидких форм определяют микробоцидную концентрацию антисептика при заданной экспозиции, спектр антимикробного действия и эффективность антисептика в приближенных к практике условиях [28]. Испытания проводят на стандартных тест-культурах следующих видов: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* и *Mycobacterium terrae*.

M. terrae культивируют на среде Левенштейна — Иенсена, другие бактерии и грибы — на средах, рекомендованных для определения чувствительности к антибиотикам и исследования микробной контаминации лекарственных препаратов.

Плотность микробной взвеси должна составлять 10^8 - 10^{11} КОЕ/мл (КОЕ — колониеобразующая единица). Взвесь готовят на 0,5%-ном растворе натрия хлорида с нейтральным pH. Для опытов с белковой нагрузкой в суспензию добавляют 20% сыворотки крови или 0,2% альбумина.

Экспозицию устанавливают от 30 с до 5 мин. Для установления действующей в этот срок концентрации готовят растворы с содержанием антисептика 100, 75, 50, 25, 12%.

Параллельно проводят контрольный эксперимент по определению чувствительности тест-культуры к фенолу в концентрации 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06%. В раствор антисептика вносят взвесь тест-культуры (на 1 мл раствора 0,1 мл взвеси.) По истечении экспозиции антисептик нейтрализуют и смесь высевают

на стандартную для данного штамма среду. В качестве нейтрализатора используют вещество, инактивирующее определенный класс соединений или все классы антисептических препаратов. К последнему типу относится смесь, содержащая 3% твина-80 и по 0,1% сапонина, цистеина и гистидина.

При допуске новых препаратов в медицинскую практику ставят:

- а) качественный суспензионный тест;
- б) количественный суспензионный тест;
- в) тест, приближенный к практике использования антисептика.

Качественный суспензионный тест ставят по описанному выше методу. Тест-культуры: *St. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*. Плотность микробной суспензии должна соответствовать 10^8 - 10^9 КОЕ/мл. Срок инкубации культур после высея: для бактерий 48 час. при 37°C, для *C. albicans* — 72 час. при 20-25°C.

Для гигиенической антисептики препарат считается пригодным, если он угнетает рост всех тест-штаммов при экспозиции 0,5-1 мин в допустимой по переносимости концентрации. Препарат, предназначенный для хирургической антисептики рук, должен угнетать рост всех тест-культур при экспозиции 3-5 мин.

Количественный суспензионный тест.

Тест-культуры — *St. aureus*, *E. coli*; плотность взвеси $1-1,5 \times 10^9$ КОЕ/мл. Для каждой культуры готовят два ряда разведений антисептика: без белковой защиты и с добавлением 0,2% альбумина. Экспозиция препарата и культуры 0,5, 1 и 5 мин. Далее смесь нейтрализуют и высеивают на питательный агар.

Активность препарата оценивают по степени снижения величины КОЕ/мл по сравнению с контролем (микробная взвесь без антисептика). Препараты для гигиенической антисептики должны снижать КОЕ/мл в рекомендуемой для применения концентрации при экспозиции 0,5-1 мин. не менее, чем в 10^5 раз, препараты для хирургической антисептики должны обеспечить такую же степень снижения КОЕ/мл за 3-5 мин.

Тест с условиями, приближенными к практическому применению, ставят на людях-добровольцах. На кожу кисти рук наносят взвесь *E. coli* (1×10^{11} КОЕ/мл), подсушивают 3 мин. на воздухе и протирают руки испытуемым раствором антисептика: для гигиенической антисептики 1 мин., используя 3 мл препарата, для хирургической — 5 мин. 2-3 раза, используя по 5 мл препарата. Далее делают смыв с рук жидкой питательной средой. В контроле

а) делают смыв с контаминированных рук без обработки антисептиком,

б) руки обрабатывают 3 мл стандартного антисептика (изопропанола) дважды по 30 с, после чего делают смыв.

Разведения смывов (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) засевают на питательный агар и инкубируют при 37°C 48 час. Оценку эффективности испытуемого препарата проводят путем сравнения степени снижения количества тест-микроорганизма после обработки рук испытуемым и стандартным антисептиками.

Определение антимикробной активности антисептиков в мягких и твердых формах проводят на плотной питательной среде, засеянной тест-культурой. Образцы размещают на поверхности среды или в лунках, подобно тому, как это делают при испытании антибиотиков чашечным методом. Об активности препарата судят по диаметру зоны задержки роста вокруг образца в сравнении со стандартным препаратом.

Испытуемый препарат можно растворить или эмульгировать в жидкой среде (например, в буферном растворе с соответствующим эмульгатором) и определить его активность методами, описанными выше для жидких форм.

17.4 Определение эффективности консервантов лекарственных средств

Консерванты вводят в состав как стерильных, так и нестерильных лекарственных средств (табл. 32) для предотвращения роста микроорганизмов, попадающих в них во время технологического процесса, или при неоднократном употреблении [28]. Они не должны использоваться, чтобы замаскировать низкое качество производства. Учитывая возможность побочного действия, консерванты следует применять только при строгой необходимости. Требования к консервантам:

- широкий спектр антимикробной активности;
- быстрота биоцидного действия;
- отсутствие взаимодействия с компонентами лекарственного средства;
- стабильность;
- отсутствие раздражающего или токсического действия биоцида или продуктов его распада.

Однако немногие вещества отвечают этим идеальным требованиям. При использовании консерванта следует учитывать ряд факторов, влияющих на эффективность его действия: микробная нагрузка, температура, pH, состав лекарственного средства.

В мультифазной системе консервант распределяется неравномерно в соответствии с его гидрофильной или гидрофобной природой. Консервант может адсорбироваться на материале первичной упаковки, что снижает его активность. Концентрация летучих веществ (хлороформа) может снижаться при повторном открывании контейнера.

Все лекарственные препараты, в состав которых входят консерванты, разделяются на категории, представленные в таблице 33.

Категория	Лекарственные препараты	
	ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0069-07	USP 33
1	Инъекционные и другие парентеральные лекарственные препараты, включая эмульсии. Лекарственные препараты для введения в полость уха, носа (стерильные), офтальмологические средства, водорастворимые или приготовленные на водной основе	Парентеральные, офтальмологические, внутриматочные и интрамаммарные лекарственные препараты
2	Лекарственные препараты, применяемые местно, нестерильные лекарственные препараты для введения в полость носа, эмульсии, в том числе и на слизистые	Лекарственные препараты для введения в полость уха, носа, лекарственные препараты, используемые в виде кожных аппликаций и для ингаляций
3	Лекарственные препараты для приема внутрь, за исключением антацидов, водорастворимые или приготовленные на водной основе	Лекарственные препараты для приема внутрь, ректального введения, для нанесения на слизистую оболочку рта
4	Антацидные лекарственные препараты, приготовленные на водной основе	-

Условия культивирования тест-микроорганизмов для приготовления инокулята

Тест-штамм	Питательная среда*	Температура инкубации	Время инкубации
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 или ATCC 25922	Соево-казеиновый агар или среда № 1	(32,5 ± 2,5)°C	18-24 ч
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Соево-казеиновый бульон или среда № 8		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (или NCTC 885-653)	Агар Сабуро с глюкозой или среда № 2, жидкая среда Сабуро или соево-казеиновый бульон	(22,5 ± 2,5)°C	48 ч
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 (или ATCC 9642)	Агар Сабуро с глюкозой или среда № 2	(22,5 ± 2,5)°C	6-10 сут

* — допускается использование альтернативных жидких и агаризованных питательных сред отечественного и зарубежного производства.

Определение эффективности антимикробных консервантов в настоящее время выполняют в соответствии с ОФС 42-0069-07 «Определение эффективности антимикробных консервантов лекарственных средств» ГФ XII изд., ч. 1, с. 216-219.

Эффективность консервантов определяют в отношении определенных видов бактерий и грибов. В качестве тест-микроорганизмов используют виды бактерий и грибов, которые являются наиболее частыми контаминантами ЛС:

Escherichia coli ATCC 8739 (или ATCC 25922),
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027,
Staphylococcus aureus ATCC 6538,
Candida albicans ATCC 10231 (или NCTC 885-653),
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 (или ATCC 9642).

Помимо перечисленных тест-штаммов можно использовать и другие микроорганизмы, которые должны быть типичными по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Набор тест-штаммов микроорганизмов может быть уменьшен или увеличен в зависимости от способа применения или состава испытуемого ЛП. Все тест-штаммы микроорганизмов, получен-

ные из Государственных коллекций с сертификатом производителя в ампулах, на дисках или в другом виде следует восстанавливать способами, описанными в прилагаемых к тест-штаммам инструкциях или в соответствии с ГФ XII изд. ОФС «Микробиологическая чистота». Условия культивирования тест-штаммов для приготовления инокулята представлены в таблице 34.

Контроль ростовых свойств используемых питательных сред проводят в соответствии с ГФ XII изд. ОФС «Микробиологическая чистота».

При приготовлении инокулята суточные культуры тест-штаммов бактерий и *C. albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9% раствором натрия хлорида. Концентрацию клеток бактерий доводят до 10^9 КОЕ/мл, а *C. albicans* — до 10^7 КОЕ/мл, используя стандартный образец мутности или инструментальные методы, в том числе турбодиметрический.

Для смыва конидий *A. brasiliensis* используют стерильный 0,9% раствор натрия хлорида, содержащий 0,05% твина-80. Количество конидий *A. brasiliensis* в 1 мл смыва определяют с помощью камеры Горяева или чашечным агаровым методом. Полученную взвесь разводят до концентрации 10^7 конидий в 1 мл.

Стандартизованные суспензии всех тест-штаммов микроорганизмов разводят до концентрации 10^7 - 10^8 КОЕ/мл, а для препаратов 4 категории — 10^5 - 10^6 КОЕ/мл.

Для определения эффективности консервантов используют готовые ЛП в неповрежденной упаковке.

В 5 стерильных флаконов помещают достаточное количество испытуемого препарата. В каждый флакон вносят по 0,1 мл (но не менее 0,5% от объема исследуемого препарата) одного из приготовленных инокулятов тест-штаммов (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*) для получения концентрации 10^5 - 10^6 КОЕ в 1 мл или 1 г испытуемого образца и перемешивают.

Образцы лекарственных препаратов на твердой матовой основе нагревают до температуры ($47,5\pm2,5$)°С. Смешивают инокулят каждой стандартизованной микробной суспензии с образцом препарата в течение не менее 1 минуты до достижения гомогенной эмульсии. Для улучшения смешивания можно добавить определенное (валидированное) количество стерильного поверхностно-активного вещества, например, твина-80, если оно не влияет на жизнеспособность микроорганизмов или на эффективность консерванта.

Фактическую исходную концентрацию бактерий и грибов в контаминированных образцах определяют сразу после контаминации. Для этого чашечным агаровым методом делают посев на соответствующие питательные среды (таблица 34), используя подходящие разведения для получения на чашке от 30 до 300 колоний бактерий и от 10 до 100 колоний грибов. Для этой цели также можно применять метод мембранный фильтрации при условии растворимости ЛП в водных растворителях или изопропилмитристате.

Контаминированные образцы препаратов выдерживают при температуре ($22,5\pm2,5$)°С в защищенном от света месте в течение определенного времени. Через 7, 14 и 28 сут. после инокуляции образцов препаратов 1 категории и через 14, 28 сут. препаратов 2 и 3 категорий определяют количество жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл образца, делая высып на чашки Петри.

В случае необходимости в чашки с питательной средой или в соответствующее разведение лекарственного средства перед посевом вводят инактиватор (нейтрализатор) антимикробного действия определенного вещества, указанный в ОФС «Микробиологическая чистота».

Учет результатов испытания проводят после посева чашечным агаровым методом, определяя количество КОЕ/мл для каждого тест-штамма через указанные выше сроки инкубации контаминированного образца. Изменение количества микробных клеток по сравнению с исходной концентрацией в 1 мл выражают в десятичных логарифмах (lg). При оценке эффективности антимикробного действия консервантов увеличение КОЕ/мл не фиксируется, если последую-

щее измерение не отличается от предыдущего более, чем на 50%. Антимикробные консерванты лекарственных средств считают эффективными, если наблюдают уменьшение количества клеток бактерий в соответствии с критериями, описанными в таблице 35.

В период с 7 до 14 сут. не должно наблюдаться увеличения числа бактерий. Количество клеток дрожжеподобных и плесневых грибов не должно увеличиваться на протяжении всего срока исследования для всех категорий лекарственных средств.

Критерии оценки эффективности антимикробных консервантов лекарственных препаратов в отношении бактерий

Таблица 35.

Категория препарата	Уменьшение количества клеток бактерий, \log_{10}		
	7 сут.	14 сут	28 сут
1	1	3	Не должно быть
2	-	2	быть
3	-	1	увеличения
Уменьшение количества клеток грибов, \log_{10}			
1, 2, 3	Не должно быть	увеличения	
4	По сравнению с исходной концентрацией через 14 и 28 сут не должно быть увеличения		

Испытание проводят с использованием следующих питательных сред:

- Соево-казеиновый агар (Casein Soya Bean Digest agar)

Панкреатического гидролизата казеина	15,0 г
Папаинового гидролизата бобов сои	5,0 г
Натрия хлорида	5,0 г
Агара бактериологического	15,0 г
Воды очищенной	1000 мл
pH после стерилизации	7,3±0,2

Альтернативная отечественная среда для выращивания аэробных бактерий — Среда № 1 для контроля микробной загрязненности

- Соево-казеиновый бульон (Casein Soya Bean Digest Broth)

Панкреатического гидролизата казеина	17,0 г
Папаинового гидролизата бобов сои	3,0 г
Натрия хлорида	5,0 г
Калия фосфата двузамещенного	2,5 г
Глюкозы моногидраты	2,5 г
Воды очищенной	1000 мл
pH после стерилизации	7,3±0,2

Альтернативная отечественная среда для выращивания бактерий — Среда № 8 для контроля микробной загрязненности

- Бульон Сабуро (Sabouraud- 2% Dextrose Broth)

Пептона (мясного)	5,0 г
Пептона (казеинового)	5,0 г
Глюкозы моногидраты	20,0 г
Воды очищенной	1000 мл
pH после стерилизации	5,6±0,2

• Агар Сабуро с глюкозой (Sabouraud 4% Glucose Agar)

Пептона (мясного или казеинового)	10,0 г
Глюкозы моногидрата	40,0 г
Агара бактериологического	15,0 г
Воды очищенной	1000 мл
pH после стерилизации	5,6±0,2

Альтернативная отечественная среда для выращивания дрожжевых и плесневых грибов — Среда № 2 (агар Сабуро с глюкозой) для контроля микробной загрязненности

Для предотвращения роста бактерий перед стерилизацией добавляют 50 мг хлорамфеникола (левомицетина) на 1 л среды или перед использованием добавляют 0,1 г натриевой соли бензилпенициллина и 0,1 г тетрациклина на 1 л среды в виде стерильных растворов.

Глава 18. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ И АНТИСЕПТИКОВ

18.1 Действие антисептиков на микробную клетку

Действие антисептиков на микробную клетку неспецифично, т.е. их мишень может находиться и в клетках млекопитающих. Мишени действия антисептиков разнообразны и присутствуют в клеточной стенке, мембранах и цитоплазме.

В низких концентрациях антисептики вызывают лизис микробных клеток, возможно, воздействуя на ферменты, принимающие участие в синтезе клеточной стенки, таким образом, что они изменяют свои функции, дезинтегрируя ее. Лизис клеточных стенок *E. coli*, стафилококков и стрептококков наблюдали в присутствии следующих веществ (указаны концентрации в %): формалин 0,12, фенол 0,32, ртуть хлорид 0,0008, натрия гипохлорит 0,005, мертиолат 0,0004. Глутаровый альдегид нарушает структуру клеточной стенки грамположительных бактерий, вызывая не обратимое образование в ней перекрестных связей.

Воздействие на цитоплазматическую мембрану сопровождается нарушением мембранного потенциала, ферментов мембранны и ее проницаемости. Нарушение мембранного потенциала приводит к разобщению транспорта электронов и фосфорилирования, препятствует переносу протонов через мембрану, что приводит к прекращению энергетических процессов, направленных к синтезу АТФ. Подобные явления наблюдаются в присутствии таких веществ, как тетрахлорсалициланилид, трикарбанилид, трихлор-карбанилид, пентахлорфенол и 2-феноксистанол.

Ингибирование ферментов, ассоциированных с мембраной, приводит к нарушению многих процессов метаболизма. Гексахлорофен угнетает активность ферментов цепи переноса электронов, подавляя метаболическую активность аэробных бактерий. Хлоргексидин ингибирует мембранны АТФазу, воздействуя таким образом на анаэробные процессы. Антисептики, содержащие ртуть, бронопол и др. ингибируют ферменты, содержащие тиоловые группы (-SH). В присутствии избытка соединений, содержащих тио-группы (цистеин, тиогликолаты), такие антисептики утрачивают активность.

Многие антисептики (ЧАС, фенол, гексилрезорцин и др.) нарушают проницаемость мембранны, что сопро-

вождается утечкой цитоплазматического содержимого. Клетка теряет калий, пуриновы, пириимины сахара и другие метаболиты. Если действие антисептика кратковременно, наблюдается лишь бактериостатический эффект.

Цитоплазма представляет собою сложную много-компонентную систему молекул и субклеточных частиц, каждая из которых может в той или иной степени подвергаться воздействию антисептиков. Высокие концентрации биоцидов, например хлоргексидина, фенола, солей ртути, вызывают общую коагуляцию цитоплазмы. В присутствии водорода пероксида и п-хлормеркурбензоата происходит диссоциация рибосом на субчастицы. Акридиновые красители способны встраиваться в структуру ДНК, нарушая тем самым ее функции. Многие антисептики взаимодействуют с тиоловыми группами белков, например, галогены могут их окислять. Формальдегид, глутаровый альдегид и серы диоксид реагируют с аминогруппами. Высокореактивные агенты воз действуют на многие клеточные системы. Например, β -пропиолактон алкилирует амино-, имино-, гидроксильные и карбоксильные группы, взаимодействует с тио- и дисульфидными группами, нарушая структуру белков и других макромолекул. Подобной активностью обладает и этилена оксид. Высокой реактогенностью обладают также серы диоксид, сульфиты и бисульфиты.

В таблице 36 приведены данные о клеточных мишениях, подвергающихся воздействию различных антисептиков.

18.2 Резистентность микроорганизмов к антисептикам и дезинфектантам

Микроорганизмы существенно различаются по своей резистентности к действию биоцидов (табл. 37). Как и по отношению к антибиотикам, различают естественную (природную) и приобретенную резистентность к антисептикам и дезинфектантам.

Естественная резистентность связана с природными особенностями строения микробной клетки и ее метаболизма: наличием защитных покровов, образованием биопленок, способностью к ферментативной деградации или активному выбросу ксенобиотиков из клетки. Микробной деградации подвергаются все виды ПАВ и другие дезинфектанты в концентрации

Свойства	Антисептики																	
	Акридиновые красители	Спирты	Анилиды	Бронопол	Хлоргексидин	Соли Cu ⁺⁺	Этилена диоксид	Формальдегид	Глутаровый альдегид	Гексахлорфен	H ₂ O ₂	Гипохлориты	Йод	Соединения ртути	Фенолы	β-пропиолактон	ЧАС	Соли Ag
Клеточная стенка							+		+		+		+		+			
Мембранный потенциал	+								+				+					
Фермент мембран: цепь переноса электронов									+									
ATФаза					+		+		+									
Ферменты с тиогруппами	+				+		+		+		+		+		+		+	
Проницаемость мембраны	+		+		+								++		+			
Коагуляция цитоплазмы					+++		+++		++		+++		+++		+++		+++	
Рибосомы													+		+			
Нуклеиновые кислоты	+								+		+		+		+		+	
Тиогруппы					+		+		+		+		+		+		+	
Аминогруппы									+		+		+		+		+	

Примечание: + Антисептик действует в низких концентрациях; +++ Антисептик действует в высоких концентрациях

ниже действующей, а иногда и в рабочей концентрации, например, бензалкониум хлорид, как и другие ПАВ, *P. aeruginosa* использует в качестве источника углерода. Этот микроорганизм наиболее часто обнаруживается в растворах дезинфицирующих наряду с представителями других родов (табл. 38).

Чувствительность микроорганизмов к хлоргексидину

Таблица 37.

Микроорганизмы	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
Грамотрицательные	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100-500
<i>P. cepacia</i>	5-100
<i>Proteus mirabilis</i>	25-100
<i>Serratia marcescens</i>	3-50
<i>Salmonella typhimurium</i>	14
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1-12
<i>Escherichia coli</i>	1-5
Грамположительные	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1-2
<i>Streptococcus faecalis</i>	1-3
<i>Bacillus subtilis</i>	1-3
<i>Streptococcus mutans</i>	0,1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,7-6
Грибы	
<i>Candida albicans</i>	7-15
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3
<i>Penicillium notatum</i>	200

новения химических веществ. Однако ПАВ, особенно ЧАС, разрушают липополисахаридный слой внешней мембраны и проникают внутрь клетки. Под электронным микроскопом видно, как на поверхности клеток, обработанных ЧАС, появляются вздутия, которые увеличиваются в размере и отделяются от клетки в виде пузырьков, состоящих из липополисахаридов, белков и фосфолипидов. Частичная компенсация повреждения внешней мембраны возможна за счет фосфолипидов, которые образуют бислой. Но если повреждение слишком велико, клетка утрачивает внешний барьер проницаемости, биоцид проникает внутрь, вызывая необратимые изменения структур и метаболитов.

Микроорганизмы, наиболее часто обнаруживаемые в дезинфицирующих

Таблица 38.

Биоцид	Роды загрязняющих микроорганизмы
Хлоргексидин	<i>Pseudomonas, Serratia, Enterobacter, Klebsiella, Escherichia, Chromobacter, Candida, Aspergillus</i>
Фенол и его препараты	<i>Pseudomonas</i>
Хлорамин	<i>Bacillus, Pseudomonas, Staphylococcus, Enterobacteriaceae</i>
Водорода пероксид	<i>Staphylococcus, Escherichia, Klebsiella</i>
Формальдегид	<i>Pseudomonas</i>

Изменения в структуре внешней мембраны могут влиять на ее проницаемость и устойчивость клетки к биоцидам. Примером может служить *Pseudomonas aeruginosa*, которая по своей устойчивости превосходит другие грамотрицательные бактерии. Возможной причиной этого может быть повышенное содержание фосфатных групп в липиде А, характерное для этого микроорганизма.

18.3 Проницаемость клеточных оболочек и резистентность

Проницаемость клеточной стенки грамотрицательных бактерий во многом определяется наличием внешней мембраны, защищающей клетку от проник-

Важной особенностью *грамотрицательных бактерий*, определяющей их устойчивость к биоцидам, является способность к адгезии на поверхностях с образованием биопленок, представляющих организованное сообщество клеток, объединенных массой экзополисахарида (гликокаликса). Верхние слои гликокаликса защищают внутреннюю часть от проникновения биоцида. Клетки, обитающие внутри биопленки, ограничены в доступе питательных веществ и растут медленно. Эти факторы способствуют повышению их резистентности к неблагоприятным условиям среды.

Грамположительные бактерии, как правило, более чувствительны к биоцидам, хотя и в этой группе появляются резистентные штаммы. Например, устойчивость *Staphylococcus aureus* к фенолам и ЧАС зависит от присутствия на поверхности клеток липидов, которые защищают микроорганизм от проникновения биоцидов.

Споры выдерживают концентрации биоцидов, в несколько тысяч раз превышающие концентрации эффективные в отношении вегетативных клеток. Соединения ртути, ЧАС, хлоргексидин, фенолы и спирты практически не обладают спороцидной активностью, хотя могут задерживать прорастание спор. Этилена оксид, β -пропиолактон, формальдегид, глутаровый альдегид, водорода пероксид и галогены убивают споры, однако их действие достаточно медленное, процесс стерилизации должен продолжаться от 30 мин до нескольких часов. Резистентность спор обеспечивает их уникальная клеточная оболочка, которая препятствует проникновению биоцидов внутрь клетки и, возможно, нейтрализует действие некоторых из них. Споры разных микроорганизмов различаются по своей чувствительности к стерилизующим агентам. Помимо генотипической вариабельности существует и фенотипическая зависимость резистентности спор от условий выращивания микроорганизма.

Микобактерии высокорезистентны к действию дезинфицирующих (наиболее эффективны фенолы); при возможности для их уничтожения следует применять тепловую обработку. Защитными свойствами обладает клеточная стенка микобактерий, содержащая большое количество воскоподобных липидов, образующих гидрофобные слои. Существенную роль в составе липидов играют мицелевые кислоты. Клеточная стенка обеспечивает кислотоустойчивость этих микроорганизмов, которая служит основой их дифференциального окрашивания путем обработки карболовым фуксином при нагревании. При комнатной температуре процесс требует 18-часовой экспозиции. Окрашенные клетки устойчивы к обесцвечиванию спиртом и разбавленными кислотами, с чем и связано происхождение термина “кислотоустойчивость”.

Приобретенная резистентность появляется в результате изменений в генетическом аппарате бактерий, в результате отбора устойчивых мутантов

в среде, содержащей биоциды. Большое значение в распространении генов резистентности имеет их горизонтальный транспорт между различными видами и родами бактерий с помощью трансмиссивных плазмид и коньюгативных транспозонов. Плазмиды могут определять множественную резистентность к биоцидам. У *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* описаны плазмиды, обеспечивающие устойчивость к соединениям ртути. Плазмиды узкого спектра контролируют образование редуктазы, переводящей Hg^{++} в металлическую ртуть. Плазмиды широкого спектра помимо редуктазы кодируют одну или несколько гидролаз, которые освобождают Hg^{++} из ртутьорганических соединений, разрывая связь ртуть — углерод. Образующаяся металлическая ртуть испаряется из среды. Существование таких процессов трансформации ртутьорганических соединений делает проблематичным их использование в качестве консервантов в фармацевтике.

Широкий круг хозяев у генов резистентности способствует их сохранению в природе, причем такие гены могут стабильно существовать даже в отсутствие селективного давления, т.е. в среде, не содержащей биоцидов. Селективные условия создаются в растворах дезинфицирующих с концентрацией, ниже рекомендуемой, и при нарушении сроков их хранения. Например, в растворах хлорсодержащих веществ часто обнаруживается снижение содержания активного хлора.

Помимо концентрации биоцида для развития резистентности популяции имеет значение состав среды (наличие защитных агентов, факторов роста), фаза развития и скорость размножения клеток. Например, *Pseudomonas aeruginosa*, выращенная на среде с недостаточным количеством магния, высокоустойчива к бензalconиуму хлориду, тогда как выращенная на среде с недостатком углерода — высокочувствительна. Большое значение имеет температура и время культивирования. Медленнорастущие клетки менее чувствительны к биоцидам, чем быстрорастущие. Поэтому необходимо строго соблюдать стандартные условия испытания активности антимикробных агентов.

Возможность быстрого развития резистентности в популяции следует учитывать на практике при применении биоцидов для дезинфекции. При продолжительном использовании какого-либо антимикробного агента микробиота, обитающая в данном объекте (госпиталь, аптека, цех, лаборатория, находящиеся там предметы, стены и пол помещений и т.д.), может приобрести высокую устойчивость к этому препарату. Для эффективного проведения всех мероприятий, обеспечивающих асептические условия работы, осуществляют ротацию биоцидов, т.е. используют несколько химических веществ, применяя их в определенном порядке.

Глава 19. ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

Иммунитет — это состояние повышенной устойчивости организма к живым телам и веществам, несущим признаки генетической чужеродности. Эти чужеродные субстанции называются антигенами. Антигенами могут быть микроорганизмы, чужеродные клетки, ткани и продукты их жизнедеятельности. Регулирование против чужеродных субстанций осуществляется иммунной системой организма. Помимо иммунной системы существуют неспецифические факторы защиты, действие которых не зависит от антигенных особенностей чужеродного агента. Современная иммунология рассматривает категории специфического иммунитета и неспецифической защиты как единый функциональный комплекс, элементы которого находятся в постоянной взаимосвязи.

Возможность возникновения заболевания в результате того или иного вредного воздействия зависит от *реактивности* организма, т.е. способности обезвредить фактор, вызывающий заболевания, например, микроб или его токсин, вывести его из организма и компенсировать полученный ущерб. Реактивность зависит от состояния макроорганизма (пола, возраста, состояния иммунной системы, наличия других заболеваний), условий его существования (режима питания, условий труда и быта), а также от качества и интенсивности воздействия вредного фактора (например, вирулентности микроорганизма, инфицирующей дозы, места внедрения).

Резистентность к действию вредных факторов связана с генетическими и анатомо-физиологическими особенностями макроорганизма и зависит от его индивидуального состояния. Снижают резистентность психические травмы, голодание, авитаминозы, радиация, отравление алкоголем, никотином, наркотиками.

19.1 Неспецифические факторы защиты

Сопротивляемость организма инфекциям зависит не только от его способности развивать иммунный ответ, т.е. высокоспециализированную форму защиты, но и от неспецифических факторов, направленных против микроорганизмов вне зависимости от их антигенного состава. *Механические* факторы (кожа, слизистые оболочки, лимфатические узлы) препятствуют проникновению микробов внутрь организма и его распространению. *Химические* факторы губительно воздействуют на микробные клетки. К последним

относятся кислая среда желудка, желчь кишечника, жирные кислоты пота и отделяемого сальных желез, лизоцим, содержащийся в слюне, слезах и отделяемом слизистых оболочек, antimикробные вещества, продуцируемые лимфоцитами и клетками печени, интерферон и др.

19.1.1 Воспаление

Сложным комплексом неспецифических защитных реакций является *воспаление*, которое включает ряд изменений, прежде всего капиллярных кровеносных сосудов и соединительной ткани, возникающих в ответ на болезнетворный раздражитель. При воспалении наблюдается изменение структуры ткани и ее физиологических функций, выделение жидкости из сосудов (эксудация) и разрастание (пролиферация) соединительной ткани. Воспаление характеризуется повышением температуры, покраснением и припухлостью воспаленного очага и болезненными ощущениями. Расширение сосудов и утечка плазмы сопровождается выпадением фибрин, который закупоривает сосуды, тем самым ограничивая распространение по ним микробов. В очаге воспаления скапливаются фагоцитирующие лейкоциты, которые захватывают микробные клетки. Активации лейкоцитов способствуют особые вещества, освобождающиеся из тканей, — лейкотоксин, лейкопенический фактор, гистамин и др. Скопление лейкоцитов в зоне воспаления приводит к образованию защитного вала, препятствующего распространению микробов из очага воспаления. Наблюдающиеся в зоне воспаления повышение температуры, снижение pH (ацидоз) за счет накопления молочной кислоты, понижение парциального давления кислорода (гипоксия), оказывают неблагоприятное влияние на микроорганизмы.

Воспаление вызывается самыми разнообразными раздражителями (тепло, механическое повреждение, микробная инфекция), его симптомы обусловлены особыми веществами — медиаторами воспалительных реакций, (гистамин, кинины, лейкотриены, простагландины, цитокины и др.), которые вызывают расширение сосудов, увеличение сосудистой проницаемости, сокращение гладкой мускулатуры, активируют фагоцитоз.

Повышение температуры, наблюдающееся при воспалении или лихорадочном состоянии, связано с освобождением эндогенного пирогена из лейкоцитов, который воздействует на терморегуляторные цен-

тры головного мозга. Высвобождению эндогенного пирогена способствуют различные активаторы, в том числе бактериальные эндотоксины, клетки бактерий и вирусные частицы.

19.1.2 Система комплемента

Система комплемента принимает участие в реакциях неспецифической защиты и в реакциях иммунного ответа. Это комплекс растворимых белков плазмы крови и белков клеточной поверхности, взаимодействие которых опосредует различные биологические эффекты: лизис клеток, хемотаксис и опсонизацию при фагоцитозе, стимуляцию воспаления и реакций гиперчувствительности. Большая часть этих белков синтезируется гепатоцитами и макрофагами. Они циркулируют в крови в неактивной форме, а при определенных условиях активируются путем каскада ферментативных реакций. Классический путь активации начинается со связывания фракции комплемента С1 комплексом антиген — антитело, далее активируются другие компоненты, в результате чего образуется липидный комплекс.

Альтернативный путь начинается с фракции С3в и включает каскад реакций с участием пропердина. При этом образуется комплекс белков, который связывается с гликоконьюгатами поверхности микробных клеток, в результате чего происходит их лизис в отсутствие антител. Многие микроорганизмы способны защищать себя от действия комплемента: они имеют поверхностные структуры, устойчивые к лизису или способные подавлять систему комплемента, например, сиаловые кислоты стрептококков, нейссерий, трепонем.

19.1.3 Система пропердина

Мощным неспецифическим фактором защиты организма является система пропердина:

это белки плазмы крови, содержащие отдельные компоненты и ионы магния, которые способны обезвреживать многие бактерии и вирусы;

лизин выделяется тромбоцитами, обладает бактерицидными свойствами, термостабилен;

адгезионные молекулы — группа гликопротеинов, обеспечивающих адгезию клетки к клетке и движение к очагу воспаления лейкоцитов, которые как бы скользят по поверхности эндотелия стенки сосуда. Кроме того, они принимают участие в фагоцитозе, циркуляции и взаимодействии лимфоцитов и в цитотоксических реакциях;

кинини — группа линейных полипептидов, которые составляют класс так называемых тканевых или локальных гормонов. Каждый из них выделяется локально системой диффузно расположенных клеток организма, они не имеют специализированных секрецирующих желез и инактивируются в месте своего вы-

свобождения. Наиболее важные из них — ангиотензины, брадакинин, вещество Р;

цитокины — группа различных протеинов, которые высвобождаются клетками млекопитающих и действуют на другие клетки через специфические рецепторы. Ответная реакция клетки-мишени зависит от ее природы и природы цитокина: пролиферация и дифференциация клеток, воспаление, гемопоэз. Цитокины, продуцируемые лимфоцитами, называют лимфокинами, они передают сигналы между различными популяциями лимфоцитов и участвуют в регуляции иммунного ответа. К цитокинам относятся также фактор роста, колониестимулирующий фактор, интерфероны, фактор некроза опухоли;

нормальные антитела содержатся в крови, продукция их не связана с заболеванием, они оказывают антимикробное действие, способствуют фагоцитозу;

интерфероны (ИФН) — группа видоспецифических белков и гликопротеинов, синтезируемых клетками организма в ответ на воздействие интерфероногенов — вирусов, бактерий, их структурных элементов, синтетических полиривонуклеотидов и других веществ, которые вызывают дерепрессию генов, кодирующих ИФН.

19.1.4 Интерфероны

ИФН, как и другие цитокины в организме, выполняют контрольно-регуляторные функции, направленные на сохранение клеточного гомеостаза, важнейшие из них — антивирусная, противоопухолевая, иммуномодулирующая и радиопротекторная. ИФН угнетают размножение вирусов, стимулируя образование в клетке комплекса белков, блокирующих трансляцию вирусной РНК. Противоопухолевая защита зависит от способности ИФН активировать цитотоксические лимфоциты, макрофаги и естественные киллеры. Кроме того, они активируют интерфероногенез (прайминг) и образование антител.

Определенные факторы направлены не на микробы или их токсины, а на восстановление нарушенных функций макроорганизма. Например, при многих инфекционных заболеваниях возникает расстройство кровообращения из-за потери тонуса артериол. Под влиянием возбуждения сосудистой системы микробными агентами происходит повышение кровяного давления, которое компенсирует потерю тонуса артериол. Повышенная температура тела губительно действует на некоторые микроорганизмы, кроме того, она активирует метаболизм фагоцитов и разрушение ими микробных клеток. Усиливается выделительная функция почек, дыхательного тракта, кишечника, слюнных и потовых желез, что способствует освобождению организма от разных вредных факторов. Все эти явления представляют собой комплекс защитно-адаптационных реакций, получивших название *стресса*. Факто-

рами, вызывающими состояние стресса (стрессорами) могут быть холод, тепло, радиация, психические травмы, патогенные микробы и их токсины. Под влиянием стрессоров гипофиз начинает выделять адренокортикотропный гормон (АКТГ), стимулирующий функцию надпочечников, которые под влиянием АКТГ начинают усиленно выделять гормон типа кортизона. Кортизон снижает реактивность ткани, уменьшает воспаление и угнетает образование антител. Гормональные препараты типа АКТГ и кортизона применяют при лечении некоторых заболеваний, когда необходимо определенным образом воздействовать на течение воспалительного процесса.

19.1.5 Фагоцитоз

Фагоцитоз — наиболее древняя по происхождению форма защиты. Она выражается в явлении захватывания и переваривания фагоцитами посторонних частиц, в том числе бактерий и разрушенных клеток. Это явление открыто русским ученым И. И. Мечниковым. Все фагоцитирующие клетки не окрашены, поэтому их называют лейкоцитами или в отличие от эритроцитов белыми клетками крови, их характеристика приведена в таблице 39.

19.2 Характеристика фагоцитирующих клеток

Процесс фагоцитоза начинается со стадии узнавания и адгезии посторонней частицы (например, микробной клетки) на мемbrane фагоцита. При этом из фагоцита вытягиваются и сливаются друг с другом псевдоподии (ложножожки), так что микроб оказывается заключенным внутри вакуоли (фагосомы), которая затем сливается с лизосомой фагоцита. В результате микроорганизм погибает под действием биоцидных факторов фагоцита (O_2 , H_2O_2 , $HClO$) и разрушается с помощью его гидролитических ферментов. Фагоцитоз, при котором происходит гибель и разрушение поглощенных клеток, носит название завершенного. Наряду с этим при некоторых инфекциях (гонорея, туберкулез, лепра, лейшманиоз, коклюш, брюшной тиф, туляремия, бруцеллез, микозы) наблюдается не-завершенный фагоцитоз, при котором микроорганизмы поглощаются фагоцитами, но не погибают, а иногда размножаются. Это связано с тем, что некоторые микробы выделяют вещества, блокирующие процесс фагоцитоза. К ним относятся микробные токсины, вещества капсулы, специфические белки, лейкоцидины, токсины. Активируют фагоцитоз соли кальция, магния, электролиты, комплемент, антитела. Кроме того, микроорганизмы могут избегать разрушения вследствие того, что они покидают фагосому до ее слияния с лизосомой и становятся недоступными для лизоцимических ферментов.

Фагоциты, кроме разрушения чужеродных клеток, еще и выполняют важную функцию антигенпредставляющих клеток иммунной системы для дальнейшего развития специфического иммунного ответа.

Естественные клетки-киллеры (ЕКК) — это лимфоциты, обладающие цитотоксичностью по отношению к клеткам-мишеням (опухолевым, содержащим вирусы и другие паразиты). Они не обладают фагоцитирующей активностью, но убивают свою жертву с помощью цитотоксических веществ. Их действие неспецифично в отличие от антиген-специфических Т-киллеров (см. ниже). Среди лейкоцитов крови человека ЕКК составляют от 2 до 12%.

19.3 Иммунитет

Иммунитет отличается высокой специфичностью своих реакций, основанной на тонких структурно-химических различиях антигенов и соответствующих им антител (иммуноглобулинов), образующихся в ответ на попадание антигена в организм [34].

По происхождению иммунитет подразделяют на *врожденный* (его также называют *наследственным* или *видовым*) и *приобретенный*. Видовой иммунитет — это невосприимчивость некоторых видов животных к болезням, поражающим другие виды. Например, люди не болеют кроличьим наスマорком, куриной холерой; животные не подвержены венерическим заболеваниям. Видовой иммунитет является следствием длительной эволюции взаимоотношений микробы и макроорганизма и зависит от их биологических особенностей, сформировавшихся в ходе естественного отбора. Степень напряженности видового иммунитета может быть абсолютной и относительной. Например, у крыс в клетках нет рецепторов к дифтерийному токсину, поэтому они обладают абсолютной устойчивостью к дифтерии. Для других животных восприимчивость к некоторым инфекционным заболеваниям можно повысить, воздействуя на них какими-либо неблагоприятными факторами, например, изменяя температуру тела, вводя гормоны, иммунодепрессанты, подвергая их ионизирующей радиации. В этом случае говорят об относительном врожденном иммунитете.

Приобретенный иммунитет по наследству не передается. Он формируется по отношению к конкретному виду возбудителя и является строго специфическим. Приобретенный иммунитет подразделяют на *естественный* и *искусственный*, а каждый из этих видов в свою очередь делится на *активный* и *пассивный*. Естественный активный иммунитет возникает после перенесенного заболевания или после инфицирования без клинических признаков заболевания. Естественный пассивный иммунитет — это иммунитет новорожденных, которые получают его от матери в период внутриутробного развития. Его продолжительность невелика — около 6 месяцев. Искусствен-

ный активный иммунитет возникает после активной иммунизации, т. е. введения вакцин и анатоксинов; искусственный пассивный — после введения иммунных сывороток или сывороточных препаратов (иммуноглобулинов).

19.4 Антигены

Антигенами называют все вещества, которые несут признаки генетической чужеродности и при введении в организм вызывают развитие специфических иммунологических реакций. Антигенные присуща белкам, многим полисахаридам, гликоконъюгатам (гликопротеинам, липополисахаридам), некоторым искусственным высокополимерным соединениям.

Для того чтобы антиген вызвал в организме иммунный ответ, он должен обладать достаточной молекулярной массой (обычно не менее 5-10 кД).

Основные понятия, характеризующие антиген: *антигенныесть* (способность вызывать иммунный ответ), *иммуногенныесть* (способность вызывать иммунитет, т. е. невосприимчивость к инфекции) и *специфичность*.

Специфичность определяется особенностями химической структуры антигена, благодаря которым один антиген отличается от другого. Химическая группировка молекулы антигена, определяющая его специфичность, называется *антигенной детерминантой (эпигеномом)*. Например, антигенная специфичность белка определяется его первичной и надмолекулярными структурами, а также поверхности расположеными группами, которые могут служить антигенными детерминантами. В молекулах гликоконъюгатов эпигеном часто является полисахарид. Специфичность антигена выражается в том, что он реагирует только с теми антителами и иммунными лимфоцитами, которые возникли в ответ на его введение.

Гаптены — это вещества, обладающие специфичностью, но не вызывающие иммунного ответа при введении в организм. Однако с готовыми антителами они взаимодействуют. Гаптены приобретают свойства полноценных антигенов после соединения с крупномолекулярными веществами (белками, полисахаридами или искусственными полизелектролитами). Соединение происходит за счет ковалентных связей или электростатических сил. Свойствами гаптенов могут обладать многие лекарственные препараты (амиодопирин, хинидин, продукты распада пенициллина и др.), которые, взаимодействуя с белками организма, могут вызывать иммунный ответ — лекарственную аллергию.

Видовая специфичность — это специфичность, благодаря которой представители одного вида отличаются от особей другого вида. Например, различается состав сывороточных белков у человека и животных,

что может быть использовано на практике, например, в судебной медицине.

Групповая специфичность обусловливает разницу среди особей одного вида. Антигены, благодаря которым особи одного вида различаются между собой, называются *изоантigenами*. К изоантigenам относятся антигены, которые содержатся в эритроцитах и определяют группы крови человека.

Состав молекул *главного комплекса гистосовместимости* (МНС — от англ. Major Histocompatibility Complex) уникален для каждого организма и определяет его биологическую индивидуальность, что позволяет отличать “свое” (гистосовместимое) от “чужого” (несовместимого). Молекулы I и II классов — это гликопротеины, которые контролируют иммунный ответ и участвуют в реакциях цитотоксичности, осуществляемых Т-лимфоцитами. Молекулы I класса МНС представлены на поверхности всех ядросодержащих клеток, молекулы II класса — преимущественно на мембране иммунокомпетентных клеток (макрофагов, В-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов). Гены III класса МНС кодируют отдельные компоненты системы комплемента.

Типоспецифичность определяет антигенные различия внутри одного вида микроорганизмов (серовары). Например, известно более 80 сероваров пневмококков, различающихся своими полисахаридными антигенами.

Гетероспецифичность обусловлена наличием гетероантигенов — общих для представителей разных видов антигенных детерминант. Общие антигены встречаются у весьма отдаленных видов: у человека и возбудителя чумы, вируса гриппа и других микроорганизмов. Это так называемые *мимикрирующие антигены*. При сходстве антигенных структур микро- и макроорганизма формирование иммунного ответа нарушено, например, в миокарде человека имеются химические структуры, сходные с антигенами стрептококков, поэтому антитела против стрептококков способны атаковать ткани сердца, что служит причиной осложнений после перенесенной скарлатины.

Антигенная структура микробной клетки представляет большой научный и практический интерес, поскольку антигены бактерий используют с целью создания вакцинных препаратов для воспроизведения искусственного иммунитета и для серологической диагностики инфекционных болезней. В состав бактериальной клетки и вирусной частицы входят сложные комплексы веществ, обладающих антигенной активностью. К ним относятся высокомолекулярные соединения белковой природы, полисахариды, липополисахариды и т. п. Антигенными свойствами обладают органоиды клеток: жгутики, мембранны, цитоплазма, рибосомы, клеточная стенка. Токсины бактерий также являются сильными антигенами.

У подвижных бактерий различают Н-антитела (жгутиковые) — термолабильные, разрушающиеся при температуре 56-80°C, состоящие из белков, и О-антитела (соматические) — термостабильные, выдерживающие нагревание до 80-100°C, имеющие липопротеидную природу.

У капсулных бактерий, например, клебсиелл, пневмококков и др. существуют полисахаридные капсулные антигены.

Антитела вирулентности (Vi) также относятся к капсулным, он описан у вирулентных видов энтеробактерий, например, у сальмонелл.

Протективный антиген не является постоянной частью микробной клетки. Он образуется в зараженном организме и обладает особенно сильным иммуногенным действием.

Антитела рибосом явились основой для разработки нового типа вакцины.

Антитела вирусов — белки, гликоконъюгаты, нуклеопротеиды, специфичны для вируса, или содержат компоненты клетки хозяина (липиды, углеводы). Многие вирусы содержат особый антиген — гемагглютинин, который выявляется в реакции гемагглютинации. Эта реакция основана на способности вирусного гемагглютинина агглютинировать эритроциты человека и животных и позволяет выявить наличие вируса в исследуемом субстрате.

Реакция гемадсорбции основана на способности эритроцитов адсорбироваться на клетках, пораженных вирусом. Обе реакции проходят без участия антител, поэтому не являются иммунологическими. Однако гемагглютин способен вызывать образование антител, которые могут быть обнаружены в реакции торможения гемагглютинации.

19.5 Антитела

Антитела — это особые белки (гликопротеины), которые образуются в организме позвоночных животных и человека при введении антигенов и обладают способностью вступать с ними в специфическую связь. Антигены, связанные с антителами, обезвреживаются и удаляются из организма.

Особое значение имеет способность антител соединяться со специфической молекулой антигена, “узнавать” даже самые тонкие различия в ее структуре, например, не только замену в молекуле белка одной аминокислоты на другую, но даже замену стереоизомеров органических соединений. Специфичность антител связана с различием в их химическом строении, т.е. в последовательности аминокислот полипептидных цепей, составляющих их структуру. Наряду с тонкими различиями в структуре антител, определяющими их иммунологическую специфичность, антитела имеют общие характерные особенности строения.

Антитела имеют глобулярную структуру и называются иммуноглобулинами. Основу структуры любого антитела (рис. 79) составляет комплекс из четырех полипептидных цепей — двух одинаковых тяжелых и двух одинаковых легких. Тяжелые цепи обозначают буквой H (heavy — тяжелый), а легкие — буквой L (light — легкий). Тяжелые и легкие цепи удерживаются вместе дисульфидными мостиками. Они уложены таким образом, что на поверхности образующейся структуры возникают два одинаковых участка, которые обозначаются Fab. Эти участки содержат центры связывания антигена. Третий участок Fc содержит структуры, обеспечивающие связывание антител с определенными клетками, несущими на своей поверхности рецепторы Fc-фрагмента, например, лейкоцитами, тучными клетками. Центры связывания антигена (активные центры) соответствуют эпиполипам антигена (подходят друг другу как замок и ключ). Взаимодействие антигена с антителом осуществляется за счет электростатических, гидрофобных взаимодействий и сил Ван-дер-Ваальса. Молекулы полных антител имеют как минимум два центра связывания с антигеном. Антитела, имеющие только один центр связывания, называются неполными.

Гипервариабельная область

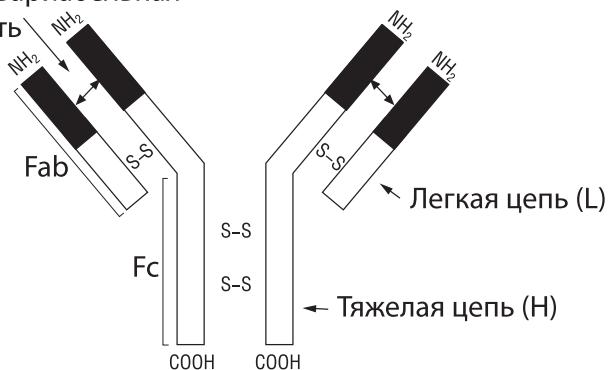


Рис. 79. Структура мономера молекулы иммуноглобулина [35, 36].

Как тяжелые, так и легкие цепи в своей структуре имеют две категории областей: вариабельные (V) и постоянные (C) по содержанию составляющих их аминокислот. Вариабельная область связана со специфичностью антител. Она находится в участке Fab, тогда как постоянная область — в участке Fc. Вторичная структура иммуноглобулинов — а-спираль, перемежающаяся сложными β -структурными — “клубками”, возникающими при сшивании аминокислотных остатков каждой цепи. Эти клубки называют доменами, они находятся на тяжелых и легких цепях вариабельных и константных участков. Активные центры антител формируются доменами вариабельных участков, которые располагаются в гипервариабельных областях тяжелых и легких цепей.

Свойства	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Молекулярная масса, кД	150	160-400	900	180	190
Константа седиментации, ед. Сведеберга	7	7	19	7	8
Период полураспада в сыворотке, сут.	21	6	10	3	2
Углеводы, %	3	7	12	13	11
Функции:					
активация комплемента	++	+-	++++	-	-
опсонизация	++++	+	-	-	-
противовирусная активность	++	+++	+	?	?
сенсабилизация тучных клеток	-	-	-	-	+

Иммуноглобулины представляют собой гетерогенную группу белков, их гетерогенность связана с существованием разных типов тяжелых и легких цепей. У человека имеется два типа легких цепей: κ и λ , (каппа и лямбда) и 5 классов тяжелых цепей α , γ , μ , δ , ϵ . В соответствии с классами тяжелых цепей иммуноглобулины подразделяют на 5 классов (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), различающихся по своим физико-химическим свойствам и биологической активности (табл. 40).

IgM — пентамер из 5 субъединиц, имеет 10 центров связывания с антигеном. Филогенетически наиболее древний, наиболее ранний, обнаруживаемый при первичном попадании антигена в организм, основной класс, синтезируемый у новорожденных и младенцев.

IgG составляют до 75% всех иммуноглобулинов, это основной класс, защищающий организм от бактерий, вирусов, токсинов и обеспечивающий формирование пассивного иммунитета у плода, поскольку только эти иммуноглобулины способны преодолевать плацентарный барьер.

IgA существует в двух видах — сывороточном и секреторном. Большая часть IgA — это секреторные иммуноглобулины (slgA), у которых два или три мономера соединены секреторным фрагментом, защищающим иммуноглобулин от разрушения ферментами. slgA присутствуют в слюне, слезах, молоке, секретируются на поверхности эпителия и слизистых оболочек, усиливая их защитные функции.

IgE специфически взаимодействуют с тучными клетками и базофильными лейкоцитами и принимают участие в развитии аллергических реакций. Их защитные функции направлены в основном против гельминтов.

IgD функционируют как мембранные рецепторы антигена на В-лимфоцитах.

Кроме различных классов (изотипов) иммуноглобулинов, между ними существуют аллотипические и идиотипические различия. Аллотипы (маркеры константной области) генетически детерминированы и наследуются. Идиотипы определяют индивидуальную характеристику каждого антитела. Идиотипические маркеры (антигенные детерминанты) локализуются в гипервариабельных областях и соответствуют антигенсвязывающим участкам антител. Все молекулы иммуноглобулинов, продуцируемые одним клоном

лимфоцитов, несут один и тот же идиотип и называются моноклональными антителами. Источником разнообразия идиотипов служат мутации ДНК, кодирующей вариабельные участки, нематричный синтез ДНК между рекомбинирующими сегментами и сдвиг точки соединения сегментов на несколько нуклеотидов.

Иммунитет, опосредованный антителами, находящимися в плазме крови и других жидкостях организма, называется гуморальным. Его механизм связан со способностью антител нейтрализовать возбудитель и его токсины, посредством опсонизации, антитоксического действия, активации комплемента и других воздействий на инфекционный агент. Опсонизация происходит путем связывания антител с поверхностью микробной клетки. Такой комплекс активно поглощается фагоцитом при взаимодействии Fc-фрагмента антитела с соответствующим Fc-рецептором фагоцита. Антитела способны взаимодействовать с рецепторами клеток, связывающими бактерии или вирусы, препятствуя их адгезии и проникновению в клетки организма-хозяина. Кроме того, антитела обладают каталитической активностью, действуя как гидролазы и оксидоредуктазы, принимают участие в нейтрализации инфекционного агента.

19.6 Иммунная система

Иммунная система представляет собою совокупность лимфоидных органов и лимфоидных клеток, которые распространяются по всему телу организма и связаны системой кровообращения, лимфотока и единой системой иммунорегуляции. Иммунная система обладает уникальной способностью вырабатывать молекулы антител, специфичные для каждого антигена. Органы иммунной системы подразделяются на первичные — центральные (костный мозг и тимус) и вторичные — периферические (селезенка, лимфатические узлы, скопления лимфоидной ткани).

Первичные — центральные органы иммунной системы обеспечивают ее самообновление. В них происходят процессы пролиферации клеток — предшественников, их дифференцировка и созревание, в результате чего они превращаются в иммунокомпетентные клетки.

тентные клетки, выходят в циркуляцию и заселяют периферические органы иммунной системы.

Костный мозг — место образования полипотентной стволовой клетки, которая дает начало разным росткам кроветворения, в том числе миеломоноцитарному и лимфоцитарному. В костном мозге образуются цитокины; у млекопитающих это возможное место созревания В-лимфоцитов (см. ниже).

Тимус (вилочковая железа) — место созревания и дифференциация Т-лимфоцитов. Тимус активно вырабатывает лимфоциты в период эмбриогенеза, достигает максимального размера у большинства позвоночных вскоре после рождения, затем постепенно инволюционирует. У человека самая высокая продукция Т-лимфоцитов сохраняется до двух лет жизни, затем быстро падает. Однако количество Т-лимфоцитов сохраняется на достаточном уровне, т. к. это долгоживущие клетки, кроме того, они способны пролиферировать в ответ на встречу со специфическим антигеном. В процессе созревания и дифференциации предшественники Т-лимфоцитов из костного мозга поступают в корковый слой тимуса, постепенно мигрируют внутрь и приобретают свои маркеры, контактируя с клетками тимуса и продуцируемыми ими медиаторами (специфическими пептидами) и цитокинами.

В тимусе происходит элиминация потенциально аутореактивных клеток. Основная функция зрелых Т-лимфоцитов — распознавание чужеродных антигенов, но не антигенов собственного организма (автоантигенов). Элиминация состоит в том, что Т-лимфоциты, имеющие рецепторы для аутоантигенов (их в популяции 95-98%), получают сигнал для апоптоза, а Т-клетки, обладающие рецепторами для чужеродных антигенов — сигнал для пролиферации. Апоптоз (программированная гибель) — это процесс распада клетки на отдельные фрагменты, которые могут быть использованы для построения других клеток.

Вторичные — периферические органы иммунной системы — это место встречи иммунокомpetентных клеток с антигеном, его распознавания и развития специфического иммунного ответа (взаимодействия иммунокомpetентных клеток и синтеза иммуноглобулинов).

Лимфатические узлы распространены по всему телу организма. Один лимфоузел имеет массу около 1 г и содержит приблизительно 2×10^9 лимфоцитов. Каждый час из него выходит в лимфу количество лимфоцитов, равное его утроенному весу. Он отфильтровывает микробные клетки и другие частицы, в нем развивается иммунный ответ на антигены, попадающие в лимфу.

В *селезенке* развивается иммунный ответ на антигены, попадающие в кровь. Она удаляет из крови чужеродные частицы, а также состарившиеся и поврежденные эритроциты. При удалении селезенки ее функцию

берут на себя лимфоидные органы, у таких пациентов иммунитет ослаблен.

Лимфоидная ткань ассоциирована со слизистой оболочкой кишечника, глотки, дыхательных путей, мочеполового тракта. Ее функция — активация В-лимфоцитов, продуцирующих иммуноглобулины классов А и Е.

19.7 Иммунокомpetентные клетки

Иммунокомpetентные клетки — это клетки, принимающие участие в иммунном ответе. Они постоянно циркулируют между кровью, лимфой и лимфоидными органами, чтобы обеспечить встречу со “своим” антигеном, т. к. каждый антиген распознается лишь небольшой частью популяции лимфоцитов. Лимфоциты — единственные клетки, способные распознавать антиген и отвечать на контакт с ним. Индивидуальные лимфоциты специализированы: они способны (коммитированы) отвечать лишь на определенную группу структурно сходных антигенов. Эта коммитированность существует еще до первого контакта с антигеном и выражается в наличии у лимфоцита мембранных рецепторов, специфичных для детерминант определенного антигена. Лимфоциты являются исключительно неоднородной популяцией клеток: считают, что число рецепторов лимфоцитов с различными антигенсвязывающими центрами составляет не менее 10^6 . Кроме того, лимфоциты различаются по их функциям в процессе иммунного ответа и другим физиологическим особенностям.

В-лимфоциты получили свое название потому, что исследования, проведенные на птицах, показали, что местом их дифференциации является особый лимфоидный орган — бурса (сумка) Фабрициуса. У млекопитающих это лимфоидный орган, о локализации которого пока нет единого мнения (костный мозг, лимфоидная ткань слизистой оболочки кишечника).

В-лимфоциты в ходе иммунного ответа дифференцируются в клетки, продуцирующие иммуноглобулины. Они распознают антигенные детерминанты с помощью рецепторов, представляющих иммуноглобулины классов D или M. Кроме того, они обладают другими рецепторами, для распознавания сигналов в процессе иммунного ответа. Они способны распознавать антиген в растворе и связывать белковые, полисахаридные и липопротеиновые антигены.

Срок жизни большей части популяции В-лимфоцитов (около 85%) составляет не более 10 дней, около 14% живут 4-6 недель, около 1% живут десятилетиями, это клетки иммунологической памяти.

Т-лимфоциты — основные клетки иммунологической памяти, они различаются по своим функциям

ям, дифференцируются по поверхностным маркерам, определяемым серологическими методами.

T-эффекторы СД8⁺ продуцируют многочисленные цитокины, которые способствуют их дифференциации и пролиферации, а также активируют В-лимфоциты и макрофаги.

Цитотоксические лимфоциты (CTL, Т-киллеры) имеют маркер СД8⁺, они появляются в результате активации и пролиферации Т-эффекторов под воздействием антигена. При размножении паразита (микобактерии туберкулеза, грибы, простейшие, вирусы) внутри клетки хозяина его антигены образуют комплекс с антигенами МНС I класса, который распознается рецепторами CTL. В ответ CTL активируются, т. е. приобретают способность убивать инфицированную клетку с помощью пресинтезированных цитотоксинов: фагментинов и перфоринов. Первые индуцируют апоптоз клетки-мишени, вторые представляют собою белки, образующие поры, нарушающие проницаемость мембранны клетки-мишени и прокладывающие путь фагментинам. Контакт CTL и клетки-мишени непродолжителен, после чего CTL движется к новой жертве. Клетки с маркером СД8⁺ обладают и супрессорной активностью, т. е. регулируют интенсивность иммунного ответа и предотвращают развитие аутоиммунных реакций.

Регуляторные СД4⁺ лимфоциты или Т-хелперы (TH) подразделяют на две группы: TH-1 (воспалительные) активируют макрофаги и принимают участие в реакциях гиперчувствительности замедленного типа; TH-2 активируют В-лимфоциты в процессе иммунного ответа.

Макрофаги обеспечивают неспецифическую защиту за счет фагоцитоза и играют важную роль в развитии иммунного ответа как антигенпресенирующие и антигенпредставляющие клетки. Они происходят из стволовой клетки костного мозга, проходят стадии циркулирующих в крови промоноцита и моноцита и мигрируют в ткани (стадия гистиоцита или тканевого макрофага). Они несут на своей поверхности рецепторы (маннозы, липополисахариды), необходимые для захвата микробных клеток, а также рецепторы Fc-области иммуноглобулинов и комплемента, необходимые для осуществления реакций с участием антител.

Макрофаги и цитотоксические лимфоциты осуществляют *клеточный иммунный ответ* (реакции гиперчувствительности замедленного типа, уничтожение собственных инфицированных и опухолевых клеток).

Дендритные клетки происходят из костного мозга и заселяют нелимфоидные ткани. Дендритные клетки эпидермиса кожи и в слизистых оболочках дыхательных путей называются *клетками Лангерганса*. Участвуют в иммунном ответе как антигенпредставляющие клет-

ки. Сходны с макрофагами, но фагоцитирующей активностью обладают только их незрелые формы.

19.8 Цитокины

Цитокины — это полипептиды, продуцируемые иммунокомпетентными клетками и в то же время являющиеся эффекторами этих клеток, действующими на их метаболизм, пролиферацию и секрецию. Их основные функции: контроль пролиферации клеток, контроль воспалительных реакций, регуляция клеточного и гуморального иммунного ответа, противовирусная активность и цитотоксичность.

Многие из них полифункциональны (табл. 41). Нарушение активности или синтеза цитокинов приводит к заболеваниям [34]. Некоторые цитокины получают методами генетической инженерии и используют как лечебные препараты.

19.9 Формирование иммунного ответа

Процессинг антигена — это его модификация (ферментативная обработка, например, микробной клетки), в результате которой: а) антигенный детерминант делается доступной для лимфоцитов; б) крупные белковые молекулы превращаются в пептиды, при этом сглаживаются конформационные различия, что требует меньшего разнообразия Т-рецепторов; в) глубокий протеолиз делает возможным распознавание внутренних антигенных структур микробной клетки, которые меньше, чем внешние, подвержены мимикрии под “свое”. Функцию процессинга и представления антигена Т-лимфоциту выполняют макрофаги, В-лимфоциты, дендритные клетки, купферовские клетки печени и др. Процессированный антиген в комплексе с молекулой МНС II класса экспрессируется на поверхности антигенпредставляющей клетки и распознается Т-хеллером.

Взаимодействие иммунокомпетентных клеток (рис. 80). Узнавание Т-хеллером антигенного комплекса приводит к его активации, в результате которой лимфоцит синтезирует ИЛ-1; под действием ИЛ-1 происходит синтез ИЛ-2, стимулирующего пролиферацию.

В-лимфоцит распознает “свой” антиген, перерабатывает его и представляет на своей поверхности его фрагмент в комплексе с молекулой МНС II класса. Этот комплекс распознается активированным Т-хеллером, который в ответ секретирует ряд интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, гИФН), под действием которых В-клетка размножается, образуя клон плазматических клеток. Плазматические клетки синтезируют иммуноглобулины, их секрецию стимулирует ИЛ-6, выделяемый активированными Т-хеллерами.

Основные типы цитокинов

Таблица 41.

Цитокин	Источник	Мишень	Эффекты
ИЛ-1	Макрофаги, В-клетки, NK-клетки	Т-клетки, В-клетки, макрофаги	Активация лимфоцитов и макрофагов, гипертермия, острофазная реакция*, усиление клеточной адгезии
ИЛ-2	Т-клетки	В-клетки, ТН, NK-клетки, макрофаги	Активация лимфоцитов и макрофагов, стимуляция секреции лимфокинов
ИЛ-3	Т-клетки	Стволовые клетки	Пролиферация
ИЛ-4	Т-клетки	В-клетки, Макрофаги	Пролиферация лимфоцитов, активация макрофагов, влияние на переключение класса синтезируемых АТ: способствует продукции IgG1 и IgE подавляет синтез IgG2 и IgG3
ИЛ-5	Т-клетки	В-клетки, стволовые клетки	Пролиферация, дифференцировка, переключение на синтез IgA, эозинофилия
ИЛ-6	Макрофаги, фибробласты, опухолевые клетки	В-клетки, макрофаги, миелоидные предшественники	Пролиферация, стимуляция секреции Ig, острофазная реакция
ИЛ-7	Клетки стромы	Пре-В-клетки, Т-клетки	Пролиферация
ИЛ-8	Сосудистый эндотелий	Нейтрофилы	Подавление адгезии лейкоцитов
ИЛ-9	Т-клетки	Т-клетки, тучные клетки	Пролиферация
ИЛ-10	Т-клетки	Т-клетки	Пролиферация
ГМ-КСФ	Т-клетки, моноциты	Стволовые клетки, моноциты, гранулоциты	Пролиферация, дифференцировка
α-ФНО	Макрофаги, Т-клетки, NK-клетки	В-клетки, макрофаги, нейтрофилы	Рост и дифференцировка, активация, усиление адгезии, кахексия
β-ФНО (лимфотоксин)	Т-клетки	Клетки опухоли	Цитотоксичность
МИФ	Тгзт	Макрофаги	Подавление миграции
МАФ	Тгзт	Макрофаги	Активация
ФХМ	Тгзт	Макрофаги	Стимуляция хемотаксиса
ФП	Тгзт	Лимфоциты	Перенос клеточно-опосредованного иммунитета
ФИЛ	Тгзт	Нейтрофилы	Ингибиование миграции
Перфорин	ЦТЛ	Клетки опухоли, клетки трансплантата	Лизис
α-ИФН	Лейкоциты	Клетки организма	Торможение репликации вирусов
β-ИФН	Фибробласты	Клетки организма	Торможение репликации вирусов
γ-ИФН	Т-клетки	Макрофаги, NK-клетки, и другие клетки	Активация, торможение репликации вирусов

Примечание: ГМ-КСФ — гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор; ИЛ — интерлейкин; ИФН — интерферон; МИФ — макрофагингирующий фактор; МАФ — макрофагактивирующий фактор; ФХМ — фактор хемотаксиса макрофагов; ФП — фактор переноса; ФИЛ — фактор, ингибирующий миграцию лейкоцитов; ФИО — фактор некроза опухоли; Тгзт — Т-эффекторы гиперчувствительности замедленного типа; ЦТЛ — Т-цитотоксические клетки; NK — естественные киллеры; Т-х — Т-хелперы. *Острофазная реакция — связанное с острым воспалением увеличение сывороточной концентрации определенных белков (С-реактивного белка, амилоида А, гаптоглобина, церулоплазмина, компонентов комплемента).

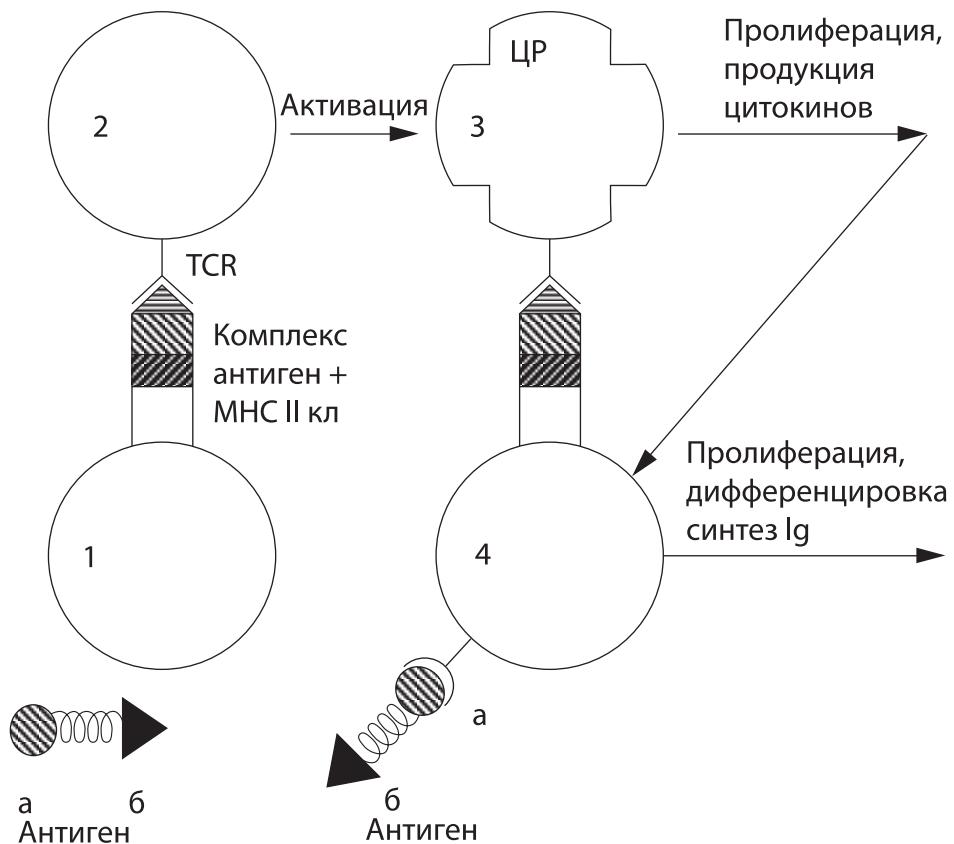


Рис. 80 Взаимодействие иммунокомпетентных клеток. Антиген: а — В-клеточный эпипотоп, б — Т-клеточный эпипотоп; 1 — антигенпредставляющая клетка (макрофаг); 2 — неактивированный Т-хелпер; ТСР — Т-клеточный рецептор; 3 — активированный Т-хелпер; ЦР — цитокиновый рецептор; 4 — В-лимфоцит.

19.10 Аллергия

Обычно, говоря об иммунитете, имеют в виду полезные для организма защитные реакции. Однако следствием иммунных реакций могут быть и патологические изменения в организме. Эта измененная реактивность, возникающая под влиянием антигенов, носит название **аллергии**, а вызывающие ее вещества — **аллергенами**. Аллергены подразделяются на бытовые (пыль пуховых подушек, эпидермис и шерсть домашних животных), растительные (пыльца), производственные (пыль хлопка, шерсти, красители, лаки и т. д.); пищевые (яйца, земляника, цитрусовые, шоколад и др.), лекарственные (ацетилсалициловая кислота, сульфаниламиды, антибиотики и др.). Аллергические реакции подразделяются на 5 основных типов.

19.10.1 Аллергические реакции 1 типа

Реакции 1 типа (анафилактические) могут быть вызваны пыльцой растений, органическими компонентами пыли. Аллергены активируют специфическую популяцию Т-хелперов, которые в свою очередь активируют В-лимфоциты, вырабатывающие IgE. Эти антитела способны прочно связываться с Fc-рецепторами клеток-мишеней (тучные клетки, базофилы).

Повторно попадающий в организм аллерген взаимодействует с IgE, фиксированными на клетках, что

сопровождается цепной реакцией клетки-мишени, которая начинает выделять медиаторы (гистамин, кинины, гепарин, факторы хемотаксиса), воздействующие на клетки гладкой мускулатуры, кровеносных сосудов, желез внутренней секреции. В результате развивается клиническая картина анафилактических заболеваний, симптомы которых зависят от локализации сенсибилизованных клеток: ринит, конъюнктивит, бронхиальная астма, анафилактический шок.

19.10.2 Аллергические реакции II типа

Аллергические реакции II типа называют цитотоксическими, они связаны с выработкой IgG против антигенных компонентов мембран клеток организма. Такими компонентами могут быть аутоантигены клеток организма или антигены, вторично фиксированные на клеточных мембранах, например, лекарственные аллергены. Комплекс IgG с этими антигенами способен связывать комплемент и активировать его по классическому пути. В результате клетка погибает (комплементзависимый цитолиз). Таков механизм аллергических реакций к пенициллину, сульфаниламидам, при переливании крови, отторжении трансплантата, аутоиммунных заболеваниях. В то же время реакции этого типа играют защитную роль, обеспечивая элиминацию поврежденных, опухолевых и инфицированных паразитами клеток.

19.10.3 Аллергические реакции III типа

Реакции III типа — это реакции, обусловленные образованием иммунных комплексов (ИК). Образование ИК является перманентно протекающей физиологической реакцией, а патологические реакции на ИК могут быть связаны с нарушением механизмов их уничтожения клетками фагоцитарной системы. ИК способны активировать компоненты плазмы (системы комплемента, свертывания крови, хемотаксис) и определенные клетки (гранулоциты, тромбоциты и др.). Активированные клетки выделяют биогенные амины, ферменты, кинины и другие медиаторы, обусловливающие патологический процесс. В зависимости от вида антигена и его локализации, наблюдаются различные клинические проявления заболевания.

Эндогенные антигены вызывают аутоиммунные заболевания: системную красную волчанку, ревматоидный артрит, пузырчатку и др. Ответ на экзогенные антигены проявляются как сывороточная болезнь, феномен Артюса, ряд инфекционных заболеваний. Сывороточная болезнь развивается при введении сывороток и других лекарственных препаратов, ее клинические проявления — артрит, эндокардит, гломерулонефрит и др. Феномен Артюса — это местная реакция, которая развивается в локусе попадания антигена (укус насекомых, введение лекарственных препаратов) на коже и прилегающих тканях. С образованием ИК связан патогенез инфекционных заболеваний различной этиологии: вирусных (гепатит В, корь), бактериальных (стрептококковых, менингококковых, вызванных микоплазмами и др.), протозойных (малярия, трипаносомоз), гельминтозов. Кроме того, ИК участвуют в патогенезе опухолевых заболеваний и при отторжении трансплантата.

Рассмотренные три типа аллергических реакций обусловлены антителами и развиваются через несколько минут после введения антигена, поэтому их называют реакциями немедленного типа. Они существенно отличаются от реакций *IV типа, опосредованных клетками, или реакций гиперчувствительности замедленного типа* (ГЗТ), которые проявляются не ранее 6-8 час., обычно через 24-48 час. после введения антигена. Основой этих реакций является не гуморальный, а клеточный иммунитет. В реакции принимают участие Т-лимфоциты, несущие специфические для данного антигена рецепторы. В результате распознавания комплекса антигена с молекулами МНС II класса начинается пролиферация лимфоцитов, высвобождение лимфокинов и реализация цитотоксического эффекта. Лимфокины (фосфолипиды, пептиды) — медиаторы клеточного иммунитета активируют макрофаги или непосредственно воздействуют на клетки-мишени. Активированные макрофаги обладают повышенной фагоцитарной и микробоцидной активностью. Активированные

лимфоциты (Т-киллеры) вступают в тесный контакт с клеткой-мишенью, обусловленный одновременным связыванием антигена и молекул МНС соответствующими рецепторами. Активируются ферменты Т-лимфоцита, нарушающие проницаемость мембраны клетки-мишени, которая в результате лизируется. Контакт Т-лимфоцита и клетки-мишени продолжается около 1 часа, лимфокины появляются в течение 1-12 час, а первые некрозы — через 24-48 час.

Т-клеточная цитотоксичность проявляется при противоопухолевом, противовирусном и трансплантационном иммунитете. Гиперчувствительность замедленного типа развивается при туберкулезе, лепре, бруцеллезе, пневмококковых и стрептококковых инфекциях, дифтерии, микозах, гельминтозах. Возможно развитие ГЗТ при контакте с гаптенами — химическими веществами, в том числе лекарственными, которые образуют комплексные антигены с белками кожи.

19.10.4 Аллергические реакции IV типа

Аллергические реакции IV типа выполняют не только патогенетические, но и защитные функции, повышая активность клеточного иммунитета. На этом принципе построена активная иммунизация против туберкулеза, когда детям в первые часы их жизни вводят ослабленную культуру туберкулезной палочки (вакцину ВСГ), которая повышает реактивность организма и предотвращает развитие заболевания.

Сенсибилизованные Т-лимфоциты годами сохраняются в организме и при повторном попадании антигена вступают с ним в реакцию. На этом основаны кожные диагностические реакции на инфекционные заболевания (туберкулез, микозы).

В естественных условиях часто наблюдаются комбинированные формы клеточных и гуморальных аллергических реакций.

19.10.5 Аллергические реакции V типа

Реакции V типа обусловлены образованием антител к рецепторам или медиаторам определенных физиологических реакций, например к рецепторам гормонов, в результате чего нарушается гормональная регуляция организма.

Лечение и профилактика аллергии предусматривает выявление аллергенов и прекращение контактов с ними, применение препаратов, угнетающих иммунный ответ (иммунодепрессантов), при анафилаксии — неспецифических средств (новокаин, димедрол, кальция хлорид), или используют метод десенсибилизации. Одним из способов десенсибилизации является дробное введение антигена. Небольшие порции антигена, вводимого дробно, связывают циркулирующие в крови антитела и предотвращают развитие аллергической реакции. Иммунные комплексы возможно удалить с помощью плазмографеза. На производстве необхо-

димо соблюдать меры безопасности для предотвращения контакта с аллергенами (микробными клетками, их продуктами, химическими веществами). Эти меры предусматривают герметизацию оборудования, автоматизацию процессов производства, индивидуальные меры защиты.

19.11 Толерантность и аутоиммунитет

Толерантность (неотвечаемость) обеспечивает отсутствие иммунного ответа на собственные антигены организма, т. е. иммунная система толерантна к подавляющему большинству антигенов тканей организма (аутоантигенов). В ряде случаев наблюдают отсутствие ответа на чужеродный антиген. Состояние толерантности поддерживают разнообразные механизмы: Т-супрессоры, генетическая рестрикция иммунного ответа, уничтожение клонов Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих соответствующий рецепторный идиотип, ограничение антигенпредставляющих клеток и лимфоцитов.

Толерантность к аутоантигенам естественна. Искусственная толерантность к чужеродным антигенам может быть достигнута иммунизацией по определенной схеме: дробным введением антигена в возрастаю-

щих количествах или однократное введение высокой дозы антигена.

Аутоиммунитет

При нарушении толерантности к собственным антигенам развиваются аутоиммунные заболевания, например, системная красная волчанка, ревматоидный артрит. Известно несколько механизмов отмены толерантности.

1. Повреждение клеточных мембран, например, при вирусных инфекциях.
2. Попадание в организм антигена, эпитопы которого близки к эпипотапам аутоантигена (мимикрирующие антигены).
3. Связывание чужеродных антигенов с клетками организма (см. аллергические реакции III типа).
4. Острая травма тканей может привести к освобождению антигенов, обычно изолированных от иммунной системы, например, повреждение глаза может вызвать иммунную реакцию на его антигены, которые будут распознаны как чужеродные.
5. Активация иммунокомпетентных клеток митогенами.
6. Расстройство регуляции иммунной системы (дефицит супрессорных клеток, атипичная экспрессия молекул МНС II класса).

Глава 20. ИММУНОПРЕПАРЫ: ПРОИЗВОДСТВО И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Основные достижения иммунологии, связанные с практическим использованием научных результатов, направлены на профилактику и лечение инфекционных и неинфекционных заболеваний. Иммунопрепараты, особенно вакцины, в этом отношении оказываются значительно полезнее, чем какие-либо фармацевтические продукты.

Вакцинация против оспы, бешенства, сибирской язвы, дифтерии, полиомиелита, коклюша, кори, столбняка, анаэробной инфекции и др. привела к резкому сокращению этих заболеваний. Методы иммунологии и использование иммунопрепаратов необходимы при решении проблем переливания крови, трансплантации органов, резус-гемолитической болезни новорожденных, для диагностики и терапии многих заболеваний.

20.1 Вакцины

Вакцины — это препараты, содержащие антигены одного или нескольких возбудителей инфекционных заболеваний, и предназначенные для создания искусственного активного иммунитета с целью профилактики и лечения соответствующего заболевания. Термин предложил Пастер в честь Дженнера, который в 1796 г. показал, что прививки коровьей оспы — вакцинация (*vaccina* — коровья) — эффективна для профилактики натуральной оспы. Вакцина Дженнера — гениальное эмпирическое достижение; развитие иммунологии инфекционных болезней как науки, основанной на знании их этиологии, начинается с открытия Пастера, доказавшего возможность ослабления вирулентности возбудителей с сохранением их иммунологических свойств и создавшего вакцину против бешенства и сибирской язвы. Это открытие послужило основой для разработки живых вакцин, содержащих микроорганизмы с ослабленной вирулентностью (аттенуированные). В настоящее время существуют разнообразные вакциновые препараты, которые будут рассмотрены ниже.

Живые вакцины готовят из аттенуированных штаммов микроорганизмов, которые получают в основном путем селекции спонтанных мутантов с ослабленной вирулентностью. Для этого микроорганизмы длительное время культивируют в неблагоприятных

для них условиях или пассируют на невосприимчивых животных. Например, для получения вакцинного штамма BCG (*Bacillus Calmette, Guerin*) *Mycobacterium tuberculosis* пассировали 13 лет (230 пересевов) на суре с желчью. Антирабическая (против бешенства) вакцина была получена Пастером путем многократного (113 пассажей) пассирования инфекционного агента на кроликах до получения так называемого фиксированного вируса, т. е. вируса с определенным значением вирулентной для кролика дозы и безопасного для человека.

Используют также вакцинны штаммы, полученные путем индуцированных мутаций или генетических рекомбинаций. Такие штаммы требуют длительного контроля ввиду опасности реверсии к исходному вирулентному типу.

Живые вакцины используют для профилактики бактериальных (сибирская язва, туляремия, бруцеллез, туберкулез, чума, сыпной тиф, желтая лихорадка) и вирусных (бешенство, полиомиелит, корь, оспа, грипп, паротит) инфекций.

Убитые вакцины получают из клеток высокоиммуногенных штаммов, инактивированных физическим (нагревание, ультрафиолетовые лучи) или химическим (фенол, этанол, ацетон, формальдегид) методами. Их используют для профилактики бактериальных (брюшной тиф, коклюш, холера, лептоспирозы, синегнойная инфекция) и вирусных (клещевой энцефалит, бешенство, грипп) инфекций. Для лечения хронических заболеваний используют вакцины из убитых бактерий, выделенных от больного (стафилококков, гонококков, шигелл, бруцелл и др.).

Химические вакцины готовят из антигенных фракций микробных клеток. Примерами бактериальных химических вакцин могут служить брюшнотифозная вакцина, содержащая гликоконьюгаты клеточных стенок *Salmonella spp.*, капсулные полисахариды *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* и др. Вирусные химические вакцины (против гриппа, герпеса, ящура, клещевого энцефалита, бешенства и др.) содержат компоненты поверхностных структур капсида.

Преимуществом химических вакцин является относительно низкое содержание балластных веществ,

Адъювант	Состав	Механизм действия
Неполный адъювант Фрейнда	Вазелиновое масло, ланолин, эмульгатор	Депонирование антигена, усиление фагоцитоза
Полный адъювант Фрейнда	То же + BCG или мурамилдипептид	То же + активация макрофагов и Т-лимфоцитов
Алюминиевые квасцы	A1(OH) ₃	Депонирование антигена, усиление фагоцитоза
Bordetella pertussis с квасцами	Клетки B. pertussis, сорбированные на A1(OH) ₃	То же + активация макрофагов и Т-лимфоцитов
Иммуностимуляторный комплекс (JSCOM)	Липосомы, содержащие вирусные белки	Доставка антигена в цитозоль Т-лимфоцитов, индукция Т-киллеров

высокая стабильность, малая реактогенность и возможность побочного действия. Отсутствие нуклеиновых кислот исключает опасность реверсии к данному типу, потенциально существующую у живых вакцин. Недостаток таких вакцин — более низкая иммуногенность по сравнению с корпскулярными (содержащими клетки) вакцинами из-за быстрого выведения антигена из организма. Для пролонгирования действия их вводят с адъювантами — веществами, усиливающими иммунный ответ (табл. 42).

Анатоксины — это обезвреженные, но сохраняющие иммуногенность экзотоксины возбудителей столбняка, дифтерии, анаэробной инфекции, ботулизма, холеры, стафилококковый и др.

Рибосомальные вакцины обладают высокой протективной активностью при сравнительно низкой токсичности и низкой типоспецифичностью, что оказывается практически ценным, т. к. позволяет получить протективные вакцины широкого спектра действия (против многих сероваров одного вида или даже против нескольких видов одного рода микроорганизмов). Практическое применение находит рибосомальная поливакцина против заболеваний, вызванных видами *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus* и *Haemophilus influenzae*.

Генно-инженерные вакцины получают с использованием рекомбинантных клеток. Примером такой вакцины служит препарат, содержащий полипептидный HBs антиген вируса гепатита B. Ген, кодирующий HBs-антиген, клонирован в дрожжевых клетках, которые синтезируют белок, обладающий протективной активностью. Существенным достоинством таких вакцин является безопасность, поскольку их изготовление не требует контакта с возбудителями заболеваний.

Синтетические вакцины разрабатывают с учетом знания структуры антигенных детерминант возбудителя определенного заболевания, необходимых для создания иммунитета. Их достоинствами являются химическая чистота и безопасность. Примером такой вакцины может служить препарат, содержащий синтетический аналог протеина клеточной мембранны малярийного плазмодия. Этот протеин обеспечивает контакт плазмодия с оболочкой эритроцита, образующиеся к нему антитела препятствуют проникновению возбудителя в эритроциты хозяина.

ДНК-вакцины разрабатываются на основе плазмид, содержащих участки вирусной ДНК. В клетках

иммунизированного животного такие плазмиды индуцируют экспрессию антигенов вируса, на которые развивается иммунный ответ. Такие вакцины пока не нашли практического применения ввиду потенциальной опасности злокачественной трансформации клеток организма с участием вакцинной ДНК.

Антиидиотипические вакцины создают на основе антиидиотипических антител (АИА). Идиотип иммуноглобулина определяется особенностями структуры его активного центра, от которых зависит его антигенная специфичность. Структура гипервариабельной области молекулы иммуноглобулина является отражением структуры определенной антигенной детерминанты (например, микробного антигена). Иммунизация животных специфическими иммуноглобулинами (идиотипами) позволяет получить АИА, которые, отражая структуру идиотипа, являются зеркальным отображением микробного антигена или “внутренним образом антигена”. Таким образом, АИА — это вакцины без антигена. Их разрабатывают против возбудителей, имеющих большое количество перекрестно реагирующих антигенов, или с трудом поддающихся культивированию (вирусы гепатита B, бешенства, грибов и др.).

Ассоциированные вакцины содержат антигены различного происхождения. Например, вакцина АКДС включает убитые клетки возбудителя коклюша, дифтерийный и столбнячный анатоксины.

Этапы получения вакцин включают выбор штамма, разработку условий его хранения и культивирования, подготовку посевного материала, накопление биомассы клеток в специальных биореакторах (ферментаторах), отделение микробных клеток от культуральной среды и последующую их обработку. Необходимым этапом является стандартизация вакцин и контроль их качества.

Бактерии культивируют на питательных средах, состав которых обеспечивает накопление достаточного количества биомассы с сохранением иммуногенной активности и антигенной специфичности штамма.

Вакцинныи штаммы вирусов выращивают на эмбрионах птиц (кур, уток, перепелок) и на культивируемых клетках человека и животных. Клетки получают из ткани (например, почек эмбриона человека или обезьяны) диспергированной трипсином. Суспензию клеток помещают в специальную среду, где они размножаются, образуя монослои на плоской поверхно-

сти сосуда (первичную культуру). Вторичная культура может быть получена путем перенесения клеток первичной культуры в свежую питательную среду. Жизнеспособность таких культур составляет 2-3 нед. Перевиваемые линии клеток способны к многократному субкультивированию, они представлены различными линиями трансформированных, например, опухолевых клеток. Химические вакцины получают путем разрушения бактериальных клеток и (или) экстракцией антигенных компонентов с последующей их очисткой соответствующими физико-химическими методами. Анатоксины получают из культурального фильтрата, обезвреженного формалином (0,4% формалина, 38°C, 21-25 дней) с последующей очисткой. Рибосомы выделяют из клеток, разрушенных механическим способом или обработкой ультразвуком, методом ультрацентрифугирования. Вакцины содержат рибосомы нескольких видов микроорганизмов и пептидогликан *Klebsiella pneumoniae* в качестве адьюванта.

Контроль качества вакциныных препаратов осуществляют на всех стадиях их изготовления, включая контроль готовой лекарственной формы, в строгом соответствии с утвержденной нормативно-технической документацией. В процессе изготовления контролируют отсутствие посторонних микроорганизмов и сохранение свойств (иммуногенность, токсигенность) вакциной культуры. При контроле готовых препаратов оценивают: растворимость и гомогенность (для сухой вакцины при добавлении растворителя); стерильность (методом посева на питательные среды); безвредность (пробой на животных); иммуногенность (вакциной иммунизируют чувствительных животных, после этого их заражают смертельной дозой возбудителя данного заболевания; процент выживших животных указывает на степень иммуногенности); переносимость каждой серии вакцины проводят на группе добровольцев из 5 человек, оценивают их общее состояние и местную реакцию; правильность этикетирования и упаковки.

Активность анатоксина определяют по его способности реагировать со специфической антитоксической сывороткой в реакции флоккуляции.

Вирусные вакцины проверяют не только на отсутствие бактерий и грибов, но и посторонних вирусов, поскольку производственные культуры могут быть заражены разными микроорганизмами, в том числе и онкогенными вирусами. Контролируют культуры тканей и питательные среды, предназначенные для накопления вирусного материала. Сбор вируса испытывают на идентичность и определяют титр вируса.

20.2 Иммуноглобулины

Иммуноглобулины применяют для создания искусственного пассивного иммунитета как для лечения, так и для экстренной профилактики ин-

фекционных заболеваний, особенно у лиц с иммунодефицитами, кроме того, их используют в диагностических целях для определения антигена неизвестного происхождения.

Иммуноглобулины выделяют из сыворотки или плазмы крови доноров или иммунизированных животных. Плазма — это растворимая фракция крови, не содержащая клеток (эритроцитов, лейкоцитов); сыворотка — это растворимая фракция, которая образуется после свертывания крови.

Нормальные иммуноглобулины (g-глобулин, поливалентные иммуноглобулины), содержащие антитела различной специфичности, выделяют из плазмы неиммунизированных доноров и сыворотки плацентарной крови. Основным активным компонентом нормальных иммуноглобулинов является IgG, присутствуют также небольшие количества IgM и IgA. Каждую серию препарата нормальных иммуноглобулинов изготавливают из смеси плазмы, полученной от большого количества доноров (не менее 5000 человек), что нивелирует индивидуальные различия в содержании антител и обеспечивает стандартность иммунологической активности. Препарата содержит широкий набор антител против возбудителей бактериальных и вирусных инфекций (гепатита, кори, коклюша, полиомиелита, гриппа и др.). Кровь донора собирают в стерильные емкости из полимерного материала, содержащие раствор антикоагуланта (5%-ный раствор натрия цитрата) для предотвращения свертывания крови. Клетки крови отделяют центрифугированием и возвращают донору, что значительно снижает возможность неблагоприятных для него последствий. Иммуноглобулины выделяют из плазмы фракционированным осаждением этанолом при температуре ниже 0°C для предотвращения денатурации белка, лиофильно высушивают, разводят до концентрации 10%, стерилизуют методом фильтрации и ампулируют. В связи с тем, что требования к препаратам иммуноглобулинов для внутривенного введения существенно возросли, в их производстве используют усовершенствованные технологии: частичное расщепление протеолитическими ферментами, восстановление, алкилирование, дополнительные этапы хроматографической очистки и др.

Все препараты иммуноглобулинов контролируют на стерильность, апирогенность, содержание белка и безвредность.

Специфические иммуноглобулины выделяют из плазмы или сыворотки крови иммунизированных доноров-добровольцев или животных. Например, противогриппозный иммуноглобулин — из крови доноров, иммунизированных живой гриппозной вакциной; антистафилококковый — из крови доноров, прошедших курс иммунизации стафилококковым анатоксином, или плацентарной крови женщин, иммунизированных в период беременности с профилактической целью.

Для получения некоторых антитоксических и противовирусных иммуноглобулинов (против столбняка, ботулизма, дифтерии, анаэробной инфекции, бешенства, кори, энцефалита и др.) животных (лошадей, овец, коз и др.) многократно иммунизируют возрастающими дозами соответствующего вакцинного препарата. После достижения достаточного титра антител у них берут кровь и из сыворотки выделяют иммуноглобулины по схеме, описанной выше.

Моноклональные антитела. Антитела, присутствующие в плазме крови, образованы многими клонами антителообразующих клеток и, являясь поликлональными, представляют собою гетерогенную группу иммуноглобулинов. Разнообразие поликлональных антител невоспроизводимо, что осложняет стандартизацию препаратов иммуноглобулинов, применяющихся для диагностики, профилактики и лечения соответствующих заболеваний. Наивысшей стандартностью и специфичностью обладают моноклональные антитела, которые вырабатываются одним клоном клеток и поэтому идентичны по антигенной специфичности, а также по классу и типу тяжелых и легких цепей в молекуле. Обычные антителообразующие клетки не способны длительно сохраняться в условиях *in vitro*. Поэтому в качестве продуцентов моноклональных антител используют гибридные клетки (гибридомы), которые получают путем слияния клеток, продуцирующих антитела на определенный антиген, и миеломных клеток, способных к неограниченному росту *in vitro*. Миелома — род злокачественной опухоли, образующейся при разрастании плазматических клеток, синтезирующих строго идентичные молекулы иммуноглобулинов неизвестной специфичности. Для гибридизации используют полученные путем мутагенеза клетки миеломы, имеющие маркерные признаки, позволяющие на специальных средах отделить гибридные клетки от родительских. Плазматические клетки, синтезирующие антитела, получают из селезенки иммунизированных мышей. Слияние проводят в среде с полиэтиленгликолем, отбор гибридом — на селективных средах; отбирают клетки, продуцирующие антитела нужной специфичности. Их культивируют на специальных средах, обеспечивающих рост клеток и производство антител.

Моноклональные антитела — уникальные по своей специфичности реагенты, используют при изучении сложных молекулярных структур, рецепторов и поверхностных маркеров клеток, в аффинной хроматографии для выделения и очистки веществ и клеток. Кроме того, они могут быть использованы для радиологической диагностики локализации опухолей. Для этого получают антитела против антигена опухоли и конъюгируют их с радиоактивным изотопом. Противоопухолевые антитела, конъюгированные с лекарственным агентом, могут быть полезными при иммунотерапии рака.

Иммуноглобулины могут быть использованы не только с целью терапии и профилактики инфекционных заболеваний, но и в качестве иммунокорригирующих агентов.

Антилимфоцитарные иммуноглобулины блокируют рецепторы цитокинов на поверхности лимфоцитов. Их применяют для снижения количества лимфоцитов при иммунном ответе на трансплантанты. Выделяют из сыворотки крови лошадей, иммунизированных лимфоцитами человека.

Анти-резус иммуноглобулины (фракция IgG антител против резус (Rh)-антигенов эритроцитов человека) используют для предотвращения гемолитической болезни новорожденных при резус-конфликте; получают из плазмы или сыворотки крови резус-отрицательных женщин-доноров.

Моноклональные антитела против рецепторов (CD3, CD4) лимфоцитов и против ИЛ-2 предназначены для избирательного подавления отдельных реакций иммунитета путем блокады рецепторов или подавления функций цитокинов; их получают методами гибридомной технологии.

20.3 Биологически активные пептиды

Фактор переноса — низкомолекулярный нуклеопептид, стимулирует клеточную систему иммунитета, применяется при заболеваниях, связанных с ослаблением иммунитета. Его получают из лейкоцитов крови доноров с выраженной реакцией гиперчувствительности замедленного типа на определенный антиген.

Миелопептиды вырабатываются клетками костного мозга, стимулируют процесс кроветворения, активность Т-лимфоцитов, образование антител. Применяются при патологических состояниях, связанных с нарушением иммунитета, например, при остеомиелите.

20.4 Гормоны

Гормоны тимуса — тимолин, тимавин, тимозин выделяют из вилочковой железы крупного рогатого скота, применяют при ослаблении иммунной системы после облучения, при лечении язв и воспалений, вирусных и бактериальных инфекций. Препараторы, аналогичные тимусным пептидам, получают методом химического синтеза (тимулин, тимопентин, тимоген).

Гормон поджелудочной железы — инсулин регулирует углеводный обмен, стимулирует клеточную систему иммунитета. Его выделяют из поджелудочной железы крупного рогатого скота или свиней либо получают методами генетической инженерии, используя в качестве продуцента рекомбинантные штаммы *Saccharomyces spp.*

Гормон коры надпочечников — глюкокортикоиды, кортизон и гидрокортизон и их синтетические

аналоги предназон и преднизолон относятся к иммуносупрессионным препаратам, их используют для подавления активности лимфоидных клеток при воспалении, аллергии, трансплантации, лечении аутоиммунных заболеваний.

20.5 Иммуномодуляторы

Иммуномодуляторы — это природные или синтетические препараты, способные оказывать регулирующее действие на функции иммунной системы; кроме того, их влияние распространяется на другие системы организма: сосудистую, нервную, эндокринную, кроветворную.

Иммуномодуляторы синтезируются клетками организма (цитокины, гормоны, биологически активные пептиды), их также получают путем биосинтеза или химического синтеза и применяют в качестве лечебных и профилактических средств при различных заболеваниях и трансплантации.

Интерлейкины получают, используя в качестве продуцентов культуры нормальных лимфоцитов или макрофагов, культуры Т-клеточных гибридов и рекомбинантные клетки микроорганизмов. Т-клеточные гибридомы — это продукты слияния Т-лимфоцитов, производящих определенный интерлейкин, и опухолевых клеток, способных к неограниченному росту. В качестве рекомбинантных продуцентов используют *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и другие микроорганизмы, в геном которых методами генетической инженерии введены гены, контролирующие синтез интерлейкина (ИЛ-1, ИЛ-2).

Среди цитокинов ранее всего в медицинскую практику вошли препараты интерферона, которые используют при вирусных (см. гл. 8) и некоторых злокачественных заболеваниях.

Интерфероны (ИФН) — это группа белков и гликопротеинов, каждый из которых синтезируется определенными клетками организма и выполняет специфические функции. Известно около 20 природных ИФН, различающихся по структуре и биологическим свойствам: α -ИФН состоит из 12 подвидов, β -ИФН — из 3-4 подвидов, γ -ИФН — из 2-3 подвидов. Рекомбинантные ИФН также имеют разновидности.

Продуцентом α -ИФН являются лейкоциты периферической крови человека, которые культивируют на специальной среде в присутствии вируса — интерфероногена. Нативный ИФН выделяют из культуральной жидкости осаждением и хроматографией. Метод имеет ограниченное применение из-за необходимости использования большого количества донорской крови.

α -ИФН синтезируется в культуре фибробластов (клеток соединительной ткани человека) в присутствии в качестве интерфероногена двухцепочечной РНК. γ -ИФН — в культуре иммунных Т- или В-лимфоцитов, в том и другом случае с низким выхо-

дом, поэтому производство с использованием культур клеток человека — процесс дорогостоящий. Экономически оправдано получение ИФН с использованием рекомбинантных культур микроорганизмов: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*. Очистку ИФН проводят методом аффинной хроматографии с использованием моноклональных антител.

Колониестимулирующие факторы (КСФ) — это разновидность цитокинов с преимущественным действием на гемопоэз, служат факторами выживаемости и роста кроветворных предшественников. Рекомбинантные препараты КСФ (лейкомакс, молграстим, лейкоген, ленограстим) используют для нормализации подавленного гемопоэза и активации иммунной системы, в частности, на фоне цитотоксической терапии опухолей и индуцированной иммунодепрессии при трансплантации.

20.6 Иммуномодуляторы микробного происхождения

Продигиозан, сальмазан, пирогенал — липополисахариды клеточных стенок *Serratia marcescens* и *Salmonella spp.*, стимулируют фагоцитоз, активность лимфоцитов, образование антител и интерферона.

Мурамил-дипептид — компонент пептидогликана клеточной стенки бактерий, является активатором макрофагов; его синтетический аналог — ликопид (N-ацетилмурамилаланил-D-изогутамин).

Полисахариды грибов β -гликаны *Saccharomyces spp.* (зимозан), *Schizophyllum commune* (шизофиллан), *Lentinula edodes* (лентинан), сульфатированный внеклеточный маннан *Rhodotorula rubra* (ронасан), внеклеточный глюкан *Aureobasidium pullulans* (аубазидан) стимулируют фагоцитоз, активируют иммунокомпетентные клетки, в результате чего повышают сопротивляемость организма к инфекционным и неинфекционным заболеваниям.

Препараты на основе нуклеиновых кислот получают из дрожжей и других микроорганизмов. Нуклеинат натрия — гидролизат дрожжевой РНК оказывает универсальное иммуномодулирующее действие, эффективен при различных заболеваниях, его основной мишенью являются макрофаги.

Вакцины могут вызывать не только специфический иммунный ответ, но и оказывать иммуномодулирующее и терапевтическое действие. Например, вакцину ВСГ применяют не только для профилактики туберкулеза, но и в качестве неспецифического стимулятора клеточного иммунитета при опухолевых заболеваниях.

Антибиотики актиномицин, циклоспорин обладают иммуносупрессирующими свойствами. Последний применяют для подавления иммунного ответа при трансплантации.

20.7 Синтетические иммуномодуляторы

Иммуномодулирующим действием обладают многие аналоги нуклеиновых кислот (синтетические полинуклеотиды), адаптогены, поверхностно-активные вещества (полисульфаты, поликарбонаты), производные пирана, имидазола, флуоренов, пиридинов и др. Из большого количества иммуномодуляторов только некоторые находят практическое применение, а большая часть не используется из-за их высокой токсичности, стоимости, побочных эффектов и т. п.

Иммуностимуляторы левамизол, дибазол, хлоридин, метилурацил и др. используют при снижении функции иммунной системы, например, в результате радиоактивного облучения, химиотерапии опухолевых заболеваний, вирусных и других инфекций. Иммуносупрессоры: циклофосфан, хлорамбуцил, меркаптопурин и др. применяют для лечения некоторых аутоиммунных заболеваний и в трансплантологии.

20.8 Диагностические препараты

Методы диагностики многих заболеваний основаны на серодиагностике (*serum* — сыворотка) — установлении титра антител в сыворотке крови больного с помощью диагностического антигена препарата или обнаружении антигенов возбудителя инфекции или антигенов опухолевых клеток в тканях организма с помощью антител. Для этих целей используют разнообразные серологические реакции (агглютинации, преципитации, связывания комплемента), иммуноферментный и радиоиммунный анализ и др.

В качестве диагностических препаратов на основе антигенов, применяют вакциные штаммы микроорганизмов, антигенные фракции, выделенные из клеток возбудителя или полученные методами генетической инженерии. Диагностикумы на основе антител представляют собою поликлональные или моноклональные иммуноглобулины против соответствующего антигена. Чувствительность методов, основанных на использовании моноклональных антител, во много раз превосходит чувствительность реакций с поликлональными антителами.

ЧАСТЬ III

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Глава 21. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И ЕЕ СВЯЗЬ С ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТЬЮ

21.1 Нормальная микробиота человека

В условиях физиологической нормы организм человека содержит сотни видов микроорганизмов, среди которых доминируют бактерии, тогда как вирусы и простейшие представлены значительно меньшим числом видов [37, 39]. Подавляющая часть таких микроорганизмов является сапрофитами-комменсалами и не наносит хозяину видимого вреда. Так же как и в окружающей среде, в организме человека микробы существуют в виде биоценозов. Суммарно в биоценозе человека обитает 10^{14} - 10^{15} клеток микроорганизмов, представленных более чем 500 видами, причем некоторые из них остаются до сих пор неизученными. Каждому индивидууму свойственны определенные микробные сообщества, сформировавшиеся в процессе его жизнедеятельности.

Термин “нормальная микробиота” объединяет виды, часто выделяемые из организма здорового человека (табл. 43). Информация о качественном и количественном составе микробиоты здорового человека является очень важной для фармацевтов и биотехнологов, так как человек — постоянный участник производственных процессов и источник возможного поступления туда микроорганизмов. На состав микробиоты разных биотопов (*topos* — место) влияет состояние гормональной, иммунной, нервной и других систем макроорганизма. Значительную роль в изменении состава микробных ассоциаций играют особенности питания, нерациональная лекарственная терапия, наличие соматических (неинфекционных) заболеваний и условия труда [40].

Органы и ткани, не соприкасающиеся с внешней средой, свободны от микроорганизмов. В норме стерильными являются сердце, кровь, лимфа, мозг, спинномозговая и синовиальная жидкости, мочевой пузырь, матка, а также глубокие ткани. Основные отделы организма, заселяемые бактериями, включают кожные покровы, верхние дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт и мочеполовую систему.

Представители нормальной микробиоты человека и частота их выделения

Таблица 43.

Вид микроорганизма	Частота выделения
Кожа	
<i>Staphylococcus aureus</i>	++
<i>Mycobacterium</i> spp.	++
Ротовая полость и носоглотка	
<i>St. epidermidis</i>	+++
Зеленящие стрептококки	++++
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	++
<i>Lactobacillus</i> spp.	++
<i>Actinomyces</i> spp.	+
Пептострептококки	+
<i>Neisseria</i> spp.	++
<i>Treponema</i> spp.	+
<i>Mycobacterium</i> spp.	+
<i>St. aureus</i>	+
<i>Clostridium</i> spp.	++++
Прочие неферментирующие энтеробактерии	++++
Полость носа	
<i>St. aureus</i>	+
<i>St. epidermidis</i>	++++
Зеленящие стрептококки	++
<i>S. pneumoniae</i>	+
<i>Neisseria</i> spp.	+
<i>Haemophilus</i> spp.	+
Пептострептококки	+
<i>Clostridium</i> spp.	++
<i>Bifidobacterium</i> spp.	+
<i>Propionibacterium acnes</i>	+
Толстая кишка	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	++++
<i>Bacteroides</i> spp.	++++
<i>Clostridium</i> spp.	++++
<i>Candida</i> spp.	++++
<i>Lactobacillus</i> spp.	+++
<i>Enterococcus</i> spp.	++

++++ — выделяют практически всегда.

+++ — обычно выделяют.

++ — выделяют часто.

+ — выделяют иногда.

21.2 Микробиота кожных покровов

Случайная микробиота может быть многочисленной и разнообразной и включает условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, попадающие из других биотопов собственного тела или из окружающей среды, которые быстро погибают за счет бактерицидных свойств кожи, сальных секретов и антагонистических взаимоотношений с нормальной микробиотой.

Постоянными представителями являются *Staphylococcus epidermidis*, *St. saprophyticus*, микрококки (сарцины), дифтероиды. Место постоянного обитания — роговой слой кожи, протоки сальных желез, волосяные мешочки. Микробиота волосяного покрова имеет идентичный состав. Обычно на 1 см² выявляют 10³-10⁴ микроорганизмов, но на участках с повышенной влажностью это число может достигать 10⁶. У некоторых людей на коже обнаруживают стрептококки, грамположительные спорообразующие палочки.

Стрептококки требовательны к питательным средам, нуждаются во введении специальных добавок (факторов роста); при культивировании их выявляют на среде с добавлением эритроцитарной массы животных (барана). По реакции с гемоглобином стрептококки подразделяют на 3 группы:

α-стрептококки (зеленящие) растут на среде в виде колоний, окруженных зеленоватыми зонами, цвет колоний серовато-зеленоватый;

β-стрептококки дают колонии, окруженные прозрачными зонами за счет лизиса эритроцитов;

γ-стрептококки не вызывают гемолиза эритроцитов.

Стрептококки можно рассматривать как транзиторно-циркулирующие виды (непостоянны).

Наибольшее число микроорганизмов обитает в складках кожи, здесь встречаются грибы рода *Candida*. В зонах скопления сальных желез (наружное ухо, гениталии) обнаруживают непатогенные кислотоустойчивые микобактерии, коринебактерии, липофильные дрожжи.

На коже волосистой части головы (на скальпе) часто присутствуют *Pityrosporum ovalae* (на безволосой — *P. orbicularae*), из дерматофитов обнаруживают виды родов *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*. В числе постоянных обитателей кожи у 5-10% здоровых людей встречается *St. aureus*.

21.3 Микробиота полости рта

В этом биотопе микробиота особенно разнообразна, чему способствуют наличие влаги и питательных веществ, слабощелочные значения pH. Многие условно-патогенные микроорганизмы из состава нормальной микробиоты играют существенную роль в возникновении кариеса, заболеваний пародонта и слизистой оболочки рта. Наличие в полости рта слюны с ее бак-

терицидными компонентами, лизоцимом, иммуноглобулинами, некоторыми липидическими ферментами ограничивают возможности оральных микробов как возбудителей заболеваний. Среди микроорганизмов полости рта встречаются аутохтонные (присущие данному биотопу) и аллохтонные виды — иммигранты из других биотопов (носоглотки, кишечника).

Среди бактерий доминируют стрептококки — 30-60% от общего количества микроорганизмов. Чаще всего это зеленящие маловирулентные стрептококки, обладающие определенным тропизмом: *Str. mitior* — к эпителию щек, *Str. salivarius* — к сосочкам языка, *Str. mutans*, *Str. sanguis* — к поверхности зубов. Они ферментируют углеводы и образуют перекиси. Сдвиг pH в кислую сторону приводит к декальцинированию зубной эмали. Важной является способность синтезировать полисахариды из сахарозы. Глюкозная часть молекулы превращается в декстрон (α -1,6-глюкан), а фруктоза — в фруктан (леван). Нерастворимый декстрон способствует образованию зубных “бляшек”, с помощью которых происходит прикрепление микробных клеток к ткани зуба. Фруктан может служить субстратом в дальнейших процессах кислотообразования даже при отсутствии поступления углеводов извне.

Среди других грамположительных кокков встречаются пептококки, обладающие слабой сахаролитической активностью, но разлагающие пептон и аминокислоты. Чаще всего пептококки встречаются в ассоциациях с фузобактериями и спирохетами при кариесе, пульпите, пародоните.

Грамотрицательные анаэробные кокки представлены родом *Veilonella*, они не утилизируют дисахариды, но разлагают пируват, лактат, ацетат до углекислого газа и воды, способствуя повышению pH и сдерживая рост возбудителей кариеса, образующих молочную кислоту. Наибольшее количество молочной кислоты образуют грамположительные палочки рода *Lactobacillus*. Грамотрицательные микроорганизмы представлены в полости рта родами *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*. Они ферментируют сахара до CO₂, а пептоны — с образованием продуктов, имеющих неприятный запах.

Бактероиды обладают ферментами коллагеназой и гиалуронидазой, разрушающими ткани, и участвуют в развитии заболеваний пародонта. Фузобактерии — палочки веретенообразной формы обитают в десневых карманах в ассоциации со спирохетами.

Лептотрихии имеют вид попарно расположенных “зернистых” палочек, часто нитевидной формы.

Строму “зубного камня” составляют актиномицеты, они входят в состав зубного налета, принимают участие в образовании зубных бляшек и развитии кариеса.

Коринебактерии способны понижать окислительно-восстановительный потенциал, что способствует росту анаэробов.

Микроорганизмы полости рта способны проникать в кровь, например, после экстракции зуба или даже при чистке зубов.

Спирохеты полости рта представлены родами *Treponema* (*T. denticola*, *T. orale*), *Borrelia* (*B. buccalis*); *Leptospira*; простейшие — родами *Entamoeba* (*E. buccalis*, *E. dentalis*) и *Trichomonas* (*T. buccalis*); из микоплазм часто встречаются *Mycoplasma orale*, *M. salivarium*.

21.4 Микробиота верхних дыхательных путей (ВДП)

Верхние отделы ДП несут особенно высокую микробную нагрузку, так как они анатомически способлены для осаждения бактерий из вдыхаемого воздуха.

В *полости носа* обнаруживают негемолитические и зеленящие стрептококки, непатогенные грамотрицательные кокки — нейссерии, стафилококки, коринебактерии. У некоторых людей постоянно встречается золотистый стафилококк, т. е. наблюдается резидентное носительство.

В *гортани* находят негемолитические и α -гемолитические стрептококки, у 100% людей обнаруживается негемолитический вариант *Str. pyogenes*, негемолитические стафилококки, дифтероиды. В тканях *миндалин* — микоплазмы и аденоны.

Мелкие бронхи, альвеолы, паренхима легких свободны от микроорганизмов.

21.5 Микробиота желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)

Микробиота ЖКТ различается по качественному и количественному составу в зависимости от его отдела. В *желудке* здорового человека за счет низких значений pH содержится 10^3 - 10^4 кл/мл содержимого, в основном, кислотоустойчивые микроорганизмы: лактобациллы, *Helicobacter pylori*, дрожжи, при патологии в результате повышения pH их количество возрастает.

В *верхних отделах тонкой кишки* обнаруживается 10^4 - 10^5 кл/мл, по качественному составу это молочно-кислые микроорганизмы, отличающиеся по адгезивности от тех, что находятся в полости рта и желудка, а также бифидобактерии и фекальные энтерококки. Площадь слизистой оболочки тонкого кишечника составляет 180-200 м². Через нее в кровь постоянно всасываются разнообразные вещества, в том числе микробного происхождения, возможно попадание и самих микробных клеток даже у здорового человека, не говоря о патологических состояниях.

Микробиота *толстого кишечника* наиболее многочисленна и разнообразна. Количество микробов достигает 10^9 - 10^{11} кл/мл (иногда 10^{12} кл/мл) принадле-

жащих к 260 видам. Численно превалируют анаэробы: бифидобактерии, бактероиды, лактобациллы, вейлонеллы, пептококки, клостридии. Факультативно-анаэробные микроорганизмы представлены бактериями группы кишечной палочки (БГКП), фекальными энтерококками.

Группа кишечной палочки объединяет бактерии 4 родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*. Объединение этих микроорганизмов в группу кишечной палочки произведено на основании общих признаков: это грамотрицательные, неспорообразующие, оксидазоотрицательные палочки, ферментирующие глюкозу и лактозу до кислоты и газа при 37°C за 24 часа.

БГКП (преимущественно *Escherichia coli*) занимают по численности второе место после бифидобактерий, на третьем месте по численности энтерококки: *Enterococcus faecalis* и *E. faecium*. Значительно меньше клостридий: *Clostridium perfringens* и *C. sporogenes*.

В кишечнике живут также кишечная амеба (*Entamoeba coli*), кишечные вирусы, у некоторых людей — дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

21.6 Микробиота мочеполовой системы

Состав микробиоты этих биотопов различается в зависимости от пола, возраста и органа. Почки, мочеточники, моча в мочевом пузыре не содержат микроорганизмов. В нижней части уретры встречаются неспорообразующие анаэробы: пептококки, пептострептококки, бактероиды, микобактерии и грамотрицательные бактерии кишечного происхождения. Микробиота влагалища формируется с наступлением половой зрелости. Это молочнокислые бактерии (палочки Додерлейна), коринебактерии, негемолитические стрептококки, дрожжеподобные грибы и простейшие, для которых благоприятна кислая среда этого органа (pH 4,0-4,2).

21.7 Значение нормальной микробиоты

Нормальная микробиота здорового человека играет важную роль в поддержании здоровья и в нормальном функционировании всего организма. Большинство микроорганизмов, живущих в разных биотопах, обладает *антагонистическими свойствами* по отношению к другим, в частности, патогенным бактериям и вирусам. Например, бифидобактерии и лактобациллы выделяют кислоты (молочную, уксусную), спирты, лизоцим, бактериоцины, могут активно тормозить развитие гнилостных бактерий в кишечнике, ингибируют выделение энтеропатогенными эшерихиями термолабильного токсина.

Важным механизмом подавления роста патогенов является избирательное связывание представителя-

ми нормальной микробиоты поверхностных рецепторов эпителиальных клеток. Нормальная микробиота кишечника способствует пищеварению: расщепляет трудноперевариваемые сложные органические вещества, оказывает влияние на морфологию слизистой и ее адсорбционную способность. С деятельностью микроорганизмов связаны обмен липидов, разложение желчных кислот, разложение белков до конечных продуктов, процессы всасывания веществ, перистальтика и многое другое. Микроорганизмы принимают участие в детоксикации попадающих из внешней среды ксенобиотиков и образующихся токсических продуктов. Масляная кислота, образующаяся при анаэробном сбраживании клетчатки кишечными микроорганизмами, способствует образованию особого фермента, инактивирующего ген, ответственный за злокачественное перерождение клетки.

Нормальная микробиота способствует усилению всасывания из кишечника ионов Fe^{+2} , Ca^{+2} , витамина D, участвует в образовании витаминов K, группы В, особенно B_1 , B_2 , фолиевой, никотиновой, пантотеновой кислот. Высокое содержание бифидобактерий и лактобактерий препятствует развитию многих патологических процессов и даже канцерогенеза.

Нормальная микробиота способствует созреванию и поддержанию иммунной системы. У стерильных животных (гнотобионтов) масса лимфатических узлов снижена в несколько раз по сравнению с нормальными животными. Гнотобионты не могут жить в обычных условиях, где есть микробное окружение и погибают от бактерий и вирусов, к которым животные, выросшие в нормальных условиях, нечувствительны. Даже в условиях стерильного существования гнотобионты быстро погибают от дисфункции кишечника, связанной с нарушением процессов переваривания, всасывания и детоксикации веществ из-за отсутствия нормальной микробиоты.

При нормальной колонизации слизистых оболочек бактерии, являясь антигенами, индуцируют образование антител (IgA), составляют основу местного иммунитета и не позволяют возбудителям проникнуть в ткани, а также способствуют поддержанию гомеостаза самих слизистых оболочек.

Тепло, которое выделяется в процессе метаболизма микробов — обитателей кишечника, способствует поддержанию постоянной температуры тела теплокровных животных.

Продукты нормальной микробиоты постоянно попадают в кровь, оказывая влияние на метаболизм макроорганизма. Нарушение симбиоза микро- и макроорганизма приводит к тяжелым последствиям: нарушению обменных процессов, аллергическим, кожным, онкологическим заболеваниям и даже к психическим расстройствам.

Нормальная микробиота способна вызывать развитие инфекционных заболеваний, большая часть которых носит оппортунистический (сопровождающий) харак-

тер. Например, кишечные анаэробы (бактероиды) при проникновении в стенку кишечника в результате травмы вызывают формирование абсцессов, а основными возбудителями постгриппозных пневмоний считают микроорганизмы, обитающие в носоглотке любого человека. Ведущую роль в развитии подобных поражений играет не вирулентность самого возбудителя, а ослабление защитных систем макроорганизма (иммунодефицит).

21.8 Дисбактериоз (дисбиоз)

Дисбактериоз проявляется в нарушении качественного и количественного состава микробиоты и перемещении ее в другие биотопы. Развитию дисбактериозов способствует длительное применение антибиотиков и антисептиков, угнетающих развитие одних видов микробов и не влияющих на другие. Антимикробная терапия сопровождается дисбактериозом в 90% случаев. Важным фактором является снижение местного и общего иммунитета в результате гормонотерапии, применения иммунодепрессантов, лучевой терапии, инфекционных и аллергических заболеваний, воспалительных процессов. Одной из важных причин развития дисбактериоза является стресс. Группу риска составляют люди, находящиеся в состоянии постоянного напряжения: летчики, моряки, бизнесмены, спортсмены, врачи, журналисты, а также жители экологически неблагоприятных территорий и пожилые люди. Общее ухудшение экологической обстановки, низкое качество воды, неполноценное и несбалансированное питание также могут стать причиной дисбактериоза. Наиболее часто встречается дисбактериоз кишечника, который проявляется в нарушении его работы, сопровождается общим недомоганием, болями в области живота и повышенным газообразованием. Длительное нарушение соотношения микроорганизмов в кишечнике может провоцировать развитие аллергических заболеваний, таких как бронхиальная астма, хронический бронхит, ревматоидный артрит и др.

Дисбактериоз кишечника выявляют микробиологическим методом. По результатам посевов кишечной микробиоты определяют:

- 1) содержание общего количества кишечных палочек, типичных по ферментативной активности;
- 2) наличие гемолитических штаммов *E. coli*;
- 3) наличие прочих условно-патогенных микроорганизмов;
- 4) наличие бактерий рода *Proteus*;
- 5) наличие грибов рода *Candida*;
- 6) количественное содержание бифидобактерий, лактобактерий, бактероидов.

В таблице 44 приведен состав нормальной микробиоты кишечника. Для коррекции дисбактериозов используют препараты эубиотиков (пробиотиков), которые содержат живые лиофильно высушенные клетки бактерий (табл. 45).

Содержание различных бактерий в фекалиях здоровых взрослых лиц

Таблица 44.

Бактерии	Их количество в 1 г испражнений
Бифидобактерии	10^8 - 10^9
Бактероиды	10^9 - 10^{10}
Лактобациллы	10^6 - 10^8
Спорообразующие анаэробные клоэстриции Эшерихии:	10^5
• лактозоположительные	10^7 - 10^8
• лактозодефектные	10^5 - 10^7
• не ферментирующие лактозу	10^5 - 10^7
• гемолизирующие	10^6
Виды <i>Proteus</i>	10^4
Виды <i>Klebsiella</i>	10^3
Прочие грамотрицательные бактерии	10^3
Стафилококки (эпидермальные, гемо- и негемолизирующие сапротрофные)	10^4
Виды <i>Enterococcus</i>	10^5 - 10^6
Дрожжеподобные грибы	10^4
Плесени	10^4

Эубиотики (пробиотики), применяющиеся для лечения и профилактики дисбактериозов

Таблица 45

Препарат	Микроорганизмы
Бифидумбактерины	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Лактобактерины	<i>Lactobacillus</i> spp.
Ацилакт	то же
Аципол	то же
Ламинолакт	то же
Колибактерин	<i>Escherichia coli</i> M17
Биофлор	то же
Энтерол 250	<i>Saccharomyces boulardii</i>
Споробактерин	<i>Bacillus subtilis</i>
Бактиспорин	то же
Бактисубтил	то же
Биоспорин	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>
Бификол	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Escherichia coli</i>
Бифиформ	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Enterococcus</i> sp.,
Окарин	<i>E. coli</i> и <i>Enterococcus</i> sp.
Линекс	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Streptococcus faecium</i>

21.9 Микробиота окружающей среды. Санитарно-показательные микроорганизмы

В биосфере Земли повсеместно присутствуют микроорганизмы, жизнедеятельность которых вносит важнейший вклад в круговорот углерода, азота, серы, фосфора и других элементов, а также поддерживает динамическое равновесие в биосфере. Естественными средами обитания микроорганизмов являются вода, почва, организмы растений, животных и человека. Микробиоту окружающей среды, включая свободно-

живущие и паразитические микроорганизмы, а также влияние микробиоты на экологическую ситуацию и здоровье человека изучает санитарная микробиология. Главной задачей санитарной микробиологии является раннее обнаружение патогенной микробиоты в окружающей среде. Основными источниками распространения возбудителей инфекционных заболеваний являются человек и теплокровные животные. Наибольшее их количество поступает в окружающую среду воздушно-капельным и фекальным путями.

Непосредственное обнаружение патогенных микроорганизмов, несмотря на разработанные методы их ускоренного и прямого количественного определения, имеет ряд трудностей:

— патогенные микроорганизмы находятся в окружающей среде непостоянно, легко их можно обнаружить в период эпидемий и трудно — в межэпидемические периоды;

— количество патогенных микроорганизмов, поступающих в окружающую среду, значительно меньше, чем представителей нормальной микробиоты, распространены патогенные микробы в объектах неравномерно;

— при посеве на питательные среды патогенные микробы страдают от конкуренции с сапротрофами, являясь плохо приспособленными к жизни в окружающей среде, патогенные микроорганизмы требуют применения “богатых” и поэтому дорогостоящих питательных сред.

Отрицательный результат обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды еще не говорит с достоверностью об их отсутствии. В санитарной микробиологии оценку состояния различных объектов проводят непрямым путем, устанавливая факт их загрязнения выделениями человека и животных и чем обильнее это загрязнение, тем более вероятно попадание в объект патогенных микробов.

Состав нормальной микробиоты разных биотопов организма человека довольно постоянен и мало меняется при инфекционных заболеваниях. Для многих видов полость рта, кишечник, ВДП являются единственной средой обитания. Обнаружение таких микроорганизмов в каком-либо объекте свидетельствует о его загрязнении соответствующими выделениями. Например, обнаруживая нормальных обитателей кишечника, можно сделать заключение о наличии фекального загрязнения и возможной опасности присутствия брюшнотифозных, дизентерийных палочек, возбудителей других кишечных инфекций.

Выделяемые в таких случаях микробы служат показателями *санитарного неблагополучия*, потенциальной опасности исследуемых объектов и поэтому названы *санитарно-показательными (СПМ)*. Однако не все микроорганизмы, входящие в состав нормальной микробиоты тела человека, могут быть признаны СПМ.

21.9.1 Основные требования, предъявляемые к санитарно-показательным микроорганизмам [28, 37]

1. Такие микроорганизмы должны постоянно содержаться в выделениях человека и теплокровных животных и поступать в окружающую среду в больших количествах.

2. Они не должны иметь другого природного резервуара, кроме организма человека и животных.

3. После выделения в окружающую среду они должны сохранять жизнеспособность в течение сроков, близких к срокам выживания патогенных микрофлор, поступающих в окружающую среду тем же путем.

4. Они не должны размножаться в окружающей среде.

5. У микробов не должно быть во внешней среде "двойников" или аналогов, с которыми их можно спутать.

6. Они не должны изменять свои биологические свойства во внешней среде.

7. Они должны быть достаточно типичными, чтобы их диагностика осуществлялась без особого труда.

8. Методы идентификации должны быть простыми, доступными и экономичными.

21.9.2 Принципы и методы проведения санитарно-микробиологических исследований

При проведении санитарно-микробиологических исследований необходимо выполнять следующие требования.

1. Правильный отбор проб.

Его проводят с соблюдением всех необходимых правил асептики; при хранении и транспортировке необходимо исключить возможность гибели и дополнительного размножения микроорганизмов. При невозможности немедленно сделать анализ- материал хранят не более 6-8 часов.

2. Серийность проводимых анализов.

Микроорганизмы в объектах окружающей среды распределены крайне неравномерно. Для получения адекватных результатов проводят отбор серии проб из разных участков объекта. При проведении анализов все образцы смешивают и отбирают среднюю пробу.

3. Повторность отбора проб.

Для получения сопоставимых результатов осуществляют повторный отбор проб в связи с тем, что в исследуемых образцах состав микробиоты меняется достаточно быстро.

4. Применение стандартных методов исследования.

Использование методик, утвержденных ГОСТ, позволяет получать в разных лабораториях сопоставимые результаты.

5. Использование комплекса тестов необходимо для получения адекватной информации при сочетании прямых и косвенных методов выявления микроорганизмов с учетом влияния факторов внешней среды и собственной микробиоты объекта.

Современная санитарная микробиология стремится использовать простые, точные и надежные методы. Они направлены на определение общей микробной загрязненности и выявления СПМ и включают:

— прямой подсчет при микроскопии микроорганизмов в объекте;

— методы выделения и идентификации микроорганизмов;

— биологические методы с использованием лабораторных животных.

Прямой подсчет применяют в экстренных случаях при необходимости

срочного ответа о количественном содержании бактерий (например, при авариях в системе водоснабжения, при оценке эффективности работы очистных сооружений и др.). Основной недостаток — невозможность получить точный ответ из-за образования бактериями агломератов или прикрепления к частицам среды. Метод не позволяет отличать живые бактерии от погибших.

Посев на питательные среды производят для количественного подсчета. На плотных питательных средах производят подсчет числа выросших колоний. При этом исходят из предположения, что каждая колония является результатом попадания на среду одной жизнеспособной клетки. Данный метод неточен, т. к. выявляет только группы микроорганизмов, растущих на определенных питательных средах при определенной температуре. Невозможно создать унифицированную, подходящую для всех микроорганизмов среду. Не все микроорганизмы, находящиеся в объекте, дают колонии на питательной среде из-за конкуренции и антагонизма.

Содержание числа живых клеток в объекте отражает показатель общего микробного числа (ОМЧ) в г (мл) анализируемого материала. Содержание СПМ выражают в титрах и индексах:

Титр СПМ — наименьший объем исследуемого материала в г (мл), в котором обнаружена одна живая клетка СПМ.

Индекс СПМ — количество клеток СПМ, обнаруженных в определенном объеме (массе): для воды в 1 л, для почвы — в 1 г.

Индекс — величина, обратная титру.

21.10 Характеристика основных групп СПМ

СПМ условно разделяют на 3 группы.

Первая группа включает обитателей кишечника человека, их расценивают как индикаторы фекально-

го загрязнения. В нее входят колиформные бактерии, энтерококки, сульфитвосстанавливающие клостридии (включая *Clostridium perfringens*), коли-фаги.

Вторая группа включает обитателей верхних дыхательных путей и носоглотки. Они являются индикаторами воздушно-капельного загрязнения среды. В нее входят α - и β -стрептококки и стафилококки.

Третья группа включает сапротрофные микроорганизмы, обитающие во внешней среде. Это индикаторы процессов самоочищения. В нее входят бактерии-аммонификаторы и нитрификаторы, некоторые спорообразующие бактерии, актиномицеты, цианобактерии и грибы.

21.10.1 Колиформные бактерии

Преимущество этих бактерий как СПМ связано с тем, что они являются постоянными обитателями кишечника и постоянно выделяются с фекалиями в окружающую среду в больших количествах, их число намного выше, чем других представителей кишечных микроорганизмов.

В настоящее время в соответствии с нормативно-технической документацией СПМ являются:

а) колиформные бактерии (общие), расщепляющие только лактозу до кислоты и газа при 37°C в течение 24 часов;

б) фекальные колиформные палочки (ФКП) (термотolerантные), расщепляющие только лактозу до кислоты и газа при температуре $+43\text{--}+44,5^{\circ}\text{C}$.

Сама кишечная палочка как санитарно-показательный микроорганизм имеет ряд недостатков.

1. В окружающей среде можно обнаружить ее аналоги и в связи с этим появляется необходимость использовать дополнительные биохимические тесты для идентификации.

2. Она менее устойчива к неблагоприятным воздействиям внешней среды (изменениям рН, повышенным концентрациям химических веществ), чем некоторые патогены.

3. Кишечная палочка может размножаться в воде при содержании органических веществ не менее 0,28 мкг/мл.

4. Не всегда удается четко оценить эпидемическую опасность, исходя только из числа клеток *E. coli*, например, известны вспышки сальмонеллеза водного происхождения при содержании бактерий 17 кл/л, в то время как содержание *E. coli* не превышало 4 кл/л.”

21.10.2 Энтерококки

Все виды и варианты энтерококков имеют санитарно-показательное значение и отвечают ряду требований, предъявляемых к СПМ.

1. Это постоянные обитатели кишечника, несмотря на то, что их количество меньше, чем *E. coli*.

2. Они не способны размножаться во внешней среде (точнее, могут размножаться при содержании органических веществ 375 мкг/л и температуре, равной 20°C и выше).

3. Не предъявляют выраженной изменчивости во внешней среде, что облегчает их распознавание.

4. Не имеют аналогов во внешней среде.

5. Отмирают во внешней среде значительно раньше, чем *E. coli*, поэтому всегда свидетельствуют о свежем фекальном загрязнении.

Самым главным достоинством является их устойчивость к неблагоприятным внешним воздействиям. Они устойчивы к нагреванию до 65°C в течение 30 мин, что делает их показателем качества режима пастеризации. Энтерококки устойчивы к высоким концентрациям NaCl (6,5-17%), что позволяет использовать их при анализе морской воды. Энтерококки устойчивы в диапазоне рН 3-12, что можно использовать при анализе стоков кислого и щелочного характера.

В настоящее время количественная энтерококкметрия принята международным стандартом по воде как дополнительный показатель фекального загрязнения, а при выявлении атипичных *E. coli* — главным методом выявления фекального загрязнения.

Трудности в индикации энтерококков состоят в необходимости использовать среды сложного состава и в том, что для их выявления требуется больше времени, чем для БГКП.

21.10.3 Клостридии

Клостридии выделяются в окружающую среду с фекалиями, но их количество меньше, чем БГКП и энтерококков, и составляет $10^5\text{--}10^6$ кл/г. К СПМ относят *Clostridium perfringens* и *Cl. sporogenes*. Основным биохимическим признаком для идентификации клостридий является способность образовывать черные колонии на железосульфитной среде за счет образования FeS . Эта среда позволяет дифференцировать клостридии фекального загрязнения от клостридий, обитающих во внешней среде. Кишечные клостридии восстанавливают сульфиты и вызывают почернение среды, а свободно живущие не имеют сульфитредуктазы и не изменяют цвет среды. Следует отметить, что почернение среды могут вызывать другие бактерии, например, *E. coli*. Для подавления роста сопутствующей микробиоты посевы выращивают при $43\text{--}44,5^{\circ}\text{C}$ или прогревают при 80°C 15-20 мин. Простота обнаружения на среде Вильсон-Блера и некоторых других средах является существенным преимуществом кишечных клостридий как СПМ. Однако у них имеются и некоторые недостатки.

1. *Cl. perfringens* может длительно сохраняться во внешней среде за счет спорообразования. Обнаружение этого микробы свидетельствует об имевшем место фекальном загрязнении. В связи с тем, что для

спор *Cl. perfringens* губительным является содержание остаточного хлора 1,2-1,7 мг/л, как и для энтеровирусов, обнаружение микробы свидетельствует о возможном присутствии энтеровирусов в воде.

2. *Cl. perfringens* может размножаться во внешней среде при температуре не менее 18-20°C и достаточном количестве питательных веществ, например, в гумусных почвах южных широт. Для прорастания спор необходим температурный шок, т. е. прогревание при 70° в течение 15-30 мин. Без прогрева прорастает лишь 0,1-3% спор.

О давности фекального загрязнения предложено судить, сопоставляя содержание споровых и вегетативных форм. С этой целью определяют количество клоstrидий в непрогретых и прогретых пробах. В прогретых пробах присутствуют только споровые формы, что свидетельствует о давнем фекальном загрязнении. В непрогретых пробах выявляют вегетативные и споровые формы. Большое число вегетативных форм свидетельствует о свежем фекальном загрязнении. Однако на практике количество *Cl. perfringens* в непрогретых пробах бывает ниже, чем в прогретых. Это обусловлено антагонистическим влиянием сопутствующей микробиоты или отсутствием температурного шока в непрогретых пробах.

В отечественной практике о давности фекального загрязнения судят, сопоставляя индексы БГКП и *Cl. perfringens*. Если оба показателя имеют высокое значение, то делают заключение о наличии свежего фекального загрязнения. Высокое значение индекса БГКП и низкое значение индекса клоstrидий указывает на давнее загрязнение.

21.10.4 Стрептококки и стафилококки

Гемолитические и зеленящие стрептококки являются обитателями верхних дыхательных путей и попадают в воздух со слюной и мокротой.

Основная трудность в использовании этих микрорганизмов как СПМ состоит в том, что стрептококки представляют большую группу микроорганизмов, вызывающих заболевания (скарлатину, ангину, рожистое воспаление и др.).

Для культивирования используют кровяной агар; α -гемолитические стрептококки встречаются у 100% населения, β -стрептококки у 25-76%, поэтому СПМ считают α и β -стрептококки. По срокам жизни стрептококки совпадают с возбудителем дифтерии и другими патогенными микробами, попадающими в организм человека аэробенным путем.

Обнаружение α -стрептококков (наименее устойчивых) свидетельствует о свежем воздушно-капельном загрязнении. В воздухе помещений, где люди отсутствуют, стрептококки не обнаруживаются.

Стафилококк попадает в воздух с поверхности кожи, а также при разговоре и кашле с выделениями

слизистых оболочек ВДП. Для мест сброса воды бассейнов количество стафилококков является важным показателем санитарного состояния воды. Стафилококки в воде выживают дольше, чем БГКП и энтерококки. Однако используют стафилококки в основном, как СПМ воздуха закрытых помещений.

Превосходство этих бактерий как СПМ над стрептококками заключается в более простой и быстрой индикации, неприхотливости к питательным средам. Ставилококки обладают устойчивостью к различным физическим и химическим факторам, поэтому их можно использовать как СПМ воды в зонах рекреации и бассейнов.

21.10.5 Бактериофаги

В качестве СПМ предложено использовать бактериофаги кишечных бактерий (эшерихий, сальмонелл и шигелл). Кишечные фаги постоянно обнаруживаются там, где есть бактерии, к которым они адаптированы. Однако как показатели возможного присутствия патогенных бактерий они имеют определенные недостатки: 1) бактериофаги выживают в окружающей среде дольше (8-9 мес.), чем соответствующие бактерии (4-5 мес.); 2) они способны адаптироваться к другим видам бактерий.

Однако как показатели фекального загрязнения они имеют важное значение, поскольку выделяются из сточных вод с той же частотой, что и многие вирусы (коксаки, гепатита А, полиомиелита). Их устойчивость к дезинфектантам сопоставима с устойчивостью энтеропатогенных вирусов. Обнаружить фаги можно, используя простые методы.

21.11 Санитарная микробиология воды

Вода является естественной средой обитания разнообразных микроорганизмов. В пресной и соленой воде выявляют представителей всех таксономических групп бактерий, многих простейших и грибов. На качественный состав микробиоты существенное влияние имеет происхождение воды как среды обитания. Различают *поверхностные* (реки, озера, водохранилища, пруды и т. д.), *подземные* (почвенные, грунтовые, артезианские) и *соленые* (моря, озера) водоемы.

Микробиоту водоемов определяют аутохтонные (водные) и аллохтонные (попадающие при загрязнении) микроорганизмы. Загрязнение водоемов может происходить при попадании сточных вод: промышленных (особенно с предприятий пищевой промышленности), хозяйствственно-фекальных, талых, ливневых.

Аутохтонной микробиотой называют совокупность микроорганизмов, постоянно живущих и размножающихся в воде. Как правило, микробный состав воды напоминает микробиоту почвы, с которой

она соприкасается. В состав водной микробиоты входят *Micrococcus candidans*, *M. roseus*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas fluorescens*, различные виды *Proteus* и *Leptospira*.

В незагрязненных водоемах выявляют *Bacillus cereus*, *Bac. mycoides*, *Chromobacterium*, *Clostridium*. В воде часто обнаруживают цианобактерии, водные грибы, простейшие. Микроорганизмы воды принимают участие в круговороте веществ, расщепляя органические соединения, обеспечивают питанием других обитателей водоемов.

В результате микробного загрязнения при попадании неочищенных городских отходов и стоков в воду могут проникать возбудители инфекционных заболеваний: холеры, брюшного тифа и паратифа А, В; лептоспирозов, йерсиниозов, кампилобактериозов, туляремии, полиомиелита, гепатита и др.

Вода не является благоприятной средой обитания патогенных микроорганизмов, приспособленных к организму человека и животных. Поэтому происходит их постепенное отмирание и освобождение воды от контаминирующих микроорганизмов. Основным фактором очистки является конкурентная деятельность сапротрофной микробиоты. В результате быстрого разложения органических веществ сапротрофами резко снижается численность микроорганизмов, особенно фекального происхождения. Способность к самоочищению обусловлена присутствием в воде постоянных видов, входящих в конкретный биоценоз.

По количеству микроорганизмов различают полисапробные (*sapros* — гниение), мезосапробные и олигосапробные зоны.

Полисапробные зоны (зоны сильного загрязнения) содержат большое количество разлагающихся органических веществ и почти полностью лишены кислорода. Количество бактерий до 10^6 /мл. Видовой состав ограничен анаэробными бактериями, грибами, актиномицетами.

Мезосапробные зоны (умеренного загрязнения) характеризуются разнообразным качественным составом микроорганизмов; в основном это нитрифицирующие, облигатно анаэробные бактерии, а также представители *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Streptomyces* и др. Общее количество — 10^5 кл/мл.

Олигосапробные зоны (зоны чистой воды) характеризуются небольшим содержанием органических соединений и окончанием минерализации. Количество бактерий $10\text{--}10^3$ кл/мл.

При санитарно-микробиологическом анализе воды определяют общее микробное число (ОМЧ) — количество жизнеспособных микроорганизмов в 1 л воды и количество санитарно-показательных микроорганизмов.

СПМ для воды являются общие колiformные и термотолерантные кишечные палочки, *Clostridium*

perfringens, *Cl. sporogenes* и бактериофаги. При необходимости определяют фекальные энтерококки (*Enterococcus faecalis*).

В соответствии с Санитарными правилами и нормами 2.1.4.1074-01 к воде центрального водоснабжения предъявляются следующие требования; ОМЧ не более 50 кл/мл; не допускается в 100 мл присутствия общих колiformных и термотолерантных бактерий, а также колифагов; не допускается присутствия сульфитредуцирующих клостридий в 20 мл и цист лямблей в 50 мл.

21.12 Санитарная микробиология почвы

Почва является главным резервуаром и естественной средой обитания микроорганизмов, принимающих участие в процессах формирования и самоочищения почвы и в круговороте веществ в природе [41]. Качественный состав микробиоты почвы очень разнообразен и включает преимущественно спорообразующие бактерии, актиномицеты, спирохеты, архебактерии, простейшие, цианобактерии, грибы, вирусы, микоплазмы. Состав микробиоты сильно зависит от вида почвы, способов ее обработки, содержания органических веществ, влажности, климатических условий и других причин.

В песчаных почвах преобладают аэробные микроорганизмы, в глинистых — анаэробные. Наибольшее их число находится в прикорневой зоне растений, где компоненты микробного пейзажа, специфичные для каждого вида растений, образуют зону интенсивного размножения и повышенной активности (ризосферная зона).

Количество микроорганизмов в почве достигает нескольких миллиардов в 1 г, больше всего в увлажненной почве (до 4,8-5,2 млрд. кл./г), меньше в лесной почве, в песках (1,2-0,9 млрд. кл./г).

На 1 гектаре почвы живая масса составляет 1000 кг. Распределение микроорганизмов неравномерно. Наиболее многообразна и многочисленна микробиота на глубине 10-20 см, где протекают биохимические процессы превращения органических веществ с участием микроорганизмов. В более глубоких слоях число микроорганизмов снижается.

В почву, как и в воду, вместе со сточными водами могут попадать представители нормальной микробиоты человека и животных, а также патогенные микроорганизмы. Как правило, они длительно не выживают в условиях окружающей среды. Однако многие бактерии, входящие в состав нормальной микробиоты человека, могут включаться в биоценоз почвы, а отдельные виды остаются ее постоянными обитателями. В связи с этим бывает трудно разделить микробиоту почв на резидентную и временно существующую. Для оценки роли почвы в возникновении инфекционных болезней необходимо знать возможную продол-

жительность сохранения и размножения патогенных микробов в почве.

В зависимости от срока жизни микроорганизмы, попадающие от человека, можно разделить на 3 группы.

1. Патогенные микроорганизмы, постоянно обитающие в почве, например, *Clostridium botulinum*. Попадая с фекалиями, могут неопределенно долго сохраняться в почве.

2. Спорообразующие патогенные микроорганизмы, для которых почва является вторичным резервом. Попадают с фекалиями человека и животных, а также с трупами животных. При благоприятных условиях могут размножаться и сохраняться в виде спор длительное время.

3. Патогенные микроорганизмы, попадающие с выделениями человека и животных и сохраняющиеся несколько недель или месяцев. В эту группу входят неспорообразующие бактерии, на сроки их сохранения влияет антагонистическая активность микробиоты почвы.

Санитарно-микробиологический контроль проводят по двум показателям: 1) общему микробному числу, показывающему число живых клеток в 1 г почвы; 2) наличию СПМ (БГКП, *Clostridium perfringens*, *Cl. sporogenes*, *Enterococcus faecalis*). Высокая численность сапротрофной микробиоты свидетельствует об органическом загрязнении, а при микробной контаминации выделениями человека и животных преобладают СПМ.

21.13 Санитарная микробиология воздуха

Воздух не является естественной средой обитания микроорганизмов, в воздухе микробы не питаются и не способны размножаться. Жизнеспособность микроорганизмов в воздухе обеспечивают взвешенные частицы воды, слизи, пыли, частицы почвы.

Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений существенно отличаются по качественному и количественному составу микробиоты. Бактериальная обсемененность жилых и некоторых типов производственных помещений всегда превышает обсемененность атмосферного воздуха. Условно микробиоту наружного воздуха разделяют на резидентную (наиболее часто обнаруживаемую) и временную, менее стойкую

к воздействию губительных факторов и обнаруживаемую спорадически.

Постоянная микробиота атмосферного воздуха формируется за счет почвенных организмов, в ее состав входят *Micrococcus roseus*, *M. flavus*, *M. candidans*, *Sarcina flava*, *S. rosea*, *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. mesentericus*, виды *Streptomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др.

Временная микробиота формируется за счет микроорганизмов, поступающих из почвы и с поверхности водоемов.

Контаминация воздуха закрытых помещений происходит капельным путем в составе аэрозоля при разговоре, кашле, чихании. Кроме того, микробы попадают со слущивающимся эпителием кожных покровов, с пылинками одежды и частичками почвы.

Аэрозоль представляет собой коллоидную систему из капелек влаги и твердых частиц, на которых адсорбированы микроорганизмы. Размеры частиц аэрозоля — от 10-100 до 2000 нм. В зависимости от размера капель, их электрического заряда и скорости движения в воздухе различают следующие фазы:

Капельная фаза, которая представлена мелкими каплями, длительно сохраняющимися в воздухе и испаряющимися до оседания.

Пылевая фаза представлена крупными, быстро оседающими и испаряющимися каплями. В результате образуется пыль, способная подниматься в воздушную среду.

Капельные ядрышки. Мелкие капельки аэрозоля (до 100 нм), высыхая, остаются в воздухе во взвешенном состоянии и образуют устойчивую аэро-дисперсную систему. В них частично сохраняется влага, поддерживающая жизнеспособность микроорганизмов.

Санитарно-микробиологическому контролю подлежит воздух закрытых помещений. В нем определяют ОМЧ (число жизнеспособных микроорганизмов в 1 м³ воздуха). В лечебных учреждениях дополнительно оценивают СПМ (стафилококки, α и β -гемолитические стрептококки).

В производственных помещениях определяют ОМЧ, анализ на СПМ не проводят. Допустимый уровень содержания микроорганизмов в воздухе определяется классами чистоты помещений, необходимыми для выполнения конкретных технологических операций.

Глава 22. ИСТОЧНИКИ И ПУТИ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

22.1 Общая характеристика типовых источников микробной контаминации в фармацевтическом производстве

К числу основных производств биологически активных веществ (БАВ) относят производство лекарственных субстанций, готовых лекарственных средств и иммунобиологических препаратов для медицины и ветеринарии, а также производство различных не-лекарственных веществ, используемых в народном хозяйстве.

Биотехнологическое производство представляет собой сложный многоступенчатый технологический процесс, включающий получение полупродукта, субстанции БАВ и готовой продукции.

Полупродуктом называют частично обработанное сырье или лекарственные вещества, которые должны пройти дальнейшие стадии производственного процесса прежде, чем они станут лекарственным продуктом.

Лекарственным веществом или *субстанцией* называют стандартизованное химическое соединение (вещество), обладающее лечебными или профилактическими свойствами, разрешенное к применению и предназначенное для изготовления лекарственных средств.

Готовое лекарственное средство (ГЛС) — это лекарственное средство, предназначенное для отпуска индивидуальному потребителю в удобной для применения (дозированной) форме. В готовой лекарственной форме лекарственное вещество проявляет максимальное терапевтическое действие, обладает минимальным побочным эффектом, является удобным для применения и хранения.

Лекарственные вещества (субстанции) получают химическим синтезом, путем выделения и химической очистки из растительного сырья или с использованием клеток-продуцентов (бактерий, грибов, растений и животных) (рис. 81). Особенности организации технологических процессов влияют на микробную контаминацию субстанции и в конечном итоге — готовой продукции.

При всем многообразии технологических схем получения разных по происхождению лекарственных веществ основными (типовыми) источниками попадания микроорганизмов в сферу биотехнологических производств являются:

- технологическое оборудование;
- сырье и вспомогательные вещества на всех стадиях производства, хранения и транспортировки продукции;
- тара и упаковочные материалы;
- вода, используемая в производстве;
- технологический и вентиляционный воздух;
- персонал, занятый в производстве.

Для производства с участием клеток-продуцентов в дополнении к перечисленным особое значение, как источники микробного загрязнения имеют питательная среда и добавки, пеногасители, посевной материал. В зависимости от характера производства и технологической стадии удельный вес вышеуказанных факторов в контаминации (contamine — загрязнение) может существенно изменяться.

22.2 Зависимость микробной контаминации от качества эксплуатации технологического оборудования

Значение оборудования и коммуникаций в возможной контаминации продуктов биосинтеза особенно велико при культивировании клеток продуцентов. Процесс должен осуществляться в асептических условиях [42].

Ферментационный комплекс включает аппарат для культивирования (ферментатор) и совокупность примыкающих к нему коммуникаций, арматуры, контрольно-измерительных приборов и др. Трубопроводы для подачи материальных потоков (стерильного воздуха, пара, питательной среды и добавок) достигают десятков километров. Вся эта система должна обеспечить стерильность внутреннего объема ферментатора. Разгерметизация ферментационного комплекса во время работы является одной из при-

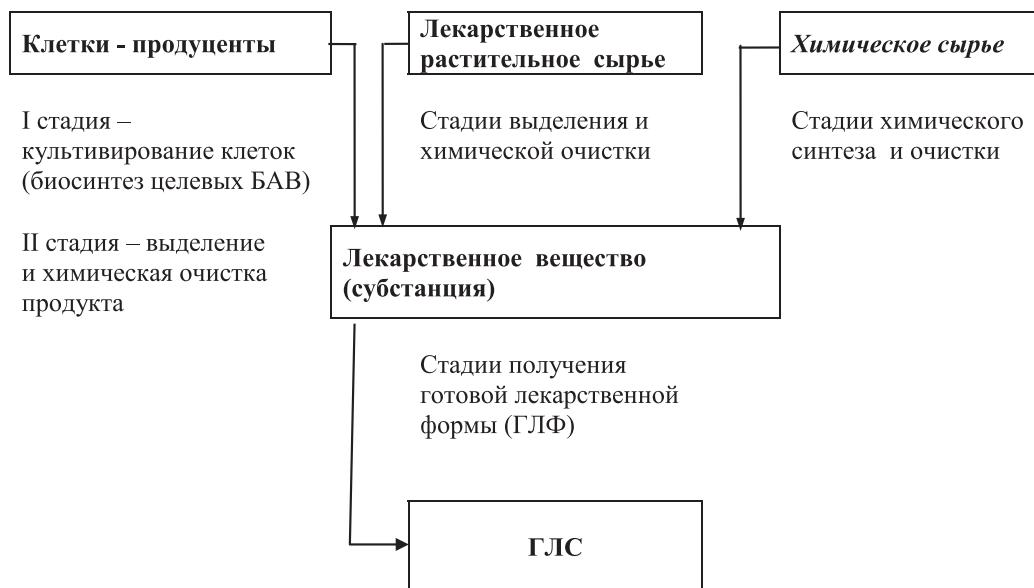


Рис. 81. Основные технологические процессы получения готовых лекарственных средств (ГЛС)

чин микробной контаминации. Это может произойти в результате несоответствия технического уровня оборудования требованиям эффективной герметизации, в результате чего микроорганизмы из окружающего воздуха будут попадать во внутренние полости аппаратов и арматуры.

Конструкционные особенности оборудования и коммуникаций не всегда обеспечивают стерилизуемость всех точек внутренних полостей. Например, особого внимания требует придонная часть ферментатора, где скапливается конденсат, а также трубные окончания для отбора проб из ферментатора и штуцеры для внесения посевного материала. При стерилизации температура в этих зонах будет ниже, чем во всем объеме ферментатора, что может стать причиной нестерильности. Важен правильный подбор материала, из которого изготавливают оборудование. Необходимо использовать такие материалы, внутренние поверхности которых не подвергаются биоповреждению и биообрастанию. Одним из условий, исключающих опасность биообрастания, является высокое качество обработки (полирования) внутренних поверхностей оборудования.

Целесообразным является замена природных фильтрующих материалов на синтетические, менее благоприятные для размножения микроорганизмов. Например, при использовании бельтинговой ткани в процессе фильтрации в новых образцах содержание клеток составляет менее 500, а в образцах, выстиранных для повторного использования до 10^4 на 1 см^2 поверхности.

Причинами загрязнения объектов производства через технологическое оборудование являются также неудовлетворительная подготовка его к работе (нека-

чественная мойка и дезинфекция, неэффективная стерилизация) и нарушение правил его эксплуатации.

22.3 Зависимость микробной контаминации от сырья и вспомогательных материалов

Сырье для производства лекарственных веществ может быть по происхождению минеральным, растительным, животным и синтетическим [43, 44]. Наиболее загрязненным является сырье животного и растительного происхождения.

22.3.1 Микробиота животного сырья

Сырье животного происхождения используют в качестве основного при получении органопрепаратов. Например, из поджелудочной железы свиней получают панкреатин, щитовидной железы крупного рогатого скота — тиреоидин, сердечной мышцы — цитохром С, тимуса — тималин и т. д. Органы убойных животных служат основой для многих питательных сред. В производстве вирусных вакцин используют культуры клеток почек обезьян, морских свинок, собак, а также эмбрионы: куриные, утиные, перепелиные и др.

Органы и ткани животных могут содержать большое количество микроорганизмов, включающих представителей нормальной микробиоты животного и микроорганизмов, попавших в соответствующий орган гематогенным путем при жизни животных в результате снижения сопротивляемости его организма при длительном голодании, утомленности и т. п. Микроорганизмы могут попадать в ткани после гибели жи-

вотных, а также в процессе обработки с инструментов, рук, одежды рабочих при первичной разделке туши, при хранении и транспортировке.

По качественному составу микробиота животного сырья может включать сапротрофные, патогенные и условно-патогенные, преимущественно аэробные и факультативно-анаэробные бактерии, бактерии группы кишечной палочки (БГКП) — родов *Proteus*, *Aeromonas*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*. Их количество может достигать $10\text{-}10^5$ клеток на 1 см³ поверхности. Многие микроорганизмы длительно сохраняются в сырье при замораживании. Например, сальмонеллы сохраняют жизнеспособность в мороженом мясе 13 месяцев, в яйцах — 12 месяцев. Животное сырье может содержать различные вирусы. Так, в культурах клеток обезьян, используемых для производства многих вакцин, обнаруживали адено-вирусы, энтеровирусы, вирус герпеса обезьян, вызывающие заболевания у человека. Поэтому предусмотрено проведение дополнительного вирусологического контроля с использованием специальных методов.

22.3.2 Микробиота лекарственного растительного сырья

Лекарственным растительным сырьем (ЛРС) называют высушенные части лекарственных растений, не подвергавшиеся химической обработке. К ним относят корни, корневища, кору, цветы, листья, плоды, почки и др. В настоящее время используют около 200 видов растений для получения на их основе лекарственных препаратов.

Лекарственные растения, как и все другие, являются естественной средой обитания микроорганизмов (глава 3). Их микробиоту подразделяют на эпифитную (*epi* — над, *phyton* — растение) и фитопатогенную (*pathos* — болезнь, страдание). К эпифитным относят микроорганизмы, развивающиеся в норме на поверхности растения и не наносящие ему вреда. Такие микроорганизмы не проникают внутрь тканей, растут за счет обычных выделений и органических загрязнений поверхности растения. Они устойчивы к фитонцидам, высушиванию и ультрафиолетовому облучению, препятствуют проникновению фитопатогенных микроорганизмов в растительные ткани. Наибольшее количество эпифитной микробиоты составляет *Erwinia herbicola* — антагонист возбудителей мягкой гнили овощей. В норме обнаруживают *Pseudomonas fluorescens*, *Phytomonas spp.*, *Chromobacterium spp.*, *Bacillus mesentericus*, небольшое количество грибов.

Состав микробиоты зависит от вида растения, возраста, высоты стебля, типа почвы, условий произрастания. При повышении влажности численность эпифитных микроорганизмов возрастает, при понижении

влажности — уменьшается. К фитопатогенным микроорганизмам относят бактерии, грибы, вирусы. Наиболее распространенные заболевания растений, вызываемые бактериями (бактериозы) и грибами (микозы) приведены в таблице 46.

Основные возбудители бактериозов и микозов растений

Таблица 46.

	Микроорганизм	Заболевание
Бактериозы	<i>Erwinia carotovora</i>	Некрозы и мокрые гнили
	<i>E. amylovora</i>	Пятнистость
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Сосудистые заболевания
	<i>Xanthomonas spp.</i>	Черная пятнистость
	<i>X. vesicatoria</i>	Туберкулез
Микозы	<i>X. beticola</i>	
	<i>Corynebacterium spp.</i>	Сосудистые и паренхиматозные заболевания
	<i>Agrobacterium spp.</i>	Опухоли (галлы)
	<i>A. tumefaciens</i>	Рак корней и корнеплодов
	<i>Myxomycota:</i>	
	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	Кила капусты
	<i>Chytridiomycota:</i>	
	<i>Synchytrium endobioticum</i>	Рак картофеля
	<i>S. taraxaci</i>	Галлы на листьях одуванчика
	<i>Olpidium brassicae</i>	Черная ножка капусты
	<i>Oomycota:</i>	
	<i>Phytophthora debarianum</i>	Корневая гниль всходов
	<i>Phytophthora infestans</i>	Гниль картофеля
	<i>Plasmopara viticola</i>	Ложная мучнистая роса винограда (милдью)
	<i>Ascomycota:</i>	
	<i>Erysiphe graminis</i>	Мучнистая роса злаков
	<i>Podosphaera leucotricha</i>	Мучнистая роса яблони и груши
	<i>Claviceps purpurea</i>	Спорынья на злаках
	<i>Sclerotinia spp.</i>	Белая гниль
	<i>Venturia spp.</i>	Парша
	<i>Basidiomycota:</i>	
	<i>Ustilago maydis</i>	Пузырчатая головня кукурузы
	<i>U. tritici</i>	Пыльная головня пшеницы
	<i>Urocystis occulta</i>	Стеблевая головня ржи
	<i>Puccinia graminis</i>	Стеблевая ржавчина злаков
	<i>Gymnosporangium sp.</i>	Ржавчина плодовых деревьев
	<i>Phragmidium disciflorum</i>	Ржавчина шиповника
	<i>Deuteromycota:</i>	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Фузариоз
	<i>Botritis cinerea</i>	Серая гниль плодов
	<i>Verticillium spp.</i>	Увядание и сухая гниль
	<i>Cladosporium spp.</i>	Бурая пятнистость
	<i>Ramularia spp.</i>	Белая пятнистость

Вирусы, вызывающие болезни растений (вирозы), являются причиной появления мозаики (пятнистой расцветки листьев и плодов) и желтухи, которая проявляется в карликовости растения и появлении измененных боковых побегов и цветков.

К признакам поражения ЛРС микроорганизмами можно отнести следующие.

1. Гниль сухая и мокрая (размягчение и разрушение отдельных участков тканей растения) в результате развития бактерий и грибов.

2. Белый налет (мучнистая роса) на листьях и побегах — результат размножения грибов.

3. Пожелтение, пятнистость вызывают грибы и бактерии.

4. Чернь, которая проявляется в возникновении на листьях и побегах черной, легко удаляющейся пленки в результате размножения грибов.

5. Ожоги — почернение побегов, листьев, плодов, цветов происходит в результате размножения бактерий *Erwinia amylovora*.

6. Деформация — изменение формы органов растения (искривление побегов, курчавость), как результат поражения грибами.

7. Опухоли — местное увеличение объемов ствола ветвей, корней и корневищ за счет гиперплазии клеток в месте повреждения бактериями, грибами или механическим путем.

8. Мозаика листьев — появление бледноокрашенных угловатых пятен, чередующихся с нормально окрашенными участками, результат поражения вирусами.

У пораженного растения происходят изменения клеточных структур и химического состава тканей, содержание биологически активных веществ снижается, использование такого сырья невозможно.

Кроме представителей эпифитной и фитопатогенной микробиоты, в ЛРС могут попадать посторонние микроорганизмы на всех стадиях его переработки, т. е. в процессе сбора, высушивания, измельчения, в процессе придания удобной для использования формы гранул или брикетов, в процессе упаковки, транспортировки и хранения.

При хранении повышенная влажность ($>60\%$) и температура ($>20^{\circ}\text{C}$) способствуют дополнительному размножению микроорганизмов. Это может привести к порче ЛРС вследствие развития грибов рода *Aspergillus*, *Penicillium* и других широко распространенных микроорганизмов-космополитов. В таких условиях резко снижается содержание действующих веществ. Например, листья наперстянки под действием микробиоты утрачивают 50% своей активности, а листья ландыша — 30%.

При использовании контаминированного ЛРС микробы-загрязнители попадают в субстанцию и готовую лекарственную форму. Особое значение имеет использование такого ЛРС для приготовления водных вытяжек: настоев, отваров и других лекарственных форм в домашних условиях.

Отрицательными последствиями использования контаминированного ЛРС могут быть снижение или полная потеря терапевтической ценности, развитие аллергических реакций, возникновение инфекционных заболеваний, попадание токсических продуктов. Среди последних особенно опасны токсины грибов (*Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* и др.), вызывающие микотоксикозы.

Чтобы исключить отрицательные последствия попадания микроорганизмов загрязнителей с сырьем и вспомогательными материалами, введены требования к микробиологической чистоте этих объектов фармацевтического производства (табл. 47).

22.4 Вода как один из видов сырья и вспомогательных материалов

Воду в производстве лекарственных веществ используют в качестве основного и вспомогательного материала. Вода является компонентом питательных сред и готовых лекарственных форм. Ее используют в технологии выделения и очистки БАВ, для санитарной подготовки помещений и оборудования, а также для приготовления растворов дезинфицирующих и антисептиков. В технологических процессах используют **питьевую воду** из центральных систем хозяйственно-питьевого водоснабжения и **очищенную воду**, получаемую на производстве методами дистилляции, ионного обмена, обратного осмоса, электродиализа. В производстве стерильных лекарственных препаратов используют **воду для инъекций**, которую получают из очищенной воды.

В Американской фармакопее предусмотрено использование воды питьевой, воды очищенной (для производства нестерильных лекарственных средств (НЛС), стерильной воды очищенной (для лекарственных средств наружного применения); воды для инъекций, стерильной воды для инъекций, стерильной бактериостатической воды (с добавлением биоцидов), стерильной воды для ингаляционных препаратов. Это разнообразие связано с тем, что качество воды оказывает существенное влияние на качество лекарственных препаратов.

Качество воды и систем ее подготовки, распределения и хранения являются критическими точками контроля при рассмотрении факторов, влияющих на безопасность фармацевтической продукции.

Качество воды регламентирует нормативно-техническая документация: ГОСТ, Санитарные правила и нормы 2.1.4.1074-01, фармакопейные статьи на воду очищенную (ФС 42.2619.97) и воду для инъекций (ФС 42.2620.97). В воде очищенной не допускается присутствие более 100 клеток микроорганизмов в 1 мл воды, исключая представителей семейства *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Вода для инъекций должна быть априогенной и содержать не более 10 КОЕ в 100 мл.

В процессе хранения в промышленных резервуарах количество микроорганизмов быстро увеличивается и может достигать 10^5 - 10^6 клеток бактерий в 1 л. *Legionella pneumophila* способна размножаться в воде при 57°C . Арматура и аппаратура, которая используется для хранения и распределения воды (насосы, трубопроводы, клапаны, счетчики воды и т. п.)

Таблица 47.

Категория	Субстанции, вспомогательные материалы	Рекомендуемые нормы
1.2.	Субстанции для производства	
1.2.А	Стерильных лекарственных препаратов, которые не подвергаются стерилизации	Субстанции должны быть стерильными
1.2.Б	Стерильных лекарственных препаратов, которые подвергаются стерилизации Нестерильных лекарственных препаратов, относящихся к Категории 2	<ul style="list-style-type: none"> Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл) Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл)
2.2	Субстанции синтетического происхождения для производства нестерильных лекарственных препаратов	<ul style="list-style-type: none"> Общее число аэробных микроорганизмов — не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл) Общее число грибов — не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) Отсутствие <i>Escherichia coli</i> — в 1 г (мл) Общее число аэробных микро-организмов — не более 10^4 КОЕ в 1 г (мл)
3.2	Субстанции природного происхождения (растительного, животного или минерального) для производства нестерильных лекарственных препаратов	<ul style="list-style-type: none"> Общее число грибов — не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) Отсутствие <i>Escherichia coli</i> — в 1 г (мл) Отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> в 25 г (мл) Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл) Энтеробактерий, устойчивых к желчи, — не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)
4.2	Вспомогательные вещества (мука пшеничная, крахмал, тальк и т.д.)	<ul style="list-style-type: none"> Общее число аэробных микроорганизмов — не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл) Общее число грибов — не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) Отсутствие <i>Escherichia coli</i> — в 1 г (мл) Отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> в 25 г (мл) Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл) Энтеробактерий, устойчивых к желчи, — не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)

Примечания к таблице 47:

1. В нормативных документах могут быть указаны в виде исключения и другие нормы в зависимости от состава ЛС и особенностей технологического процесса их производства.
2. При обнаружении во время проведения испытания других патогенных бактерий, кроме указанных выше, считают, что качество лекарственных средств, субстанций и вспомогательных веществ не соответствует требованиям по показателю «Микробиологическая чистота».

могут быть колонизированы микроорганизмами, образующими биопленку на их внутренних поверхностях, устойчивыми к действию биоцидов и представляющими опасность как источник микробной контаминации. Поэтому уделяют особое внимание организации системы водоподготовки. Трубопроводы могут быть изготовлены из нержавеющей стали, полимерных материалов особого изготовления или стекла. Их соединение и расположение должно обеспечивать возможность стерилизации путем пропускания чистящих и стерилизующих растворов со скоростью не менее 1,5 м/с в трубах наибольшего диаметра системы. Вода должна храниться при температуре не ниже 80 °С и циркулировать в предпредельной системе со скоростью 1-2 м/с для предотвращения образования биопленки. Для предупреждения биообрастания стенок сосудов используют режим рециклинига.

22.5 Зависимость микробной контаминации объектов производства от воздуха

Воздух производственных помещений может быть *атмосферным*, поступающим без предварительной очистки, и *вентиляционным*, подаваемым через системы воздухоподготовки. *Технологический* воздух используют для аэрирования при культивировании клеток-продуцентов, для транспортировки технологических жидкостей и сыпучих материалов из одних объемов в другие и для сухожаровой стерилизации материалов первичной упаковки (например, ампул для инъекционных растворов).

Причинами попадания микроорганизмов в объекты производства с воздухом могут быть первичная высокая контаминация атмосферного воздуха, особенно если он попадает без предварительной очистки,

и неэффективная работа системы воздухоподготовки. В зависимости от уровня требований, предъявляемых к микробной чистоте воздуха, уже на стадии проектирования выбирают необходимое число ступеней очистки.

22.6 Вспомогательные вещества в производстве ГЛС

Вспомогательные вещества используют в технологии получения ГЛС и для проявления максимальной биологической активности препарата в организме человека. В технологии их применяют в качестве наполнителей для получения необходимой массы таблетки (глюкоза, лактоза, сахароза, крахмал, хлорид натрия и др.); для коррекции вкуса (глюкоза, сахароза); для пролонгирования действия препаратов (некоторые масла, например, хлопковое); для придания необходимой лекарственной формы (масло какао для изготовления свечей или желатин для капсул). Многие из них могут содержать значительное количество микроорганизмов.

22.7 Упаковочный материал и его роль в контаминации ГЛС

Различают первичную или индивидуальную упаковку, которая непосредственно контактирует с препаратом, вторичную, объединяющую некоторое количество первичных упаковок и транспортную, в которой продукцию доставляют к месту хранения или реализации.

Первичная упаковка ГЛС представляет собой контейнер или емкость, обеспечивающие длительную защиту препарата от воздействия окружающей среды, в том числе экзогенной контаминации и влаги. К материалам первичной упаковки относят флаконы, ампулы из стекла, тюбики-капельницы из полиэтилена, контурно-ячейковые упаковки из поливинилхлорида, пленки, алюминиевую фольгу. Обсемененность зависит от природы материала, его микробостойкости и влажности. Не рекомендуется использовать упаковочные материалы, неустойчивые к биодеградации (бумагу, картон, корковые пробки).

Упаковочные материалы с гладкой непроницаемой поверхностью обычно имеют низкий уровень микробного загрязнения, но в условиях неправильного хранения их могут активно колонизировать микроорганизмы. Например, в стеклянных контейнерах при хранении во влажных условиях обнаруживают споры бацилл, грибов.

Одной из основных причин, по которым упаковочный материал может стать источником микробной контаминации, является адаптивная способность микроорганизмов использовать их как субстраты в метаболических процессах.

22.8 Карантин

Предупредить возможность распространения микроорганизмов из загрязненного источника позволяет приятие партиям сырья, вспомогательных, упаковочных, маркировочных материалов, полу-продуктов и готового продукта, статуса *карантин*, который предполагает их хранение отдельно или каким-либо иным способом, исключает их применение или реализацию до тех пор, пока не будет принято решение о выдаче разрешения на их использование.

22.9 Зависимость микробной контаминации от персонала

Люди являются активным источником контаминации микробными и пылевыми частицами [40, 42]. Основными причинами этого могут быть:

- 1) наличие различной и многочисленной микробиоты тела человека (постоянной и случайной);
- 2) выполнение технологических операций людьми, страдающими заболеваниями желудочно-кишечного тракта, кожи, дыхательных путей, являющимися микроносителями и имеющими индивидуальную повышенную потливость или сухость кожи;
- 3) отсутствие или плохое состояние технологической одежды;
- 4) несоблюдение персоналом требований к личной и производственной гигиене, а также несоблюдение правил поведения в ходе выполнения технологического процесса;
- 5) неправильный подбор персонала без учета характера производства и индивидуальных особенностей работающего.

Попадание микроорганизмов в сферу производства от персонала может происходить:

- 1) воздушно-капельным путем с выделениями из полости рта и верхних дыхательных путей;
- 2) воздушно-пылевым и контактным путями с участков кожи, не защищенных одеждой (лица, шеи, рук, волосяного покрова);
- 3) воздушно-пылевым и контактным путями с индивидуальной технологической одежды.

Из верхних дыхательных путей человека в окружающее пространство выделяется значительное количество микроорганизмов: так, при чихании на расстоянии 10 м и более распространяется до 100×10^3 жизнеспособных клеток бактерий и вирусных частиц, со слюной до 100×10^6 кл/мл слюны, с секретом полости носа — до 10×10^6 кл/мл.

Наиболее обсемененными участками кожи являются открытые участки кожи: кисти рук, кожа (под ногтями), лицо (у крыльев носа), шея. Количество механических и микробных частиц зависит от харак-

тера выполняемых в процессе производства движений. В течение 1 мин. человек, не двигаясь, выделяет в окружающую среду до 10×10^3 механических и микробных частиц; в положении сидя с легкими движениями рукой и головой — до 500×10^3 , а при интенсивной работе — до 10^6 .

Постоянная нормальная микробиота не может быть удалена механическим путем при обмывании. В процессе работы она быстро восстанавливается вследствие обильного потоотделения, которое способствует выходу микроорганизмов из пор сальных и потовых желез. Наиболее обсемененными являются руки, особенно первые фаланги 3-х рабочих пальцев, ладонная впадина, кожа у запястья, межпальцевые пространства. Другие участки кожи отличаются по содержанию микроорганизмов. Количество аэробных бактерий, содержащихся на 1 см² кожи головы составляет около $1,5 \times 10^6$; в подмышечной области — $2,4 \times 10^6$; на лбу — $0,2 \times 10^6$.

Заключение

Сырье животного происхождения может быть контаминировано сапротрофными, патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: бактериями группы кишечной палочки, видами родов *Proteus*, *Bacillus*, *Salmonella* и др., а также содержать различные вирусы.

Лекарственное растительное сырье может содержать фитопатогенные (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* и др.) и эпифитные бактерии, плесневые грибы (*Penicillium*, *Aspergillus* и др.).

Для предупреждения микробной порчи сырья следует строго соблюдать условия его хранения (температура, влажность и др.).

Микробиологическая чистота субстанций и вспомогательных веществ, используемых при производстве лекарственных препаратов, рекомендуется Фармакопеей.

Качество питьевой воды регламентирует СанПиН, воды очищенной и воды для инъекций — ФС.

Глава 23. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К КАЧЕСТВУ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

23.1 Микробиота нестерильных лекарственных средств

Одним из показателей качества лекарственного средства (ЛС) является уровень его микробной чистоты [39]. По этому показателю все ЛС делят на две категории: стерильные и нестерильные. *Стерильными* называют препараты, в которых в соответствии с требованиями ГФ не допускается содержание жизнеспособных клеток микроорганизмов. Их доля составляет около 20% от общего количества ЛС. *Нестерильными* называют такие ЛС, в которых допускается содержание живых микроорганизмов, количество и качественный состав которых зависит от вида и назначения продукции и нормируется соответствующей документацией. На долю нестерильных приходится около 80% общего числа выпускаемых ЛС. Микробиологические требования к качеству НЛС вырабатывались в связи с выявлением случаев заболевания людей в результате применения загрязненных микроорганизмами препаратов (табл. 48).

Примеры микробов-контаминаントов, обнаруженных в фармацевтических продуктах

Таблица 48.

Год	Анализируемый продукт	Обнаруженный микроб-загрязнитель
1943	Глазные капли	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1946	Тальк	<i>Clostridium tetani</i>
1966	Глазная мазь с антибиотиком	<i>P. aeruginosa</i>
1967	Крем для рук	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1969	Укропная вода	<i>P. aeruginosa</i>
1970	Раствор хлоргексидина цитрата	<i>Burkholderia cepacia</i>
1972	Инъекционный раствор	<i>Erwinia</i> sp.
1972	Порошок поджелудочной железы	<i>Salmonella</i> sp.
1977	Раствор для контактных линз	<i>Serratia</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp.
1981	Хирургическая одежда	<i>Clostridium</i> sp.
1982	Раствор йодофора	<i>P. aeruginosa</i>
1984	Полоскание, содержащее тимол	<i>P. aeruginosa</i>
1986	Антисептическое полоскание	coliформы

Контаминация лекарственных препаратов может происходить как в процессе производства, так и в период использования, особенно часто в условиях клиники, где происходит их загрязнение госпитальными штаммами микроорганизмов, например, *Pseudomonas aeruginosa*.

Под воздействием ферментов микроорганизмов при несоблюдении условий производства и хранения лекарственных препаратов может происходить их **биодеградация**, скорость которой определяется химическим составом лекарственного средства, присутствием в нем веществ, легко усвояемых микроорганизмами или обладающих биоцидной активностью, количеством и видовым составом контаминаントов, условиями среды (влажность, температура). Некоторые компоненты лекарственных препаратов (крахмал, желатин, каолин, магния трициликат, алюминия гидроксид, ПАВ, белки) могут защищать микробные клетки от консервантов.

На возможность развития процессов биодеградации влияет форма упаковки, которая должна предотвращать доступ контаминаントов и контролировать влажность.

23.2 Роль микроорганизмов-контаминаントов лекарственных средств в патологии человека

Основными отрицательными последствиями для больных при использовании препаратов, содержащих микроорганизмы, могут быть снижение или отсутствие терапевтического действия препарата, возникновение заболеваний, неблагоприятных побочных реакций, а также передача и распространение лекарственно устойчивых бактерий. Заболевания могут иметь инфекционную или неинфекционную природу. Заболевания неинфекционной природы могут быть обусловлены продуктами биоразрушения субстанции и микробными токсинами. Последние могут вызывать токсикоинфекции и интоксикации (токсикозы). Токсикоинфекции — это обширная группа острых кишечных заболеваний, которые развиваются после приема per os (через рот) лекарственных препаратов,

обильно контамированных патогенными и условно-патогенными бактериями, содержащими эндотоксины. Токсикоинфекции являются полиэтиологическими, их могут вызывать различные микроорганизмы: энтеротоксигенные варианты кишечной палочки, протей, энтерококки, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, реже — бактерии рода *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*. Токсикозы обусловлены попаданием экзотоксинов некоторых бактерий (*S. aureus*, *C. botulinum*), грибов, а также токсичных продуктов микробной деградации субстанции.

Инфекционные заболевания, возникающие в результате использования контамированных ЛС, могут иметь разную локализацию и клиническую форму:

- 1) гнойно-септические инфекции (местные или генерализованные);
- 2) грибковые поражения кожи, слизистых, глаз и других органов;
- 3) заболевания вирусной природы (например, в результате применения контамированных препаратов крови);
- 4) кишечные инфекции (эшерихиозы, сальмонеллезы).

Возникновение, развитие и исход заболевания зависят от уровня микробной контаминации, биологических особенностей микробы-загрязнителя (его вирулентности), от резистентности пациента и способа введения препарата. Важную роль в развитии заболевания имеет способ применения контамированных препаратов. Наибольшую опасность представляет их введение в кровоток, глаза, в полости тела, в норме свободные от микроорганизмов. При местном применении препаратов вероятность развития инфекционного процесса резко возрастает при обширных повреждениях тканей в результате травмы, ожога, хирургического вмешательства. Например, *Staphylococcus aureus* при попадании с ЛС на поврежденную кожу и слизистые может вызывать гнойно-воспалительные процессы; при ингаляционном введении — стафилококковую пневмонию; при пероральном — токсикоинфекцию или интоксикацию; при попадании в кровяное русло — генерализованную инфекцию (сепсис).

23.3 Микробиологические требования к качеству ГЛС

Современные требования к микробиологической чистоте лекарственных препаратов представлены в табл. 49 [37].

Кроме приведенных допустимых уровней предельного содержания микроорганизмов-контаминантов различных лекарственных средств в настоящее время активно обсуждается вопрос о создании дополнительной категории, ограничивающей контаминацию посторонними бактериями и грибами иммунобиологических препаратов, содержащих живые микроорганиз-

мы в своем составе, таких как вакцина, бактериофаги, пробиотики. Трудности сопряжены не только с нормированием, но и с разработкой и аprobацией методов микробиологической оценки качества подобных препаратов.

Выбор микроорганизмов, нормирование которых предусмотрено Фармакопеей определяется их опасностью для здоровья населения и способностью служить критерием оценки гигиенического состояния производства, предусмотренного GMP. Этот выбор достаточно ограничен по экономическим соображениям, но в настоящее время признан достаточным для получения результатов, адекватно отражающих качество продукции по микробиологическим показателям и со временем может быть расширен. В качестве примера можно привести: испытание на наличие *Candida albicans* в интравагинальных лекарственных препаратах, которое только вводится при оценке качества указанных отечественных препаратов, в то время как существует в зарубежных фармакопеях достаточно длительное время. Испытание лекарственных средств на микробиологическую чистоту согласно действующей в настоящее время фармакопеиХII проводят в асептических условиях с помощью приведенных ниже методов и питательных сред, по составу аналогичных средам Европейской Фармакопеи текущего издания.

23.4 Оценки качества лекарственных препаратов

Процедура оценки качества лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций включает:

- методы определения антимикробного действия и способы его нейтрализации;
- способы подготовки различных лекарственных форм;
- отбор образцов для анализа;
- методы количественного определения жизнеспособных микроорганизмов-контаминантов;
- методы выявления и идентификации отдельных видов бактерий, наличие которых недопустимо или ограничено в лекарственных средствах;
- методы выявления *Candida albicans* в интравагинальных лекарственных препаратах;
- рецепты используемых питательных сред, растворов и реактивов;
- методы контроля питательных сред перед использованием и требования к их качеству.

Стандартной температурой для инкубации посевов на питательных средах для бактерий является $(32,5\pm2,5)$ °C, для грибов — $(22,5\pm2,5)$ °C, если нет других указаний в частных фармакопейных статьях.

При проведении испытаний по определению антимикробного действия ЛС, качества питательных сред, биохимического тестирования выделенных микроорганизмов необходимо использовать тест-штаммы

Категория	Препараты	Рекомендуемые требования
1	Препараты, в том числе биологические лекарственные средства, включая ИБЛС, к которым предъявляется требование «Стерильность»	Препараты должны быть стерильными
2	<ul style="list-style-type: none"> Для применения местно, наружно, интравагинально Для введения в полости уха, носа Респираторно Трансдермальные пластыри 	<ul style="list-style-type: none"> Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) — не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата, или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу) Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) препарата, или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу) Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл) препарата, или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу) Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл) препаратов, используемых респираторно Отсутствие <i>Candida albicans</i> в 1 г (мл) интравагинальных препаратов
3.А.	Для приема внутрь или введения ректально	<ul style="list-style-type: none"> Общее число аэробных микроорганизмов — не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл) Общее число грибов — не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г (мл) Общее число аэробных микро-организмов — не более 10^4 КОЕ в 1 г (мл) Общее число грибов — не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) Энтеробактерий, устойчивых к желчи, — не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г (мл) Отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 г (мл) Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл)
3.Б.	Для приема внутрь — из сырья природного происхождения (животного, растительного или минерального), уровень микробной загрязненности которого невозможно снизить в процессе предварительной обработки и относительно которого федеральный орган допускает уровень микробной загрязненности более 10^3 жизнеспособных микроорганизмов в 1 г или в 1 мл.	
4.	Лекарственные растительные средства, состоящие из одного вида сырья (фасованная продукция) или нескольких (сборы), а также растительное сырье «ангро»	
4.А.	Лекарственные растительные средства или лекарственное сырье «ангро», применяемые в виде настоев и отваров, приготовленных с использованием кипящей воды	<ul style="list-style-type: none"> Общее число аэробных микро-организмов — не более 10^7 КОЕ в 1 г Общее число грибов — не более 10^5 КОЕ в 1 г <i>Escherichia coli</i> — не более 10^2 КОЕ в 1 г
4.Б.	Лекарственные растительные средства или растительное сырье «ангро», приготовленные без использования кипящей воды	<ul style="list-style-type: none"> Общее число аэробных микроорганизмов — не более 10^5 КОЕ в 1 г Общее число грибов — не более 10^4 КОЕ в 1 г Энтеробактерий, устойчивых к желчи, — не более 10^3 КОЕ в 1 г Отсутствие <i>Escherichia coli</i> — в 1 г Отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> в 25 г

Примечания к таблице 49:

- В нормативных документах могут быть указаны в виде исключения и другие нормы в зависимости от состава ЛС и особенностей технологического процесса их производства.
- В нормативных документах на препараты для детей могут быть введены более строгие нормы, а именно:
 - в 1 г (мл) препаратов для детей (от 0 до 1 года) — не более 50 аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) при отсутствии энтеробактерий, устойчивых к желчи, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*
 - в 1 г (мл) препаратов для детей (старше 1 года) — не более 500 аэробных микроорганизмов и 50 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) при отсутствии энтеробактерий, устойчивых к желчи, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.
- При обнаружении во время проведения испытания других патогенных бактерий, кроме указанных выше, считают, что качество лекарственных средств, субстанций и вспомогательных веществ не соответствует требованиям по показателю «Микробиологическая чистота».

микроорганизмов, полученные из официальных коллекций микроорганизмов (50):

- Американской коллекции типовых культур, США (ATCC);
- Национальной коллекции типовых культур, Великобритания (NCTC);
- Коллекции культур института Пастера, Франция (CIP);
- Всероссийской коллекции микроорганизмов РАН, Россия (ВКМ);
- Государственной коллекции патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ);
- Коллекции Всероссийского микологического центра, Россия.

Список тест-штаммов микроорганизмов, используемых в испытаниях

Таблица 50.

Название микроорганизма (род, вид)	Номер штамма
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10702
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922, ATCC 8739
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Abony</i> (прежнее название <i>Salmonella abony</i>)	NCTC 6017, CIP 80.39 IHE 103/39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990, ATCC 12228
<i>Candida albicans</i>	NCTC 885-653, ATCC 10231
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (прежнее название <i>Aspergillus niger</i>)	ATCC 9642, ATCC 16404, BKM F1119

Кроме перечисленных в таблице тест-штаммов микроорганизмов можно использовать и другие культуры, типичные по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам при условии проведения валидации методики. Набор тест-микроорганизмов может быть уменьшен или увеличен в случае необходимости.

Тест-микроорганизмы в лиофилизированном виде в ампулах, в пробирках на полужидком агаре хранят при температуре от 2 до 8°C. Культуры микроорганизмов на дисках хранят при температуре не ниже минус 20°C.

Не допускается более пяти пассажей от исходной культуры. Работу с микроорганизмами проводят в полном соответствии с XII Государственной Фармакопеей. При этом учитывают особенности отдельных тест-штаммов, описанные в сертификатах (паспортах на штамм) и инструкциях производителя.

23.5 Определение антимикробного действия

Перед испытанием на микробиологическую чистоту необходимо определить возможность прояв-

ления лекарственным средством антимикробного действия в отношении определенных видов микроорганизмов [28].

В основе метода определения антимикробного действия лежит сравнение интенсивности роста тест-штаммов микроорганизмов в присутствии или в отсутствие испытуемого препарата.

Приготовление инокулята проводят следующим образом: 24-часовые бульонные культуры бактерий выращенные на соево-казеиновом бульоне или среде № 8 и 48-часовую культуру *C. albicans* выращенную на жидкой среде Сабуро разводят стерильным раствором натрия хлорида 0,9% до концентрации около 10⁴ КОЕ/мл:

- 1:1000 (*B. cereus*, *C. albicans*);
- 1:100000 (*E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*).

Взвесь спор *B. subtilis* также разводят до концентрации 10⁴ КОЕ в 1 мл.

Культуру *A. brasiliensis* со скоженного агара Сабуро с глюкозой или со среды № 2 смывают фосфатным буферным раствором с 0,05% твина-80. Определяют количество конидий в 1 мл смыва, используя камеру Горяева или чашечный агаровый метод, и разводят до концентрации 10⁴ конидий в 1 мл.

Образец ЛС готовят в виде раствора, суспензии или эмульсии в зависимости от физических свойств лекарственной формы, добавляя соответствующий разбавитель для получения разведения 1:10. В качестве разбавителя используют, как правило, фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном pH 7,0 или тот же буферный раствор, содержащий не более 5% твина-80.

Для разведения препаратов с известным антимикробным действием используют нейтрализующую жидкость. Из разведения 1:10 готовят последовательные разведения 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 и т. д.

Испытание на наличие антимикробного действия проводят одним из описанных ниже методов.

23.6 Определение антимикробного действия в условиях испытания на микробиологическую чистоту

Каждое разведение препарата в количестве 1 мл вносят в 6 чашек Петри диаметром 90 мм, в две из которых добавляют по 0,2 мл взвеси *B. cereus* (или спор *B. subtilis*), в две другие — по 0,2 мл рабочей взвеси культуры *C. albicans*, в 2 последние — 0,2 мл взвеси конидий *A. brasiliensis*. Чашки с бактериями заливают 10-15 мл расплавленного и охлажденного до (42,5±2,5) °C соево-казеинового агара или среды № 1, чашки с культурами грибов — тем же количеством агара Сабуро или среды №2.

По 1,0 мл каждого разведения препарата вносят в пробирки с 10 мл жидких сред — бульона Моссе-

ля и соево-казеинового бульона (или аналогичных — среда № 3 и среда № 8). Затем по 1 мл взвеси тест-штаммов *E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* (каждый штамм отдельно) вносят в пробирку со средой, соответствующей потребностям тестируемого микроорганизма.

В контрольные чашки и пробирки вместо разведений препарата вносят такое же количество растворителя.

Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение 48 ч для бактерий и 72 ч — для грибов.

Метод репликаций рекомендуется использовать для определения antimикробного действия водонерастворимых (сuspензии, эмульсии и др.) или окрашенных лекарственных средств.

В стерильные чашки Петри вносят по 1 мл каждого разведения исследуемого препарата. В контрольные чашки вносят по 1 мл разбавителя, используемого для получения разведений. В чашки Петри, как в эксперименте, так и в контроле, добавляют по 10-15 мл расплавленного и охлажденного до $(42,5 \pm 2,5)$ °C соево-казеинового агара или среды №1, в другие — такое же количество среды Сабуро или среды №2 и тщательно перемешивают. После застывания агара чашки подсушивают в термостате или ламинарном шкафу для удаления конденсата с поверхности среды, на которую затем бактериологической петлей, пипеткой или репликатором наносят рабочую взвесь каждого тест-штамма бактерий и грибов в виде бляшек. Посевы на средах инкубируют в стандартных условиях в течение 48 ч для бактерий и 72 ч — для грибов.

После окончания сроков инкубации при визуальном просмотре отмечают появление типичного роста тест-микроорганизмов в контрольных чашках и пробирках (без препарата) и испытуемых (с различными разведениями препарата). В случаях, затрудняющих учет результатов (помутнения или изменения окраски жидкой среды в результате взаимодействия лекарственного средства с питательной средой), делают пересевы на агаризованные среды.

При наличии роста *E. coli*, *S. abony*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* на питательных средах отмечают отсутствие antimикробного действия исследуемого препарата.

Наличие в испытуемых чашках и пробирках роста тест-микроорганизмов, аналогичного контрольным, обозначают знаком «+», отсутствие роста знаком «-». Если на средах с препаратором наблюдают уменьшение количества колоний на чашках или отсутствие роста тест-микроорганизмов, делают заключение о наличии antimикробного действия. Первое из последовательных разведений препарата, в котором отсутствует antimикробное действие, используют для посева на соответствующую питательную среду.

Для устранения antimикробного действия ЛС могут быть использованы следующие методы:

- увеличение разведения препарата, за счет большего объема разбавителя или питательной среды в пределах норм допустимой микробной загрязненности (в качестве разбавителя вместо стандартного фосфатного буферного раствора используют нейтрализующую жидкость (п. 9) лабораторного или промышленного изготовления);

- применение специфических инактиваторов (например, β -лактамазу для некоторых антибиотиков и парааминобензойную кислоту (ПАБК) для сульфаниламидных препаратов), нейтрализующих antimикробное действие препарата, но не угнетающие рост микроорганизмов, контактирующих ЛС;

- для препаратов с консервантами рекомендуется использование неспецифических инактиваторов. После проведения валидации в буферный раствор и (или) в питательные среды могут быть добавлены твин-80, соевый или яичный лецитин и др.

- для препаратов, растворимых в воде или в изопропилмиристате (ИПМ), применяется метод мембранный фильтрации с последующим промыванием фильтров.

23.7 Отбор образцов лекарственных средств для анализа качества по показателю «Микробиологическая чистота»

От каждой исследуемой серии ЛС для проведения испытания отбирают необходимое количество образцов, в соответствии с категорией препарата из достаточного числа разных упаковок (не менее 3-10).

Для аэрозолей на основе жидких или твердых веществ отбирают 10 контейнеров, для трансдермальных пластырей — 10 пластырей.

В некоторых случаях (высокой стоимости препарата и/или малого объема серии) образец может быть уменьшен в отдельных случаях до 2 г (мл), если иначе не указано в частной фармакопейной статье. Уменьшение количества образца с указанием метода испытания должно быть валидировано и утверждено в нормативной документации в установленном порядке.

Для твердых лекарственных форм, в случае если нет указаний в частных статьях, при анализе препарата используют:

- 10,0 г образца для определения общего числа бактерий и грибов в 1 г препарата, для испытания на отсутствие *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli*,

- 25,0 г образца — для определения бактерий рода *Salmonella*,

- 10,0 г — для количественного определения энтеробактерий, устойчивых к желчи.

Для таблеток, драже, гранул, порошков и др. 10,0 г образца (если другое количество не указано в частных статьях) измельчают (в случае необходимости) и переносят в 100 мл буферного раствора. Далее проводят

количественное и качественное определение микроорганизмов.

Для капсул 10,0 г образца переносят в 100 мл буферного раствора, содержащего не более 5% твина-80 и нагретого до температуры не выше 40°C. После суспенсирования капсул в буферном растворе проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

Для мягких лекарственных форм, в случае если нет указаний в частных статьях, при анализе препарата используют:

— 10,0 г препарата для определения общего числа бактерий и грибов, для теста на отсутствие *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* в 1 г препарата,

— 10,0 г образца — для теста на отсутствие или количественного определения энтеробактерий, устойчивых к желчи в 1 г препарата.

Для мазей, линиментов, кремов, суппозиториев, легко смешиваемых с водой, 10,0 г образца помещают в стерильную колбу, содержащую 100 мл буферного раствора и стеклянные бусы диаметром 5-6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры не выше 40°C и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

Для мазей, линиментов, кремов, суппозиториев, трудно смешиваемых с водой, 10,0 г образца смешивают со стерильным твином-80, количество которого не должно быть более 1/2 объема образца (в данном случае 5 г). Смесь нагревают на водяной бане или в термостате до температуры не выше 40°C (в исключительных случаях до 45°C) и осторожно перемешивают. При этом время нагревания не должно превышать 30 мин. Добавляют необходимое количество предварительно нагретого до соответствующей температуры стерильного фосфатного буферного раствора со стеклянными бусами. Смесь осторожно перемешивают для получения гомогенной эмульсии в разведении 1:10, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов. Возможно использование других технических средств и методик гомогенизации с соблюдением правил асептики и режимов термостатирования.

Для жидких лекарственных форм, в случае если нет указаний в частных статьях, при анализе препарата используют:

— 10,0 мл образца для определения общего числа микроорганизмов и грибов в 1 мл препарата, для теста на отсутствие *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*,

— 25,0 мл — для испытания на отсутствие бактерий рода *Salmonella*.

— 10,0 мл — для количественного определения энтеробактерий, устойчивых к желчи.

Для растворов, супензий, сиропов, микстур 10,0 мл образца переносят в 90 мл буферного раствора,

перемешивают и проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

Для растворов в маслах, эмульсий 10,0 мл образца помещают в стерильную колбу, содержащую 90 мл буферного раствора с твином-80 в количестве не более 5% и стеклянные бусы. Смесь нагревают на водяной бане до температуры не выше 40°C и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

23.7.1 Для лекарственных средств в форме аэрозолей

Для аэрозолей на основе спиртов и твердых веществ 3,0 г образца (после испарения пропеллента) переносят в 30 мл буферного раствора, перемешивают и проводят количественное и качественное определение микроорганизмов. Не менее 1,0 г образца используют для количественного определения энтеробактерий, устойчивых к желчи.

Для аэрозолей на основе масел 3,0 г образца (после испарения пропеллента) переносят в 30 мл буферного раствора с твином-80 в количестве не более 5% и стеклянные бусы. Смесь нагревают на водяной бане до температуры не выше 40°C и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов. Не менее 1,0 г образца используют для количественного определения энтеробактерий, устойчивых к желчи.

23.7.2 Для трансдермальных пластырей

При отборе трансдермальных пластырей используют образец, состоящий из 10 единиц. С каждого из 10 пластырей снимают защитную пленку, пользуясь стерильными инструментами. При необходимости пластырь разрезают стерильными ножницами на более мелкие фрагменты, которые переносят в колбу вместимостью 1000 мл, содержащую 500 мл стерильного буферного раствора и стеклянные бусы. Колбу нагревают на водяной бане до температуры не выше 40°C, энергично встряхивают в течение 30 мин. Используют 50 мл полученного смыва для количественного определения микроорганизмов методом мембранный фильтрации и определения на отсутствие *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

Если известно, что пластырь обладает антимикробным действием, в разбавитель добавляют подходящий инактиватор (твин-80 и (или) лецитин).

В случае, если смыв с трансдермальных пластырей нельзя использовать для определения методом мембранный фильтрации, применяют метод прямого посева на питательные среды.

23.7.3 Для лекарственных растительных средств (ЛРС)

К ЛРС относятся лекарственные препараты, в том числе сборы, расфасованные в пачки, пакеты, брикеты и пр.

От каждой контролируемой серии лекарственного препарата независимо от ее объема отбирают минимум 5 невскрытых пачек, пакетов, брикетов. Перед испытанием пачки вскрывают с помощью стерильных инструментов, отбирают из них пробу в равных количествах, перемешивают и переносят в стерильную емкость. Масса пробы должна составлять не менее 50,0 г.

Для количественного определения аэробных микроорганизмов и грибов образец в количестве 10,0 г (плоды, кора, корни и корневища, почки и др.) или 2,0 г (трава, листья, цветки и другие с большим коэффициентом водопоглощения), переносят в стерильную колбу. При объеме образца 10,0 г в колбу помещают 100 мл стерильного раствора натрия хлорида 0,9%. Колбу с исследуемым образцом встряхивают на качалке или аппарате для встряхивания в течение не менее 15 мин. Полученный смыв считают разведением 1:10. При объеме образца 2,0 г в колбу добавляют 200 мл стерильного раствора натрия хлорида 0,9%. Полученный смыв считают разведением 1:100.

Если образец плохо смачивается, в колбу добавляют поверхностно-активное вещество — стерильный твин-80 в количестве 0,1% от объема раствора.

Из полученных сывороток ЛРС, соответствующих разведениям 1:10 или 1:100, готовят последующие десятикратные разведения в том же разбавителе, которые используют для количественного определения аэробных бактерий и грибов, а также для испытания на отсутствие *E. coli*, *Salmonella* и энтеробактерий, устойчивых к желчи.

23.8 Методы количественного определения аэробных микроорганизмов

В зависимости от природы лекарственного средства и его физико-химических свойств используют один из вариантов чашечного агарового метода (глубинный, двухслойный, поверхностный, модифицированный глубинный), метод мембранный фильтрации или пробирочный метод наиболее вероятных чисел (НВЧ).

23.8.1 Чашечные агаровые методы

Для культивирования микроорганизмов используют агаризованные питательные среды в соответствии с рецептами Государственной фармакопеи XII изд.: соево-казеиновый агар или среду №1, сухую, для контроля микробной загрязненности — для выращивания бактерий, агар Сабуро с глюкозой или среду №2, су-

хую, для контроля микробной загрязненности — для выращивания дрожжевых и плесневых грибов.

Для каждого разведения образца используют не менее двух чашек Петри с определенной средой.

23.8.2 Глубинный метод

В стерильную чашку Петри диаметром 90 мм вносят 1 мл испытуемого образца, приготовленного для анализа. Добавляют 15-20 мл расплавленной и охлажденной до $42,5\pm2,5^{\circ}\text{C}$ агаризованной питательной среды и быстро перемешивают вращательными движениями. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают до 20-25 мл. После застывания агара чашки переворачивают и инкубируют посевы.

23.8.3 Двухслойный метод

Расплавленные агаризованные питательные среды вносят в количестве 15-20 мл в каждую стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляют до застывания. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают. Поверхность агара в чашках подсушивают.

В пробирку с 4 мл соответствующей расплавленной и охлажденной до $42,5\pm2,5^{\circ}\text{C}$ питательной среды вносят 1 мл образца, приготовленного для анализа, быстро перемешивают содержимое пробирки. Затем содержимое пробирки выливают на поверхность застывшего и подсущенного агара в чашке Петри, равномерно распределяя верхний слой среды вращательными движениями. После застывания чашки переворачивают и помещают в термостат для инкубации.

23.8.4 Поверхностный метод

Расплавленные и охлажденные до $42,5\pm2,5^{\circ}\text{C}$ питательные среды вносят в количестве 15-20 мл в каждую стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляют до застывания. Поверхность агара в чашках подсушивают.

Образец, приготовленный для анализа, наносят на агар в количестве 0,1 мл и равномерно распределяют шпателем по поверхности среды.

Чашки переворачивают и помещают в термостат для инкубации.

23.8.5 Модифицированный глубинный метод

Образец, приготовленный для анализа, в количестве 1,0 мл вносят в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм. Добавляют 7-10 мл расплавленной и охлажденной до $42,5\pm2,5^{\circ}\text{C}$ питательной среды и быстро перемешивают вращательными движениями. После застывания агара чашки переворачивают и инкубируют

ют. Учет результатов производят через 48 ч и окончательно через 5 сут.

23.9 Учет и интерпретация результатов чашечных агаровых методов

Посевы просматривают ежедневно. Подсчет колоний производят через 48-72 ч (предварительный результат) и через 5 сут. (окончательный результат).

Для получения достоверных результатов отбирают чашки, где число колоний бактерий не превышает 250, а колоний грибов — 50. Если при учете результатов двух последующих разведений число колоний на чашках находится в указанных выше пределах, рассчитывают результаты из меньшего разведения.

Если в среднем на чашках выросло более 250 колоний бактерий или более 50 колоний грибов, делают ряд дальнейших последовательных разведений образца, выбирая приемлемое для посева.

Если в среднем на чашках выросло менее 15 и более 250 колоний бактерий или менее 15 и более 50 колоний грибов, делают ряд дальнейших последовательных разведений образца, выбирая приемлемое для посева.

Если на соево-казеиновом агаре (или на среде №1) дополнительно обнаружены колонии грибов, то их суммируют с числом бактерий и определяют общее число аэробных микроорганизмов, которое лимитировано для каждой категории ЛС.

Если на питательной среде отсутствует рост микроорганизмов, результаты отмечают следующим образом: при посеве лекарственного средства в разведении 1:10 — «В 1 г (или в 1 мл) лекарственного средства содержится менее 10 бактерий (или грибов)»; при посеве лекарственного средства в разведении 1:100 — «В 1 г (или в 1 мл) лекарственного средства содержится менее 100 бактерий (или грибов)» и т. д.

Количество микроорганизмов в 1 г или в 1 мл рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{\sum c}{n} \cdot d \cdot 10$$

Где N — количество микроорганизмов в 1,0 г или в 1,0 мл, c — сумма колоний на всех чашках Петри, n — число чашек Петри, d — коэффициент разведения образца, 10 — коэффициент пересчета при проведении высея на чашку в объеме 0,1 мл.

Пример. При посеве из разведения 10^{-2} на двух чашках выросло 168 и 215 колоний

$$N = \frac{168 + 215}{2} \cdot 10^2 = 191,5 \cdot 10^2 = 1,9 \cdot 10^4$$

Полученный результат записывают как $1,9 \cdot 10^4$ колониеобразующих единиц (КОЕ).

При необходимости подсчета общего количества микроорганизмов (бактерий и грибов суммарно) в 1 г или в 1 мл лекарственного средства следует сложить число аэробных бактерий с числом грибов.

В связи с тем, что ЛРС, представляющие собой лекарственные растения или их части (листья, цветки, трава, плоды, семена, кора, корни, корневища и др.), являются неоднородными в отношении количества аэробных бактерий и грибов, нормы допустимой микробной загрязненности ЛРС интерпретируют следующим образом:

- Если количество микроорганизмов в 1 г не более 10^5 КОЕ — максимально допускается 5×10^5 КОЕ
- Если количество микроорганизмов в 1 г не более 10^7 КОЕ — максимально допускается 5×10^7 КОЕ и т. д.

Для остальных категорий лекарственных препаратов (за исключением ЛРС) нормы допустимой микробной загрязненности интерпретируют следующим образом:

- Если количество микроорганизмов в 1 г или в 1 мл не более 10^2 КОЕ — максимально допускается 2×10^2 КОЕ
- Если количество микроорганизмов в 1 г или в 1 мл не более 10^3 КОЕ — максимально допускается 2×10^3 КОЕ и т. д.

Варианты чашечного агарового метода (глубинный, двухслойный и модифицированный) можно использовать при испытании различных лекарственных форм, независимо от уровня микробной загрязненности. Поверхностный агаровый метод предпочтительнее использовать при испытании ЛС с высоким уровнем микробной контаминации. Для сокращения сроков получения результатов количественного определения бактерий и грибов, колонии которых склонны к сливному росту, используют модифицированный агаровый метод посева.

23.10 Метод мембранный фильтрации

используют для количественного и качественного определения микроорганизмов в лекарственных средствах, обладающих или не обладающих антимикробным действием, в частности для растворов и водорастворимых лекарственных средств, а также для жиро содержащих препаратов, растворимых в изопропилмаслянке.

23.10.1 Условия проведения испытания

Установка для мембранный фильтрации должна иметь конструкцию, из которой легко извлекается фильтр, с последующим его переносом на питательные среды. Используют мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм, способные эффективно задерживать микроорганизмы, что необходимо под-

твердить валидацией. Материал мембранны следует выбирать таким образом, чтобы компоненты исследуемого препарата не влияли на его эффективность. Фильтры из нитрата целлюлозы используют для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов (менее 30%), из ацетата целлюлозы — для спиртовых растворов (более 30%), кислот, щелочей. Мембранные фильтрацию проводят в асептических условиях с помощью вакуума.

Во время выполнения испытания образец, как правило, растворяют в буферном растворе в соотношении 1:10. В воронку фильтровальной установки вносят сначала промывную жидкость (примерно 5 мл) для смачивания фильтра. Добавляют количество раствора препарата, соответствующее 1 г испытуемого образца, и немедленно фильтруют. В случае наличия антимикробного действия лекарственного средства для отмывания мембранны используют раствор натрия хлорида 0,9% или описанные ниже жидкости (№1, №2, №3), для чего через фильтр пропускают минимум три порции по 100 мл подходящей стерильной промывной жидкости. При необходимости к промывной жидкости могут быть добавлены поверхностно-активные вещества (например, твин-80) или инактиваторы антимикробного действия. Через одну мембрану можно пропускать не более 500 мл жидкости. Допускается использование для отмывания мембранны менее трех порций промывной жидкости при условии валидации метода.

Смыв с трансдермальных пластырей пропускают через мембранные фильтры по 50 мл (соответствует 1 пластырю) через каждую мембрану.

По окончании процесса фильтрации мембранны переносят на соответствующие питательные среды, разлитые в чашки Петри или флаконы с жидкими питательными средами. Чашки с фильтрами переворачивают. Посевы на чашках и во флаконах инкубируют в стандартных условиях.

Подсчет колоний производят через 48-72 ч (предварительные результаты) и через 5 сут. (окончательные результаты). Отбирают чашки, где число колоний бактерий на фильтрах не превышает 100, а грибов — 50 и рассчитывают число микроорганизмов на 1,0 г или на 1,0 мл образца или на 1 пластырь. Если на фильтре большее количество микроорганизмов, то делают ряд последовательных разведений образца и выбирают подходящее.

Учет результатов на жидких питательных средах проводят в соответствии с разделом 6.

Для того чтобы определить, полностью ли отмыты мембранны от фильтруемого препарата, обладающего антимикробным действием, после фильтрации раствора в последнюю порцию промывной жидкости вносят по 1 мл взвеси тест-культур, соответствующих категорий испытуемого образца. Количество вносимого каждого в отдельности микроорганизма не должно превышать 100 КОЕ в 1 мл.

Рост тест-штаммов на фильтрах подтверждает отсутствие антимикробного действия лекарственного средства. В случае если антимикробное действие сохраняется, используют специфические или неспецифические инактиваторы или увеличивают объем промывной жидкости.

23.10.2 Жидкости для промывания фильтров

- Раствор натрия хлорида 0,9% стерильного pH 7,0
- Жидкость № 1: 1 г мясного пептона растворяют в 1000 мл воды, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают во флаконы и стерилизуют. pH после стерилизации $7,0\pm0,2$
- Жидкость № 2: 1 мл твина-80 добавляют к 1000 мл жидкости № 1, разливают во флаконы и стерилизуют. pH после стерилизации $6,9\pm0,2$. Жидкость № 2 применяют, если в составе препарата имеется масло.
- Жидкость № 3: 5 г мясного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80 растворяют в 1000 мл воды. Разливают во флаконы и стерилизуют. pH после стерилизации $6,9\pm0,2$.

23.11 Метод наиболее вероятных чисел (НВЧ)

Метод НВЧ используют при испытании ЛС с низким уровнем микробной контаминации, а также в тех случаях, когда нельзя применить другие методы. Метод НВЧ менее чувствителен и точен по сравнению с чашечным агаровым методом или методом мембранны фильтрации. Метод используют только для определения общего числа бактерий, так как результаты, полученные для определения общего числа грибов, особенно плесневых, считают недостоверными.

При выполнении испытания исследуемый образец готовят в виде раствора, суспензии или эмульсии в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000, используя подходящий растворитель. Жидкую питательную среду разливают в 12 стерильных пробирок по 9 мл в каждую. Пробирки ставят в штатив в 4 ряда по 3 пробирки.

В первый ряд пробирок вносят по 1 мл испытуемого образца в разведении 1:10, во второй ряд — по 1 мл в разведении 1:100, в третий ряд — по 1 мл в разведении 1:1000. В пробирки четвертого ряда вносят по 1 мл разбавителя, который используют для растворения, суспензирования или эмульгирования образца. Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение не более 3 сут.

После завершения испытания отмечают число пробирок в первом, втором и третьем рядах, в которых визуально наблюдают рост микроорганизмов. Среда в пробирках четвертого ряда (контроль разбавителя) должна оставаться стерильной. Полученное трехзначное число соответствует наиболее вероятному коли-

честву жизнеспособных микроорганизмов в 1,0 г или в 1,0 мл лекарственного средства (Таблица 51).

Наиболее вероятное число микроорганизмов (НВЧ)
Таблица 51.

Количество пробирок в каждом ряду, где наблюдают рост			НВЧмикроорганизмов в 1 г (мл) препарата
Количество препарата в пробирке в г (мл)	0.1	0.01	
0	0	0	>3
0	0	1	3
0	1	0	3
0	1	1	6.1
0	2	0	6.2
0	3	0	9.4
1	0	0	3.6
1	0	1	7.2
1	0	2	11
1	1	0	7.4
1	1	1	11
1	2	0	11
1	2	1	15
1	3	0	16
2	0	0	9.2
2	0	1	14
2	0	2	20
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	3	0	29
2	3	1	36
3	0	0	23
3	0	1	38
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>1100

Пример. В первом ряду рост микроорганизмов наблюдается в трех пробирках, во втором ряду — в двух пробирках, в третьем ряду — в одной пробирке. Полученное число «321» по таблице 5 соответствует цифре «150».

Следовательно, наиболее вероятное число бактерий в 1 г или 1 мл исследуемого образца — 150. Если учет результатов не может быть определен точно в свя-

зи с природой исследуемого препарата (помутнение среды, изменение ее цвета и т. п.), делают пересев на соответствующую жидкую или агаризованную среду, чтобы убедиться в наличии роста микроорганизмов.

23.12 Определение отдельных видов микроорганизмов, недопустимых и ограниченных количественно в лекарственных средствах

Испытание включает использование селективных и диагностических питательных сред, описанных в ГФ XII изд [43, 44].

23.12.1 Испытание на отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи

Для восстановления жизнеспособности возможных микроорганизмов-контаминаントов используют предварительную инкубацию образца лекарственного средства в жидкой питательной среде.

10,0 г или 10,0 мл исследуемого образца переносят в 100 мл соево-казеинового бульона (или среды № 8), перемешивают и инкубируют при температуре (22,5±2,5) °С в течение, как правило, двух часов, но не более пяти. После инкубации перемешивают содержимое флакона (гомогенат А) и переносят 10 мл (количество, соответствующее 1 г или 1 мл образца) в 100 мл среды обогащения (бульон Мосселя). Посевы инкубируют в течение 24-48 ч в стандартных условиях. При появлении роста делают пересев бактериологической петлей на агар Мосселя или среду № 4, которую инкубируют в течение 18-24 ч.

Если на агаре Мосселя выявлены типичные колонии бактерий, по тинкториальным свойствам представляющие собой грамотрицательные неспорообразующие палочки, обладающие ферментом цитохромоксидазы, считают, что образец контаминирован энтеробактериями, устойчивыми к желчи.

23.12.2 Количество определение энтеробактерий, устойчивых к желчи

Для посева используют три пробирки с 9 мл бульона Мосселя в каждой. Гомогенат А в количестве 1 мл (соответствует 0,1 г или 0,1 мл образца) вносят в первую пробирку, тщательно перемешивают и переносят 1 мл (соответствует 0,01 г или 0,01 мл образца) во вторую пробирку, снова перемешивают и переносят 1 мл (соответствует 0,001 г или 0,001 мл образца) в третью пробирку, меняя пипетку после каждого шага. Посевы инкубируют в течение 24-48 ч. Для подтверждения отсутствия энтеробактерий, устойчивых к желчи, делают пересев бактериологической петлей из каждой пробирки с видимым ростом на агар Мосселя (среда №4) и инкубируют чашки Петри в течение 18-24 ч. Прово-

дят микроскопическое исследование обнаруженных на плотной среде колоний. Выявление грамотрицательных неспорообразующих бактерий в виде палочек свидетельствует о присутствии в ЛС энтеробактерий, устойчивых к желчи. Наиболее вероятное количество устойчивых к желчи энтеробактерий в 1 г или 1 мл образца определяют по таблице 52.

Интерпретация результатов количественного определения энтеробактерий, устойчивых к желчи

Таблица 52

Соответствующее количество испытуемого образца			Наиболее вероятное количество бактерий в 1 г (мл) образца
0,1 г (мл)	0,01 г (мл)	0,001 г (мл)	
1 мл гомогената А	1 мл гомогената А в разведении 1:10	1 мл гомогената А в разведении 1:100	
+	+	+	Более 10^3
+	+	-	От 10^2 до 10^3
+	-	-	От 10^1 до 10^2
-	-	-	Менее 10^1

Обозначения: + — наличие роста; — отсутствие роста

23.12.3 Испытание на отсутствие бактерий *E. coli*

10 г исследуемого образца, растворенного или разбавленного стерильным фосфатно-буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл, соответствующего 1 г или 1 мл, в 100 мл соево-казеинового бульона (или среды №8). Перемешивают и инкубируют в течение 18-24 ч. При наличии роста 1 мл содержимого флакона переносят в 100 мл бульона Мак-Конки (или среды № 3) и инкубируют 24-48 ч при температуре (43 ± 1) °С.

При наличии роста делают пересев бактериологической петлей на агар Мак-Конки или среду №4. Посевы инкубируют в течение 18-72 ч (агар Мак-Конки) или 18-24 ч (среда № 4). Если после инкубации на плотных питательных средах выявлены колонии, типичные для *E. coli*, их исследуют методом микроскопии. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек отдельные типичные колонии пересевают на скошенный в пробирках соево-казеиновый агар или среду № 1 и инкубируют в течение 18-24 ч для получения чистой культуры микроорганизма.

Для идентификации выделенных бактерий используют биохимические тесты для определения наличия цитохромоксидазы, индола и способности утилизировать цитрат натрия. Из пробирок с чистой культурой делают пересевы на агар Симмонса (или среду №14) и соево-казеиновый бульон (или среду №15). Через 18-24 ч инкубации отмечают бактериальный рост или его отсутствие на агаре Симмонса (или среде №14). Утилизацию цитрата устанавливают по смещению рН

среды в щелочную сторону (изменению цвета среды из зеленого в синий). Наличие индола определяют по появлению красного кольца на поверхности соево-казеинового бульона (или среды № 15) при добавлении реактива Ковача.

Если в ходе исследования обнаружены типичные бактерии, по тинкториальным свойствам представляющие собой грамотрицательные палочки, обладающие ферментом цитохромоксидаза, не утилизирующие цитрат натрия и образующие индол, считают, что лекарственное средство контаминировано бактериями *E. coli*.

23.12.4 Количественное определение бактерий *E. coli*

Количественное определение *E. coli* проводят таким же образом, как количественное определение энтеробактерий, устойчивых к желчи, делая пересев из гомогената А в пробирки с бульоном Мак-Конки (или средой №3). При обнаружении роста в пробирках из каждой пробирки делают пересев бактериологической петлей на агар Мак-Конки или среду №4. Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение 18-48 ч (агар Мак-Конки) или 18-24 ч (среда №4).

Появление на средах типичных колоний бактерий, по тинкториальным свойствам представляющих собой грамотрицательные палочки, свидетельствует о присутствии в ЛС бактерий *E. coli*. Наиболее вероятное количество клеток *E. coli* в 1 г или в 1 мл образца определяют по таблице 47.

23.12.5 Испытание на отсутствие бактерий рода *Salmonella*

25,0 г или 25,0 мл исследуемого образца переносят в 225 мл соево-казеинового бульона (или среды №8), перемешивают и инкубируют в течение 18-24 ч. После перемешивания 0,1 мл переносят в 10 мл накопительного бульона для *Salmonella* — среду Раппопорта-Вассилиадиса и инкубируют в стандартных условиях в течение 18-24 ч. Делают пересев бактериологической петлей на одну из двух плотных диагностических сред: ксилоза-лизин-дезоксихолат агар или висмут-сульфит агар (среда №5), которые инкубируют в течение 48 ч.

При выявлении на указанных средах колоний, типичных для бактерий рода *Salmonella*, проводят микроскопическое исследование. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек характерные колонии пересевают на скошенный трехсахарный агар с солями железа (или среду №13), нанося большое количество культуры бактериологической петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик, не касаясь дна пробирки. Через 24 ч инкубации в стандартных условиях отмечают изменение цвета среды из красного в желтый в основании столбика пи-

тательной среды (ферментация глюкозы). В скошенной части агара цвет среды не изменяется (отсутствие ферментации сахарозы и лактозы). Почернение среды свидетельствует об образовании сероводорода — типичном признаке большинства видов рода *Salmonella*. Параллельно проводят определение наличия фермента цитохромоксидазы, а также другие биохимические и серологические тесты в случае необходимости дополнительного подтверждения.

Если в образце обнаружены бактерии, типичные по своим морфологическим и тинкториальным свойствам, обладающие ферментом цитохромоксидазы, не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считают, что лекарственное средство контаминировано бактериями рода *Salmonella*.

23.12.6 Испытание на отсутствие бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (соответствует 1 г или 1 мл) в 100 мл жидкой питательной среды (соево-казеинового бульона или среды №8). Перемешивают и инкубируют в стандартных условиях в течение 24-48 ч. После окончания инкубации при наличии роста производят пересев бактериологической петлей на селективную питательную среду для выделения синегнойной палочки (цетримидный агар или цетилпиридиний хлорид (ЦПХ) агар — среда №16). Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение 24-48 ч. Выделенные колонии микроорганизмов, которые по своим тинкториальным свойствам являются грамотрицательными палочками, пересевают на агар для выявления сине-зеленого пигмента пиоцианина (или среду №9). Посевы инкубируют в течение 24-48 ч.

Для подтверждения видовой принадлежности выделенных бактерий к *P. aeruginosa* определяют наличие фермента цитохромоксидазы и способность выделенных микроорганизмов расти на соево-казеиновом бульоне (или среде №8) при температуре (42±1) °C в течение 18-24 ч.

При испытании качества трансдермальных пластырей 10 пластырей помещают в 500 мл фосфатного буферного раствора и осторожно встряхивают в течение не менее 15 мин.

Полученную жидкость в количестве 50 мл пропускают через стерильный мембранный фильтр из нитрата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, который переносят в 100 мл соево-казеинового бульона (или среды №8). Посевы инкубируют в течение 24-48 ч. После инкубации при наличии роста производят пересев бактериологической петлей на селективные среды — цетримидный агар или ЦПХ-агар. Дальнейшую идентификацию проводят, как указано выше.

Если в образце обнаружены бактерии, типичные по своим морфологическим и тинкториальным свойствам (таблица 48), образующие сине-зеленый пигмент пиоцианин, обладающие ферментом цитохромоксидазы и растущие при температуре (42±1) °C, считают, что лекарственное средство контаминировано бактериями *P. aeruginosa*.

23.12.7 Испытание на отсутствие бактерий *Staphylococcus aureus*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (что соответствует 1 г или 1 мл образца) в 100 мл соево-казеинового бульона или среды №8. Перемешивают и инкубируют в течение 24-48 ч. При наличии роста пересевают петлей на маннитно-солевой агар (или среду №10) и инкубируют в стандартных условиях в течение 24-48 ч.

Появление после окончания инкубации типичных золотисто-желтых колоний, окруженных желтыми зонами, свидетельствуют о ферментации маннита *S. aureus*. Проводят микроскопическое исследование типичных колоний. При обнаружении в мазках грамположительных кокков, производят пересев на соево-казеиновый агар (или среду №1). Инкубируют в стандартных условиях в течение 18-24 ч. Для идентификации проводят тест на наличие коагулазы.

При испытании микробиологической чистоты трансдермальных пластырей 10 пластырей помещают в 500 мл фосфатного буферного раствора, осторожно встряхивая в течение не менее 15 мин.

Полученную жидкость в количестве 50 мл пропускают через стерильный мембранный фильтр из нитрата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, который переносят в 100 мл соево-казеинового бульона (или среды №8) и инкубируют в течение 24-48 ч. После инкубации при наличии роста пересевают петлей на маннитно-солевой агар (или среду №10) для выделения *S. aureus*. Посевы инкубируют в течение 48 ч.

Если в образце обнаружены типичные по морфологическим и тинкториальным свойствам бактерии, обладающие ферментом коагулазы, считают, что лекарственное средство контаминировано *S. aureus*.

23.12.8 Испытание на отсутствие грибов *Candida albicans*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором 1:10, переносят в количестве 10 мл (что соответствует 1 г или 1 мл образца) в 100 мл бульона Сабуро, перемешивают и инкубируют в течение 3-5 сут/ при температуре (32,5±2,5) °C. При наличии роста пересевают бактериологической петлей на агар Сабуро с глюкозой (или среду №2) и инкубируют в течение 24-48 ч при той же температуре.

Рост белых круглых, выпуклых, блестящих колоний, может указывать на наличие *Candida albicans*, что подтверждают в ходе дальнейшей идентификации, одним из этапов которой является микроскопическое исследование (окраску по Граму), выявляющее грамположительные дрожжеподобные почкующиеся овальные или круглые клетки размером 4-8 мкм. Для идентификации возможно использовать хромогенную среду, предназначенную для дифференциации *C. albicans* и других видов грибов рода *Candida*.

Если в образце не обнаружены типичные по морфологическим и тинкториальным свойствам дрожжеподобные грибы, идентифицированные как *C. albicans*, считают, что лекарственное средство не контаминировано указанным видом грибов.

23.13 Морфологические и тинкториальные свойства микроорганизмов

Характерные морфологические и тинкториальные свойства некоторых микроорганизмов-контаминантов ЛС представлены в таблице 53.

23.13.1 Повторение испытания

В случае необходимости при выявлении контаминации ЛС повторяют тот раздел испытания, результаты которого не соответствуют требованиям нормативной документации. Анализ проводят на удвоенном количестве образцов препарата.

Для идентификации выделенных контаминантов используют биохимические тесты и питательные среды, описанные в ГФ XII изд.

23.14 Воздбудители бактериальных заболеваний человека

Ниже приведено краткое описание основных представителей прокариот, вызывающих инфекционные заболевания. Порядок изложения соответствует порядку их описания в определителе бактерий Бердже.

Спирохеты — тонкие (0,3-1,5 мкм), гибкие, спирально извитые бактерии. Клетка состоит из протоплазматического цилиндра, переплетенного одной или более аксиальными фибрillами, отходящими от субтерминальных дисков. Клетка покрыта внешней эластичной оболочкой, содержащей тонкий слой муриеина. Подвижны вследствие гибкости их тела. Аэробы, факультативные анаэробы, анаэробы. Сапротрофы и паразиты, возбудители заболеваний: *Treponema pallidum* — сифилиса, *Leptospira interrogans* — лептоспироза, *Borrelia recurrentis* — возвратного тифа и др.

Аэробные (микроаэрофильные) подвижные спиралевидные бактерии. Грамотрицательные. Имеют полярно расположенные жгутики. Обитатели воды,

почвы, хищники по отношению к другим видам бактерий, некоторые патогенны. Виды родов *Campylobacter* и *Helicobacter* являются причиной язвы желудка и гастритов. *Spirillum minor* вызывает зоонозное заболевание — содоку.

Грамотрицательные аэробные (микроаэрофильные палочки и кокки).

Эта группа включает гетеротрофные микроорганизмы, разнообразные по морфологии и физиологии, в том числе патогенные виды, описанные ниже.

Bordetella pertussis — мелкие неподвижные коккобактерии 0,2-0,3×0,5-1,0 мкм. Образует экзотоксин. Возбудитель коклюша.

Bacillus subtilis — мелкие коккобактерии 0,5-0,7×0,6-1,5 мкм. Образуют эндотоксины со специфическими аллергенными свойствами, ферменты патогенности. Вызывают зоонозную инфекцию — бруцеллез.

Francisella tularensis — мелкие кокковидные, палочковидные и полиморфные клетки диаметром 0,2-0,7 мкм. Вызывает зоонозную инфекцию туляремию.

Legionella pneumophila — тонкая палочка 0,5-0,7×2-3 мкм полиморфная, подвижна, жгутики располагаются полярно и латерально. Образует экзо- и эндотоксины. Вызывает легионеллез.

Грамотрицательные кокки.

Neisseria gonorrhoeae (гонококк) — бобовидный диплококк 0,7-0,8×1,25 мкм, располагается парами внутри- и внеклеточно. Факультативный анаэроб. Образует эндотоксин. Вызывает гонорею, а также экстрагенитальные инфекции: эндокардиты, менингиты, артриты, стоматиты, конъюнктивиты, септицемии.

Neisseria meningitidis (менингононококк) — бобовидный диплококк 0,6-1,0 мкм в диаметре, имеет капсулу. Факультативный анаэроб. Образует экзо- и эндотоксины. Вызывает назофарингит, менингит, септицемию. Заболевают главным образом дети в возрасте 1-5 лет.

Под *Pseudomonas* включает более 70 видов, среди них имеются патогенные, возбудители оппортунистических инфекций, сапротрофы и фитопатогенные виды. Они могут загрязнять фармацевтические препараты, вырабатывать токсины. Благодаря своей высокой ферментативной активности и способности к адаптации они перспективны для систем обезвреживания промышленных отходов. Кроме того, они могут использоваться как продуценты аминокислот, антибиотиков, как реципиенты рекомбинантной ДНК в генетической инженерии.

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) — клетки 0,5-0,8×1,5×3 мкм, монотрих. Аэроб. Может расти при температуре 4-41°C. Образует пигмент сине-зеленого цвета. Вызывает местные и общие нагноительные процессы: отиты, пиелиты, циститы, кератиты, менингоэнцефалиты, инфициру-

Среды	Морфология колоний	Окраска по Граму
<i>Escherichia coli</i>		
Бульон Мак-Конки	Обесцвечивание среды, помутнение, газообразование	
Среда №3	Изменение окраски среды, газообразование	грамотрицательные
Агар Мак-Конки	Кирлично-красные колонии, могут быть окружены зонами выпавшей в осадок желчи	палочки
Среда №4	Малиновые или розовые колонии с металлическим блеском, окруженные малиновыми зонами	
Агар Мосселя	Красные колонии, окруженные красными зонами преципитации	
<i>Salmonella spp.</i>		
Бульон Раппопорта-Василиадиса	Помутнение при сохранении цвета среды или отсутствие видимого роста	грамотрицательные
Ксилоза-лизин-дезоксихолат агар	Красные колонии с черным центром или без него	палочки
Висмут-сульфит агар (или среда №5)	Черные колонии с антрацитовым блеском, среда под колониями окрашена в черный цвет.	
Агар Мосселя	Красные колонии, окруженные красными зонами преципитации	
<i>P. aeruginosa</i>		
Соево-казеиновый бульон (среда №8)	Помутнение, поверхностный рост в виде пленки	грамотрицательные палочки
Цетримидный агар	Зеленоватые колонии, зеленые в УФ свете	
Среда №16 (ЦПХ-агар)	Зеленоватые колонии, зеленые в УФ свете	
Агар для выявления пиоцианина, среда №9	Сине-зеленые колонии, синие в УФ свете	
<i>S. aureus</i>		
Соево-казеиновый бульон (среда № 8)	Равномерное помутнение	грамположительные
Маннитно-солевой агар (или среда №10)	Золотисто-желтые колонии, окруженные желтыми зонами	ковки в виде гроздей
<i>S. epidermidis</i>		
Маннитно-солевой агар (или среда №10)	Белые колонии, отсутствие зон вокруг колоний	грамположительные
<i>C. albicans</i>		
Бульон Сабуро Сабуро агар (среда №2)	Придонный рост Белые, круглые, выпуклые, блестящие колонии	дрожжеподобные почкающиеся овальные или круглые клетки размером 4-8 мкм

ет поверхности ран и ожогов. Устойчива к действию антисептиков.

Pseudomonas mallei — клетки 0,5 — 1,5 — 4,0 мкм, неподвижные. Факультативный анаэроб. Возбудитель сапа, которым болеют лошади, ослы и мулы. Человек заражается при контакте с больными животными.

Pseudomonas pseudomallei — клетки 0,8×1,5 мкм, лофтотрих. Факультативный анаэроб. Возбудитель зоонозной инфекции — мелиоидоза.

Факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки

Семейство *Enterobacteriaceae* включает более 115 видов, принадлежащих к 30 родам. Это прямые палочки 0,3-1,8 мкм. Подвижные (перитрихи) или неподвижные. Присутствуют повсеместно: в почве, воде, на растениях, у животных. Некоторые из них патогены и вызывают заболевания желудочно-кишечных,

дыхательных и мочевыводящих путей, менингиты и раневые инфекции. Около 50% внутрибольничных инфекций вызываются видами этого семейства. Наиболее часто встречаются *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* и виды родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*.

Род *Escherichia* включает представителей нормальной микробиоты теплокровных. *E. coli* — обитатель толстого кишечника человека, подразделяется на несколько групп, различающихся по своим биологическим свойствам. Патогенные штаммы продуцируют энтеротоксины, факторы инвазии и колонизации, обеспечивающие их проникновение и размножение в органах. Вызывают острые кишечные заболевания и другие эшерихиозы (перитонит, менингит, энтерит, цистит, пиелит, пиелонефрит, отиты, токсикоинфекции и др.). Непатогенные штаммы применяются для приготовления колибактерина для лечения и профилактики

дисбактериоза, как продуценты некоторых ферментов, широко используются в генетической инженерии. *Escherichia coli* — санитарно-показательный микроорганизм для оценки состояния воды и почвы.

Род *Salmonella* включает виды (около 2000 сероваров), патогенные для человека и многих животных. У человека вызывают брюшной тиф, паратиф, сальмонеллезы, токсикоинфекции. Образуют эндотоксины с выраженным токсическими свойствами.

Род *Shigella*. Бактерии этого рода от других энтеробактерий отличаются отсутствием жгутиков. *S. dysenteriae* продуцирует экзотоксин, обладающий выраженным тропизмом к нервной системе и слизистой оболочке кишечника. Другие виды шигелл образуют эндотоксины. Вызывают дизентерию.

Род *Yersinia* включает патогенные для человека виды. Возбудитель чумы *Y. pestis* чрезвычайно вирулентен для человека, продуцирует экзотоксины. *Y. pseudotuberculosis* вызывает псевдотуберкулез, *Y. enterocolitica* — иерсиниоз. Эти микроорганизмы способны длительно сохраняться в условиях внешней среды. *Y. enterocolitica* размножается при -4°C , на пищевых продуктах в холодильнике.

Род *Klebsiella*. Представители этого рода отличаются способностью образовывать капсулу.

K. pneumoniae образует экзотоксин. Является возбудителем бронхолегочных заболеваний, иногда — менингита; у детей может вызывать септициемию, циститы и другие заболевания.

K. ozaenae — возбудитель хронического заболевания респираторного тракта.

K. rhinoscleromatis вызывает хронический грануломатозный или атрофический процессы в слизистой оболочке верхних дыхательных путей.

Род *Proteus*. Виды этого рода обитают в кишечнике человека, обнаруживаются в воде, почве, пищевых продуктах. Вызывает пищевые токсикоинфекции, диспепсии у детей, нагноительные процессы (отит, цистит, конъюнктивит), раневые инфекции.

Семейство *Vibrionaceae* — прямые или изогнутые палочки $0,3\text{--}1,3 \times 1,4\text{--}5,0$ мкм с полярными жгутиками (имеются и неподвижные виды).

Род *Vibrio* включает около 10 видов, патогенных для человека. Вызывают раневые, кишечные и внекишечные инфекции. *V. cholerae* — возбудитель холеры, *V. parahaemolyticus* — пищевых отравлений, *V. vulnificus* — септициемии с высокой летальностью. *V. cholerae* продуцирует экзотоксин (холероген) и ферменты патогенности, все патогенные вибрионы содержат эндотоксины.

Семейство *Pasteurellaceae* — палочки от кокковидных до прямых $0,2\text{--}0,4 \times 0,4\text{--}2,0$ мкм. Паразиты позвоночных. *Haemophilus influenzae* вызывает менингит у детей, септициемии, бронхиты, отиты. *H. ducreyi* — возбудитель мягкого шанкра.

Риккетсии и хламидии

Риккетсии — полиморфные кокковидные диаметром около 0,5 мкм, палочковидные $1\text{--}1,5 \times 3\text{--}4$ мкм или нитевидные клетки, грамотрицательны, размножаются простым делением. Облигатные паразиты. Возбудители риккетсиозов: сыпного тифа, крысиного риккетсиоза, марсельской лихорадки, Ку-лихорадки и др.

Хламидии — внутриклеточные паразиты диаметром 0,3-0,45 мкм. Цикл размножения включает образование крупной (0,8-1,5 мкм) клетки, размножающейся делением. Дочерние клетки реорганизуются в мелкие (0,2-0,4 мкм) элементарные тела, обладающие инфекционными свойствами. Хламидии у человека вызывают трахому, конъюнктивиты, паховый лимфогрануломатоз, орнитоз.

Грамположительные кокки

Группа включает сапротрофные микроорганизмы, в том числе продуцент дегтрана — *Leuconostoc* spp., а также условно-патогенные и патогенные кокки, описанные ниже.

Staphylococcus aureus — клетки шаровидной формы диаметром обычно 0,8-1 мкм, располагаются в виде неправильных скоплений. Факультативный анаэроб. Образует золотистый, лимонно-желтый и белый пигменты. Синтезирует свыше 25 белков, токсии и ферменты патогенности. Вызывает воспалительные процессы различной локализации и степени тяжести: абсцессы, фурункулез, остеомиелиты, дерматиты, пиодермии, перитониты, энтероколиты, конъюнктивиты; при употреблении зараженных пищевых продуктов — токсикоинфекции.

Streptococcus pyogenes — клетки шаровидной формы диаметром 0,6-1 мкм, расположенные парами и цепочками, образует микрокапсулу. Факультативный анаэроб. Синтезирует токсины (гемолизины, лейкоцидии, нефротоксин и др.) и ферменты патогенности. Вызывает нагноительные (пневмония, рожистое воспаление, импетиго, ангина, сепсис) и не нагноительные болезни (скарлатина, ревматизм и др.).

Грамположительные палочки, образующие эндоспоры

Это обширная группа микроорганизмов, включающая сапротрофные и патогенные виды. Среди них имеются продуценты ферментов и антибиотиков (*Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*) и других БАВ. Патогенные виды описаны ниже.

Bacillus anthracis — палочки $1,0\text{--}1,2 \times 3\text{--}5$ мкм, располагаются цепочками, концы палочек выглядят обрублеными или слегка вогнутыми. Споры овальные, располагаются центрально. Образуют капсулу. Неподвижны. Факультативный анаэроб. Продуцирует экзотоксин. Возбудитель зоонозной инфекции сибирской язвы.

Clostridium tetani — палочки $0,5\text{--}1,1 \times 2,4\text{--}5$ мкм. Споры шаровидные, располагающиеся на конце, придающие микробу вид барабанной палоч-

ки. Перитрих. Строгий анаэроб. Образует чрезвычайно сильный экзотоксин. Возбудитель столбняка.

Clostridium perfringens — полиморфные палочки с закругленными концами $0,9-1,3 \times 3-9$ мкм. Споры овальной формы, располагаются субтерминально, их диаметр превышает диаметр самой клоストридии. Образует капсулу. Неподвижен. Анаэроб. Образует группу токсинов и ферментов патогенности. Возбудитель анаэробной инфекции.

Clostridium novyi — полиморфные палочки с закругленными концами $1,4-2,5 \times 4,7-22,5$ мкм, располагаются короткими цепочками. Споры овальные, расположены субтерминально. Перитрих. Строгий анаэроб. Образует группу токсинов. Возбудитель анаэробной инфекции.

Clostridium septicum — полиморфные палочки $1,1-1,6 \times 3,1-14,1$ мкм. Споры округлые, расположены центрально или субтерминально. Перитрих. Строгий анаэроб. Образует группу токсинов и ферментов патогенности. Возбудитель анаэробной инфекции.

Clostridium botulinum — полиморфная палочка с закругленными концами $0,3-1,3 \times 4,4-8,6$ мкм. Споры овальные, расположены субтерминально, придают клетке вид теннисной ракетки. Перитрих. Строгий анаэроб. Продуцирует экзотоксин (нейротоксин) очень большой силы действия. Токсинообразование может происходить в пищевых продуктах (колбаса, мясо, рыбные, овощные, грибные и др. консервы). Ботулинический токсин термостабилен и не разрушается под действием желудочного сока. Вызывает ботулизм.

Грамположительные неспорообразующие палочки неправильной формы

К этой группе принадлежат микроорганизмы, имеющие значение в биотехнологии как продуценты БАВ (роды *Acetobacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*), важнейший представитель нормальной микробиоты человека *Bifidobacterium bifidum*, а также патогенные виды.

Corynebacterium diphtheriae — полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки $0,3-0,8 \times 1-8$ мкм с булавовидными утолщениями по концам. Факультативный анаэроб. Продуцирует сильные экзотоксины. Вызывает дифтерию.

Actinomyces bovis — полиморфные палочковидные или кокковидные клетки, иногда могут образовываться ветвящиеся нити диаметром $0,5-1,2$ мкм. Факультативный анаэроб. Вызывает актиномикоз.

Actinomyces israelii имеет строение, аналогичное *A. bovis*, отличается от него по антигенной структуре. Вызывает актиномикоз.

Микобактерии. К этой группе принадлежат грамположительные микроорганизмы, способные к образованию ветвящихся форм, кислотоустойчивые, сапротрофы, обитающие в почве и обнаруживаемые в организме человека, а также патогенные виды.

Mycobacterium tuberculosis — полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки $0,3-0,6 \times 1-4$ мкм, иногда имеют небольшие вздутия на концах. Аэроб. Образует эндотоксин. Возбудитель туберкулеза.

Mycobacterium leprae — морфология клеток аналогична *M. tuberculosis*. Внутриклеточный паразит. В клетках располагаются группами в виде пачек сигар. Образует эндотоксин. Возбудитель лепры.

Микоплазмы или молликуты: бактерии без клеточной стенки. Отсутствие муреина и ригидной клеточной стенки определяет выраженный полиморфизм клеток, которые могут иметь сферическую, нитевидную, ветвистую и фильтрующуюся формы. Анаэробы и факультативные анаэробы. Требуют специальных сред для своего культивирования. Чувствительны к действию биоцидов. Сапротрофы (обнаружены в почве, сточных водах) и паразиты растений, животных и человека. Патогенные виды (*Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis*) поражают органы дыхания, сердечно-сосудистую, мочеполовую и центральную нервную системы.

Заключение

Микробная контаминация лекарственных средств (ЛС) может приводить к потере терапевтической активности за счет ферментативной деградации активных компонентов. Микроорганизмы, загрязняющие ЛС, могут вызывать заболевания инфекционной и неинфекционной (отравления микробными токсинами и продуктами деградации ЛС) природы. Микробиологическая чистота ЛС регламентируется XII Фармакопеей.

Глава 24. БОРЬБА С МИКРОБАМИ-КОНТАМИНАНТАМИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

24.1 Действие физических и химических факторов на микроорганизмы

Микроорганизмы обладают значительно большей толерантностью к физическим и химическим факторам окружающей среды, чем растения и животные. Некоторые из бактерий способны размножаться при температуре от -12°C до $+104^{\circ}\text{C}$, в диапазоне значений pH от 1 до 13, гидростатическом давлении от 0 до 1400 атм, не погибают при интенсивном облучении, живут в дистиллированной воде и в насыщенных растворах солей. Вместе с этим каждый вид микроорганизмов имеет свои наследственно закрепленные зоны влияния конкретных воздействий: оптимальные, подавления роста, гибели.

24.1.1 Физические факторы, благоприятные для роста микроорганизмов

Температура. Различают 3 группы микроорганизмов, которые различаются по диапазону температур, наиболее приемлемым для их роста и размножения: *психрофилы* (холодолюбивые) имеют зону оптимального роста $10\text{--}15^{\circ}\text{C}$, это свободноживущие микроорганизмы или паразиты холоднокровных животных. Среди психрофилов есть и патогенные для человека, например, *Yersinia enterocolytica*. Этот микроорганизм способен быстро размножаться на пищевых продуктах в условиях бытового холодильника, причем низкие температуры (менее 10°C) способствуют отбору вирулентных штаммов. Аналогичными свойствами обладают психрофильные варианты клебсиелл и псевдомонад.

Мезофилы обитают, главным образом, в организме человека и теплокровных животных. Оптимальная температура их роста составляет $30\text{--}37^{\circ}\text{C}$, максимальная $43\text{--}45^{\circ}\text{C}$, а минимальная $15\text{--}20^{\circ}\text{C}$. В окружающей среде они обычно не размножаются. Для *термофилов* (теплолюбивых микроорганизмов) зона оптимального роста $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$, верхняя зона задержки роста 75°C , а нижняя 45°C . Термофилы не способны размножаться в живом организме и поэтому не имеют медицинского значения, однако некоторые виды термофилов считают

перспективными для биотехнологии как продуценты БАВ. Термофилы обитают в горячих источниках, участвуют в процессах самонагревания навоза, сена, зерна. Наличие большого количества термофилов в почве свидетельствует о ее загрязненности навозом и компостом. Экстремальные термофилы обитают в горячих источниках при температуре до 104°C .

Реакция среды. Для большинства бактерий оптимальными для роста и размножения являются среды с нейтральным значением pH (pH 6,8-7,0), для грибов слабо кислые с pH 5,0-6,0. В процессе размножения происходит сдвиг pH обычно в сторону кислых значений, рост замедляется и затем может наступить гибель клеток. Механизм повреждающего действия pH состоит в денатурации ферментов гидроксильными ионами и нарушении осмотического барьера клеточных мембран.

Влажность. Среды с большим количеством воды являются благоприятными для активного размножения микроорганизмов. Снижение влажности среды способствует переходу клетки в стадию покоя, а затем и к гибели. Устойчивы к высушиванию капсульные формы микроорганизмов, споры и цисты. Высушивание под вакуумом из замороженного состояния — лиофилизацию — используют для продления жизнеспособности и консервирования микроорганизмов. Лиофилизированные культуры и иммунобиологические препараты длительно сохраняются, не изменяя своих свойств.

24.1.2 Чувствительность микроорганизмов к повреждающим факторам

В результате действия повреждающих факторов наступает гибель микроорганизмов. Микробная клетка считается погибшей, если она потеряла способность к воспроизведению. Различают бактерицидное, фунгицидное и вирицидное действие, вызывающее гибель соответствующих объектов. Для оценки эффективности летального действия того или иного фактора используют показатель D_{10} — время выдержки при заданной температуре или доза радиации, при которой происходит снижение концентрации клеток в 10 раз, т. е. гибель 90% клеток в популяции.

24.1.3 Воздействие на микроорганизмы высоких температур

Повышенная температура вызывает денатурацию и разрушение жизненно важных молекул клетки; при стерилизации паром под давлением протекают реакции гидролиза, сухим жаром — окислительные реакции.

По показателю устойчивости (резистентности) различают следующие группы микроорганизмов:

- 1) чувствительные — неспорообразующие бактерии, плесневые грибы, вирусы;
- 2) слаборезистентные — вирусы гепатитов, споры *Clostridium perfringens*;
- 3) высокорезистентные — *C. tetani*;
- 4) чрезвычайно резистентные — споры *Bacillus subtilis*, *C. botulinum*;
- 5) наиболее резистентные — споры *B. stearothermophilus*, почвенных термофилов, прионы.

Термоустойчивость одних и тех же микроорганизмов может изменяться в зависимости от наличия влаги и свойств среды, в которой они находятся. Чувствительность микроорганизмов одного вида к высокой температуре зависит от нескольких причин:

- 1) от штаммовых различий, например, время гибели спор *C. tetani* при обработке паром при 100°C составляет 5-90 мин;
- 2) от фазового состояния клеток, связанного с активностью их метаболических процессов;
- 3) от агрегатного состояния клеток, а именно наличия скопления (конгломератов), более устойчивых, чем отдельные клетки;
- 4) от вида термической обработки: при одинаковой температуре сухой нагрев менее эффективен, чем влажный; отмирание микроорганизмов во влажной среде наступает вследствие денатурации нуклеиновых кислот, белков, повреждения мембран; при воздействии сухого жара происходит активация окислительных процессов (пиролиз);
- 5) от состава среды термообработки, так как многие органические и неорганические вещества обладают защитным действием на клетку, например, NaCl, соли магния, жиры, поверхностно-активные вещества и др;
- 6) от значения pH среды, например, при 100°C некоторые споровые микроорганизмы при pH 6-7 погибают за 2,5 час, а при pH 3-3,5 — за 30 мин.

24.1.4 Влияние на микроорганизмы лучистой энергии

Антимикробным действием обладает ионизирующее и неионизирующее излучение. К неионизирующему относят инфракрасное (ИК) и ультрафиолетовое (УФ) облучения. ИК-лучи обладают сравнительно большой длиной волны и поэтому их энергия невелика. Они оказывают, в основном, тепловое воздействие.

УФ-лучи обладают более высокой энергией, они способны вызывать фотохимические изменения и в молекулах субстрата и в клетках микроорганизмов. Наиболее эффективны лучи с длиной волны 250-260 нм. Различные виды и формы микроорганизмов не одинаково чувствительны к одной и той же дозе облучения. Повышенной устойчивостью отличаются пигментные микроорганизмы и споровые формы бактерий и грибов. Эффективность воздействия УФ-излучения зависит от дозы облучения, т. е. от количества энергии, поглощенной клеткой, от характера облучаемого объекта и условий воздействия (рН среды, влажности субстрата, температуры, наличия защищающих клетки веществ).

Механизм губительного действия УФ-облучения связан с образованием димеров тиминовых и других пиримидиновых оснований ДНК, что сопровождается прекращением репликации и последующей гибелью клетки. Следует помнить о явлении фотореактивации под действием дневного света, активирующего ферменты, которые катализируют расщепление димеров, что приводит к восстановлению жизнедеятельности клетки. Кроме прямого воздействия УФ-излучения возможно и опосредованное в результате образования озона, перекиси водорода и других бактерицидных веществ в обрабатываемом субстрате.

К ионизирующему относят γ -излучение и ускоренные электроны. Источником γ -излучения являются радиоактивные элементы Co^{60} , Cs^{137} . Радиоустойчивость разных микробных видов существенно различается. Обычно клетки грамотрицательных микроорганизмов более чувствительны по сравнению с грамположительными, наименее устойчивы вегетативные клетки, более резистентны грибы и дрожжи, далее — бактериальные споры, вирусы. Известен микроорганизм *Micrococcus radiodurans* (радиоустойчивый), приспособившийся к жизни в реакторах атомных электростанций. Радиопоражаемость клеток одного вида зависит от возраста клеток (молодые клетки более чувствительны, чем сформировавшиеся), от состава среды и поглощенной дозы облучения.

Поглощенной дозой излучения называют количество энергии, поглощенное единицей массы среды, через которую проходит излучение. Единицей измерения дозы излучения является рад (radiation absorbed dose — абсорбированная доза радиации), 1 рад эквивалентен величине 100 эрг/г, 1 Мрад = 10^6 рад = 10 Кгр (килограмм-радиация).

Для радиочувствительных микроорганизмов $D_{10} < 1$ кГр, для радиорезистентных D_{10} составляет 2,3 кГр. Стерилизующей дозой является 25-35 кГр. Гибель клеток обусловлена протеканием многочисленных химических реакций, в которых участвуют продукты радиолиза воды, образовавшиеся в клетке и в субстрате — это высокоактивные свободные радикалы атомарного кислорода, перекиси.

24.1.5 Воздействие на микроорганизмы химических веществ с неспецифической антимикробной активностью

Эффективность действия химического вещества на микроорганизм зависит от его вида и штамма. Некоторые химические вещества обладают широким спектром антимикробного действия. Примером высокоеффективного вещества является этилена оксид, одинаково действующий на споровые и вегетативные формы. Штаммовые отличия в чувствительности микроорганизмов к химическим воздействиям могут быть генотипическими и фенотипическими. Изменения в генотипе часто обусловлены плазмидами и транспозонами, обеспечивающими чувствительность (резистентность) к химическим воздействиям. Фенотипические различия связаны с составом среды, pH, температурой, концентрацией клеток в объекте. Факторами, определяющими эффективность действия химического вещества на клетки, являются концентрация вещества, состав среды, время контакта с микроорганизмом, температура.

24.2 Асептика. Антисептика. Стерилизация.

Асептика — это комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микробов на (в) какой-либо объект: операционное поле, микробиологический бокс, определенные производственные помещения, стерильный раствор или препарат (растворы для инъекций, глазные капли). Работа микробиологов, хирургов и работников, связанных с изготовлением и использованием лекарственных препаратов, проводится с применением методов асептики. Создание асептических условий предусматривает дезинфекцию помещений, стерилизацию аппаратов, инструментов и материалов.

Антисептика обозначает использование химических веществ (антисептиков), убивающих или подавляющих микробов, находящихся в контакте с макроорганизмом.

Стерилизацией называют процесс полного уничтожения или удаления из объекта всех жизнеспособных форм микроорганизмов. При стерилизации фармацевтической продукции требуется обеспечить высокий уровень гарантированной стерилизуемости объектов. Наиболее часто применяемым стандартом является гарантия того, что после стерилизации партии препарата, из 10^6 единиц, количество нестерильных единиц будет равно или менее 1, то есть вероятность нестерильности объекта составляет 10^{-6} при сохранении биологических свойств препарата.

При выборе промышленного метода стерилизации руководствуются определенными критериями.

1) Учитывают устойчивость объекта к стерилизующему воздействию (термическую, радиационную, светоустойчивость). После стерилизации не допускается снижение биологической активности препарата более, чем на 1-2% по сравнению с исходным уровнем.

2) Учитывают эффективность воздействия на различные микроорганизмы или эффективность их удаления из объекта стерилизации.

3) Выбранный метод должен иметь максимальную гарантию безопасности для работающих и жителей прилегающих к предприятию районов (это особенно важно при использовании установок радиационной стерилизации).

4) Для проведения стерилизации необходимо иметь соответствующие технологические установки (автоклавы, сухожаровые, газовые стерилизаторы и др.).

5) Выбранный метод должен быть экономически выгодным.

В промышленности используют две группы методов стерилизации, основанные на уничтожении или удалении микроорганизмов. Для уничтожения присутствующих в объекте микроорганизмов применяют термическую, химическую и лучевую стерилизацию. Удаляют микроорганизмы из объекта путем мембранный фильтрации.

24.2.1 Термическая стерилизация

Объектами являются оборудование, коммуникации, арматура, питательные среды, добавки, готовые лекарственные формы (инъекционные и инфузионные растворы термоустойчивых веществ), материалы первичной упаковки для стерильной продукции, установки для стерилизующего фильтрования, технологическая одежда.

Теплоносителями могут быть: водяной пар под давлением, текущий пар, сухой горячий воздух. Острый пар подается непосредственно в объект (аппарат), глухой пар — в рубашку стерилизатора. Стерилизацию термостабильных растворов проводят в стерильных укупоренных флаконах или ампулах в автоклавах при избыточном давлении 0,11 МПА, что соответствует температуре 121°C в течение 8-15 мин в зависимости от объема препарата. Эффективность автоклавирования составляет 10^{-6} . Установки для стерилизующего фильтрования стерилизуют в течение 45 мин при температуре 121°C, а технологическую одежду при такой же температуре в течение 40-60 мин.

Некоторые термоустойчивые инъекционные препараты стерилизуют текущим паром при 100°C в течение 30 мин. Материалы первичной упаковки для стерильных препаратов (ампулы, флаконы) можно стерилизовать сухим горячим воздухом при 180°C 2 часа. Эффективность такого метода стерилизации составляет 10^{-12} . Длительное время стерилизации плохо ска-

зывается на показателях качества стекла, поэтому для материалов первичной упаковки используют другие режимы обработки: 300°C — 20 мин или 350°C — 2 мин. Стерилизацию ведут в потоке стерильного воздуха, очищенного от механических частиц, при этом одновременно со стерилизацией проходит и депирогенизация обрабатываемых объектов.

24.2.2 Стерилизация газами и химическими растворами

Объектами стерилизации являются термолабильные медицинские изделия из резины и полимерных материалов, лечебные пленки, линзы, резиновые соски, тюбики для глазных капель. Основным действующим веществом является *этилена оксид*. Это соединение используют в смеси со взрывобезопасными газами — двуокисью углерода, или бромистым метилом, для улучшения движения газа внутри объекта. Эффективность стерилизации составляет 10^{-2} , обработку осуществляют в герметично закрывающихся аппаратах типа автоклава, к которым присоединен баллон с газом.

Анти микробная активность зависит от концентрации биоцида, времени обработки, температуры и влажности среды обработки. Оптимальными условиями являются: концентрация газа 50-100 мг/л, время 1-6 ч, температура 50-60°C, влажность — 30-60%.

Сдерживает широкое применение этого метода высокая токсичность этилена оксида для персонала и его способность взаимодействовать с компонентами объекта. После стерилизации для удаления этилена оксида проводят активную или пассивную десорбцию. При активной десорбции стерильную продукцию пропускают стерильным воздухом, при пассивной — выдерживают в течение 20 сут.

Для стерилизации (дезинфекции) аппаратов для дialisа рекомендован *формальдегид*. Он менее опасен, чем этилена оксид, не горюч, его утечку можно контролировать по запаху; транспортировка формальдегида в виде водного раствора относительно безопасна (не требует баллонов).

24.2.3 Радиационная и УФ стерилизация

Объектами радиационной стерилизации являются изделия из полимерных материалов: контейнеры для инфузионных растворов, системы для взятия и переливания крови, одноразовые шприцы, чашки Петри из полимерных материалов, баклажанки.

Эффективность радиационной стерилизации 10^{-3} . Обработку проводят в специальных камерах проходного типа, стерилизуют в потоке γ -излучения 2 раза по 5 мин. Стерилизующаяся доза 25—30 кГр. Сдерживает широкое применение этого метода наличие прямого и косвенного повреждающего действия радиации на объект.

В промышленности УФ-стерилизацию используют очень ограниченно. Например, в производстве некоторых вакцинальных препаратов, или для стерилизации полимерных планшетов с сухими биохимическими реактивами для экспресс-идентификации микроорганизмов. УФ-облучение в процессах фармацевтического производства используют для снижения содержания микроорганизмов в воздухе производственных помещений в сочетании с обработкой химическими веществами.

24.2.4 Стерилизующая фильтрация жидкостей

Объектами являются термолабильные растворимые компоненты питательных сред и добавки (40% раствор глюкозы, растворы аммиака, фенилуксусной кислоты), термолабильные растворимые лекарственные субстанции (полупродукты), термолабильные парентеральные лекарственные препараты, иммунобиологические препараты, органические растворители, растворы дезинфицирующих веществ. Эффективность стерилизации 10^{-3} .

Обязательным является проведение предварительной фильтрации через мембранные с порами 5 мкм и 0,5 мкм, а затем раствор подают на стерилизующую фильтрацию через мембрану с порами 0,22 мкм. Для предфильтрации можно использовать фильтры из пористых или керамических материалов. Однако их существенными недостатками являются опасность попадания частиц фильтрующего материала в фильтрат, а также адсорбция некоторых веществ (белков) материалом фильтра. Для стерилизующего фильтрования используют микрофильтрационные мембранные, удаляющие частицы размером 0,1-10 мкм. Однако для удаления вирусов из термолабильных жидкостей используют ультрафильтрационные мембранные, задерживающие частицы размером 0,001-0,1 мкм. Мембранные изготавливают из различных полимерных материалов: эфиров целлюлозы, полиамида, лавсановой пленки. Для удобства использования выпускают в виде патронов или дисков.

Для достижения эффективной стерилизации необходимо предварительно проверить размер пор мембранные, герметичность установки и правильно выбрать режим фильтрования (продолжительность работы, давление (вакуум).

Размер пор мембранные оценивают микробиологическим методом с использованием клеток *Brevundimonas diminuta*, диаметр которых составляет 0,3 мкм (для фильтров с диаметром пор 0,22 мкм). Для фильтров с диаметром пор 0,45 мкм тест-организмом служит *Serratia marcescens*, размер клеток которого не превышает 0,5 мкм. Концентрация взвеси составляет 10^7 клеток в 100 мл.

Герметичность установки проверяют пузырьковым тестом. *Точка пузырька* — это минималь-

ное давление воздуха или газа, необходимое для вытеснения жидкости с поверхности фильтра. Для предотвращения неконтролируемого размножения микроорганизмов на фильтре и возникновения пирогенности инъекционного раствора, следует максимально сократить время от начала фильтрации до получения стерильного раствора. В соответствии с требованиями GMP это время не должно превышать 8 ч.

Исходная контаминация растворов, подаваемых на стерилизующую фильтрацию, должна быть минимальной, не более 100 клеток в 1 мл раствора. С увеличением концентрации будет возрастать возможность попадания в фильтрат микроорганизмов мелких размеров, имеющих извитую форму или лишенных жесткой клеточной стенки.

24.3 Контроль эффективности работы стерилизующих устройств

Для контроля соблюдения выбранного режима стерилизации используют несколько групп методов. **Технические методы** контроля предусматривают периодическую проверку показаний манометров, термометров, термопар, дозиметрических устройств. Такой контроль проводят поверочные службы на предприятии.

Химические методы контроля основаны на использовании различных веществ, изменяющих свой цвет или физическое состояние при стерилизации, в частности, имеющих соответствующую температуру плавления. Запаянные ампулы с порошком, предварительно смешанным с красителем, помещают в стерилизационную камеру. При достижении в камере определенной температуры порошок плавится, образуя равномерно окрашенный расплав (табл. 54).

Температура плавления химических веществ-индикаторов.

Таблица 54.

Название вещества	Температура плавления, °С
Бензонафтол	110
Антиpirин	115
Резорцин	118
Бензойная кислота	121

Некоторые химические индикаторы изменяют цвет под воздействием этилена оксида или определенной дозы ионизирующего излучения. Имеются индикаторы, реагирующие на температуру и время стерилизации, индикаторы, регистрирующие полноту удаления воздуха из автоклава и др.

Наиболее полную информацию о соблюдении режима стерилизации дают **методы биологического контроля**. Показателем служит гибель тест-микроорганизмов, используемых в качестве контроля,

при этом тест-культура должна быть устойчивой к стерилизующему воздействию (табл. 55).

Биоиндикатор для контроля работы автоклава представляет собой суспензию спор *Bacillus stearothermophilus* 10⁶/мл в жидкой питательной среде мясо-пептонный бульон с добавлением индикатора бромкрезолового пурпурного. Ампулу помещают в автоклав вместе со стерилизуемым объектом. После стерилизации биоиндикатор помещают в термостат при 55°C. При неэффективной стерилизации оставшиеся жизнеспособными споры прорастают, дают изменение цвета индикатора pH среды, а в результате размножения клеток среда становится мутной. Недостаток использования биоиндикаторов по сравнению с химическими состоит в ретроспективности ответа. Для его преодоления создана система, предусматривающая определение фермента а-глюкозидазы, свидетельствующего о жизнеспособности спор и определяемого с помощью реакции превращения нефлуоресцирующего субстрата во флуоресцирующий продукт за 1 час. Эта система рекомендована для контроля стерилизации паром под давлением.

Общие требования к организации контроля работы стерилизующих устройств:

- 1) контроль должен быть постоянным в связи с возможными дефектами в работе стерилизующих устройств;
- 2) средства контроля должны устанавливаться в наименее благоприятных для стерилизующего действия местах;
- 3) при использовании биоиндикаторов необходимо строго соблюдать меры предосторожности, чтобы исключить попадание индикаторных микроорганизмов в сферу производства.

24.4 Стерилизация в аптеках

В соответствии с приказом МЗ РФ № 309 от 21.10.97 «Об утверждении инструкции по санитарному режиму аптечных организаций (аптек)» утверждены следующие режимы и методы стерилизации отдельных объектов:

- паровой метод (табл. 56);
- воздушный метод (табл. 57);
- химический метод (табл. 58).

24.5 Промышленная дезинфекция

Дезинфекцией называют комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов на объектах внешней среды с помощью механических, физических и химических средств и воздействий. В медицине под дезинфекцией понимают процесс уничтожения преимущественно патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды с целью прервать передачу инфекци-

Биологические индикаторы, рекомендуемые ЕР 2002 для мониторинга процессов стерилизации

Таблица 55.

Метод стерилизации	Вид микроорганизма	Инокулюм	D
Пар под давлением, 121°C	Bacillus stearothermophilus	$>5,5 \times 10^3$	>1,5 мин
Сухой жар, 160°C	Bacillus subtilis var. niger	$>1 \times 10^5$	5-10 мин
Водорода пероксид и надуксусная кислота	Bacillus stearothermophilus	$>5 \times 10^5$	—
Этилена оксид* (EtOx)	Bacillus subtilis var. niger	$>5 \times 10^5$	>2,5 мин
Формальдегид	Bacillus subtilis var. niger	$>5 \times 10^5$	—
Ионизирующее излучение	Bacillus pumilus	$>1 \times 10^7$	1,9 кГр

Примечание: * — при температуре 54°C, относительной влажности 60%, концентрации EtOx 600 мг/мл.

Паровой метод (водяной насыщенный пар под избыточным давлением).

Таблица 56.

Наименование объекта	Режим стерилизации*						Условия проведения стерилизации в паровом стерилизаторе	Срок хранения стерильности		
	Давление пара в стерилизационной камере, МПа (кгс/см ²)		Рабочая температура в стерилизационной камере, °C		Время стерилизационной выдержки, мин.					
	номин. знач.	Предел отклонения	номин. знач.	Предел отклонения	номин. знач.	предел отклонения				
Стеклянная посуда, ступки, изделия из: стекла, текстиля (халаты, вата, марля, фильтровальная бумага), коррозионно-стойкого материала	0,20 (2,0)	$\pm 0,02 (\pm 0,2)$	132	± 2	20	± 2	Стерилизацию проводят без упаковки или в стерилизационной коробке в упаковке из 2-х слойной пергаментной бумаги марки А или В или в стеклянных банках	Срок сохранения стерильности		
Изделия из резины, латекса и отдельных полимерных материалов (полиэтилен высокой плотности, ПВХ-пластикаты, фильтры из фторопласта и полидиэтерные из лавсана)	0,11 (1,1)	$\pm 0,02 (\pm 0,2)$	120	± 3	45	± 3	Стерилизацию проводят или/или — без упаковки — в стерилизационных коробках — в двойной мягкой упаковке из бязи — в пергаментной бумаге марки А или В — в стеклянных банках, колбах	изделий в упаковке 3 дня		

*Контроль температурного режима паровой стерилизации осуществляют максимальным термометром со шкалой 150°C или термопарами. В качестве химического термотеста используют смесь бензойной кислоты с фуксином (10:1), температура плавления 121°C.

Воздушный метод стерилизации (сухой горячий воздух)

Таблица 57.

Наименование объекта	Режим стерилизации*				Условия проведения стерилизации в стерилизаторе	Срок сохранения стерильности		
	Рабочая температура в стерилизационной камере, °C		Время стерилизационной выдержки, мин					
	номин. знач.	пред. откл.	номин. знач.	пред. откл.				
Стеклянная посуда, ступки, изделия из стекла, металла и силиконовой резины	180	$+2$ -10	60	$+5$	Стерилизации подвергают сухие изделия. Стерилизацию проводят: — в упаковке из бумаги (мешочной или влагопрочной) — или без упаковки в открытых емкостях	Изделия хранятся 3 суток. Без упаковки должны быть использованы непосредственно после стерилизации		
	160	$+2$ -10	150					

Примечание: Аптечную посуду после снижения температуры в стерилизаторе до 60-70°C вынимают и тотчас закрывают стерильными пробками.

*Контроль воздушной стерилизации осуществляют с помощью индикаторной бумаги (на основе термоиндикаторной краски №6), которая изменяет цвет при 160°C или используют химические термотесты: сахароза, тиомочевина, температура плавления 180°C; гидрохинон, температура плавления 170°C.

Наименование объекта	Биоцид	Режим стерилизации				Условия проведения стерилизации	Срок сохранения простерилизованного изделия		
		температура, °С		время выдержки, мин					
		номин. знач.	пред. откл.	номин. знач.	пред. откл.				
Изделия из стекла и коррозионно-стойких металлов и сплавов, полимерных материалов, резины	6% раствор* Перекись водорода (ГОСТ 177-88)	18 50	— 32	360 180	3 35	Закрытые емкости из стекла, пластмассы или покрытые эмалью (эмаль без повреждения)	В стерильной емкости (стерилизационная коробка), выложенной простыней — 3 суток Стерилизацию проводят при полном погружении изделия в раствор на время стерилизационной выдержки, после чего изделие промывают стерильной водой в стерильной емкости		

*Технология, контроль качества и срок годности раствора водорода перекиси 6%, изготавляемого в аптеках (Методические указания утв. 18.07.1996).

онного агента от больного человека к здоровому. В условиях производства важно избавиться и от сапротрофных микроорганизмов, причем число их видов возрастает в соответствии с нормативными требованиями к микробной чистоте объектов производства.

Объектами промышленной дезинфекции являются воздух производственных помещений, поверхности помещений, оборудования, коммуникаций. Частным случаем дезинфекции можно считать промышленную антисептику. Это отдельная область дезинфекции, которая предусматривает использование химических веществ неспецифического antimикробного действия (антисептиков) для уничтожения или подавления размножения микроорганизмов на поверхности кожи (реже слизистых оболочках) персонала, занятого в производстве.

В медицине сущность антисептических мероприятий заключается в использовании antimикробных препаратов при обработке ран, полостей, операционного поля, рук персонала для борьбы с возбудителями инфекционных заболеваний. Дезинфекцию на предприятиях химико-фармацевтической промышленности осуществляют в ходе подготовки к работе с целью достижения необходимого уровня микробной чистоты помещений (при создании помещений определенных классов чистоты), оборудования и готового продукта.

Антисептики используют в комплексе санитарно-гигиенических мероприятий при подготовке персонала к работе и в ходе выполнения технологического процесса (в асептических производствах).

24.6 Методы дезинфекции

Различают механическую, физическую и химическую дезинфекцию. При *механической* дезинфекции микроорганизмы только удаляют с объекта, а не уничтожают, что происходит при влажной уборке, стирке, проветривании.

К *физическому* методам относят ультрафиолетовую (УФ) обработку. Используют дуговые, газоразрядные низкого давления, бактерицидные лампы ДБ-15, ДБ-30, ДБ-60 (в зависимости от мощности), с длиной волны излучения 253,7 нм. Срок службы лампы составляет 1500-2000 ч. К концу срока мощность и, следовательно, эффективность воздействия на микроорганизмы снижается на 50% от исходного уровня. Лампы прямого действия используют только в отсутствие персонала, а рассеянного света (экранированные) можно применять в процессе работы. Экранированные лампы размещают не ниже 2 м от уровня пола. Гибель микроорганизмов происходит в верхних слоях воздуха, а нижние слои обеззараживаются за счет конвекции. Повышают эффективность обработки специальные устройства для рециркуляции воздуха. Поток воздуха из помещения пропускают через камеру, в которую вмонтированы лампы УФО, и возвращают после обработки в то же помещение. Специальные лампы повышенной мощности позволяют проводить дезинфекцию методом вспышки (например, для обработки 30 м³ воздушной фазы требуется всего 2 мин, для 60 м³ — 5 мин).

К ограничениям использования УФО относится токсическое действие на персонал выделяющихся озо-

на (O_3) и оксида азота (NO), а также неблагоприятное действие на сетчатку глаз.

Кроме того используют термические методы дезинфекции (кипячение, обработка водяным паром, сухим горячим воздухом).

К химической дезинфекции относят обработку объекта химическими веществами-дезинфектантами: обмывание, протирание, погружение, орошение при распылении дезинфектанта (аэрозольная обработка). Аэрозольная обработка позволяет уменьшить расход дезинфектанта и его разрушающее действие на обрабатываемую поверхность, обработать труднодоступные места. Эффективность воздействия повышается с уменьшением размера аэрозольных частиц. Оptимальным является размер частиц 1-10 мкм, сопоставимый с размером микробных клеток.

Требования, предъявляемые к химическим дезинфектантам и антисептикам:

1). Хорошая растворимость или способность смешиваться с водой с образованием стойких смесей.

2). Низкая токсичность и отсутствие раздражающего действия на кожу и слизистые оболочки персонала.

3). Широкий спектр антимикробной активности, с ее проявлением в максимально короткое время.

4). Способность хорошо смачивать объекты и не оказывать на них коррозионного или другого разрушающего действия.

5). Стабильность в процессе хранения.

6). Наличие разрешения на использование вещества в качестве дезинфектанта в химико-фармацевтической промышленности.

Ограничение использования дезинфектантов в химико-фармацевтической промышленности определяется их безвредностью для персонала и наличием методов удаления следов этих веществ из объекта.

24.7 Основные группы дезинфектантов и цели их использования

Окислители

Наиболее широко используют растворы H_2O_2 в связи с эффективным действием не только на вегетативные клетки, но и на споры. При низких концентрациях растворы нестабильны. Повышает эффективность воздействия нагревание до 40-50°C. H_2O_2 используют для обработки помещений и коррозионностойкого оборудования из стекла и полимерных материалов в концентрации 3-6% в сочетании с моющими веществами. Аэрозольно можно распылять 6% раствор H_2O_2 для дезинфекции воздуха помещений.

Надуксусную кислоту в 0,3-0,5% растворе используют для обработки помещений и коррозионностойкого оборудования из расчета 300 мл/м². Все работы по приготовлению рабочих растворов и де-

зинфекции проводят в защитной одежде, перчатках и респираторе.

Галогенсодержащие вещества

Для целей дезинфекции используют хлорную известь и хлорамин Б в виде 5-10% растворов для обработки коррозионностойкого оборудования, в концентрации 0,2% — для обработки емкостей и трубопроводов подачи инъекционной воды.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ)

Наиболее широко используют катионные ПАВ, к которым принадлежит вся группа четвертично-аммониевых соединений (ЧАС): бензалкоинума хлорид, цетилпиридиния хлорид, дегмин, димицид, катамин АВ и др. Катамин АВ применяют в виде 0,5-1% раствора, расход составляет 0,5 л на 1 м² поверхности. После 30 мин. экспозиции удаляют вещество промыванием поверхности водой. Используют для дезинфекции оборудования, в том числе и коррозионностойкого. Полимерный комплекс катамина АВ — катапол, обладает пониженной по сравнению с исходным веществом токсичностью и рекомендуется для дезинфекции воздуха в виде аэрозоля, для обработки рук, поверхности оборудования и др.

ПАВ не действуют на споры бацилл, однако в смеси с H_2O_2 обладают спороцидной активностью (например, ПВК — раствор катамина АВ, содержащий H_2O_2 , грилен, перамин — смеси ЧАС с H_2O_2).

Поверхностную активность проявляют моющие средства, также обладающие антимикробным действием. В химико-фармацевтической промышленности используют "Прогресс", "Сульфонол", "Афол" и др.

Бигуаниды, например, биглюконат хлоргексидина используют в виде 0,1-0,2% растворов из расчета 200 мл на 1 м² для дезинфекции помещений и оборудования и для аэрозольной обработки воздуха. Биглюконат хлоргексидина выпускают в виде 20% раствора (глибитан), а также под торговыми названиями "Плива-септ" (5% раствор с добавлением ПАВ) и Плива-септ-тинктура (5% хлоргексидина биглюконата в смеси с 80° этиловым спиртом).

Альдегиды

Глутаровый альдегид используют для дезинфекции в виде 2% раствора в смеси с активатором (препарат "Глутарал"), а также в смеси с глиоксалем и ЧАС (препарат "Лизоформин 3000"). Формальдегид — высоко-реакционноактивное вещество, в связи с выраженным раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки для целей дезинфекции его применяют крайне редко.

Для обработки рук персонала используют следующие препараты:

Дегмин — ЧАС гексаметиленамина и высокомолекулярных спиртов — 1% водный раствор.

"Рецептура С-4" — смесь растворов H_2O_2 и муравьиной кислоты. Используют раствор "рецептуры С-4" с массовой долей 2,4%.

Этиловый спирт в виде 76% раствора.

24.8 Микробная контаминация растворов антисептиков и дезинфицирующих агентов

Почти все антимикробные вещества, применяемые для дезинфекции (антисептики), могут содержать микробы-контаминаанты, основными из них являются псевдомонады.

Микроорганизмы попадают в растворы в процессе их приготовления, хранения и использования. Источниками являются исходные сухие вещества, концентрированные безводные жидкости, вода и другие растворители, стабилизаторы, другие вспомогательные вещества, емкости для хранения.

Вторичная контаминация может появиться в результате неправильного хранения и использования: при открытом хранении, заборе растворов из емкостей с использованием грязного оборудования и т. п.

Последствием использования контамированных растворов дезинфицирующих и антисептиков является опасность загрязнения готового продукта и распространение полирезистентных штаммов микроорганизмов. Поэтому необходимо строгое соблюдение правил приготовления растворов дезинфицирующих и антисептиков в соответствии с требованиями GMP:

- 1) для приготовления растворов использовать воду марки “очищенная”;
 - 2) использовать предварительно вымытую посуду;
 - 3) растворы дезинфектантов должны храниться ограниченное (строго определенное) время;
 - 4) не допускается внесение свежеприготовленного раствора в частично использованный;
 - 5) необходима периодическая смена дезинфектанта (ротация) для исключения селекции устойчивых штаммов;
 - 6) в производстве стерильных ГЛС антисептики и дезинфектанты должны быть стерильными. Стерилизуют растворы фильтрацией через мембранные с диаметром пор 0,45 мкм.

24.9 Дезинфекция в аптеках

В соответствии с приказом МФ РФ № 309 «Об утверждении инструкции по санитарному режиму аптечных организаций (аптек)» для дезинфекции различных объектов утверждены термические (табл. 59) и химические (табл. 60) методы и средства.

Заключение

Асептика — это комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микробов на какой-либо объект. Асептические условия создаются с помощью дезинфекции и стерилизации.

Антисептика — это уничтожение или подавление роста микробов, находящихся в контакте с человеком, с помощью химических веществ — антисептиков.

Стерилизация — это процесс полного уничтожения или удаления из объекта всех жизнеспособных микроорганизмов.

Основные виды стерилизации: термическая (сухой жар или пар под давлением), химическая (газами или растворами биоцидов), радиационная (γ -излучение) и фильтрация через мембранные фильтры.

Контроль стерилизации осуществляют химическим и биологическим методами.

Дезинфекция — это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение грибов на (в) объектах внешней среды с помощью механических, физических и химических средств.

Основные группы дезинфицирующих веществ: окислители (H_2O_2 и др.), галогены (хлорная известь, хлорамин Б и др.), поверхностно-активные вещества, альдегиды и спирты.

При неправильном приготовлении и хранении растворы дезинфицирующих средств могут быть заражены, например, псевдомонадами.

Термические средства и режимы дезинфекции

Таблица 59.

Наименование объекта	Дезинфицирующий агент	Режимы дезинфекции термическими методами				Условия проведения дезинфекции
		температура, °C		время выдержки, мин		
	номин. знач.	пред. откл.	номин. знач.	пред. откл		
Изделия из стекла, металла, термостойких полимерных материалов, резины (шпатели, ножницы, пинцеты, трубы, щетки для мытья рук, ёршики)	Вода очищенная или вода очищенная с 2% натрия гидрокарбоната	96	±1	30	+5	Кипячение при полном погружении изделий в воду дезинфекционный кипятильник
				15		
Изделия из стекла, металла, резины, латекса и термостойких полимеров	Водяной насыщенный пар под избыточным давлением Р=0,5 МПа (0,5 кгс/см ²)	110	±2	20	+5	В паровом стерилизаторе, упакованные в стерилизационные коробки
Щетки для мытья рук		120		20		

Наименование объекта	Дезинфицирующий агент	Режимы дезинфекции термическими методами				Условия проведения дезинфекции
		температура, °C	время выдержки, мин	номин. знач.	пред. откл.	
Изделия из стекла, металла	Сухой горячий воздух	120	±4	45	+5	В воздушном стерилизаторе без упаковки (в лотках)
Ветошь, тряпки для уборки	Вода	96	±1	30	+5	После стирки кипячение при полном погружении

Химические средства и режимы дезинфекции

Таблица 60

Наименование объекта	Дезинфицирующее средство	Концентрация, %	Экспозиция, мин	Способ обработки
Помещения, предметы обстановки, оборудование (стены, двери, пол, жесткая мебель)	1) хлорамин Б 2) хлорамин Б с 0,5% моющего средства 3) гипохлорит натрия 4) гипопхлорит натрия, получаемый в электро-химической установке ЭЛМА-1 5) перекись водорода с 0,5% моющего средства	1 0,75 1 0,5 3	30-60 60 2-кратное протирание с интервалом 15 мин 200 мл/м ²	2-кратное протирание или орошение поверхностей из расчета 300 мл/м ² Орошение
Коврики из пористой резины	1) хлорамин Б с 0,5% моющего средства 2) перекись водорода с 0,5% моющего средства	0,75 3	30 30	Погружение в раствор То же
Коврики из поролона	Перекись водорода с 0,5% моющего средства	3	30	То же
Уборочный инвентарь, ветошь	1) хлорамин Б 2) дихлор 1 3) хлордезин 4) гипохлорид натрия 5) гидрохлорид натрия, получаемый в электро-химической установке ЭЛМА-1 6) перекись водорода с 0,5% моющего средства	1 2 1 1 0,25 3	60 60 60 60 60 120	Погружают в раствор, промывают и сушат То же То же Погружение из расчета 4-5 л на 1 кг сухого веса вещей Замачивание, прополаскивание с последующей стиркой и высушиванием Замачивание
Руки персонала**	1) этиловый спирт 2) раствор хлоргексидина биглюконата в 70% этиловом спирте 3) раствор йодопирона (иодоната, иодвидон) 4) хлорамин Б (применяется при отсутствии других препаратов)	70 0,5 1 0,5		После мытья с мылом протирают марлевой салфеткой, смоченной раствором Препарат наносят на ладони в количестве 5-8 мл и втирают в кожу рук
Обувь	1) хлорамин Б 2) хлорамин Б с 0,5% моющего средства 3) перекись водорода с 0,5% моющего средства 4) раствор формальдегида 5) раствор уксусной кислоты	1 0,75 3 40 40		Руки погружают в раствор и моют в течение 2 мин, затем дают высохнуть 2-кратное протирание В пакете с ваткой, смоченной раствором, нейтрализованным раствором аммиака или щелочью

** После окончания работы руки обмывают теплой водой и обрабатывают смягчающими средствами.

Глава 25. ПРИНЦИПЫ GMP И GPP В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Фармацевтическая промышленность Российской Федерации поддерживает высокие стандарты управления качеством при разработке, производстве и контроле лекарственных средств. Система государственной регистрации гарантирует, что все лекарственные средства оценены уполномоченным органом, чтобы обеспечить их соответствие современным требованиям безопасности, качества и эффективности [38, 39].

Производитель лекарственных препаратов должен производить лекарственные препараты так, чтобы гарантировать их соответствие своему назначению, требованиям регистрационного досье или протоколу клинического исследования и исключить риск для пациентов, связанный с безопасностью, с неудовлетворительным качеством или эффективностью. Основные принципы управления качеством, правил надлежащего производства и контроля качества и управления рисками для качества взаимосвязаны. Правила надлежащего производства и контроля качества применяются ко всем стадиям жизненного цикла продуктов: производство лекарственных препаратов для клинических исследований, перенос технологии, промышленное производство, прекращение производства лекарственных препаратов. Фармацевтическая система качества может распространяться и на такую стадию жизненного цикла продуктов, как фармацевтическая разработка.

25.1 Правила GMP в обеспечении качества лекарственных средств

Каждый производитель лекарственных средств (ЛС) и фармацевт несет огромную ответственность перед потребителями, т.е. больными: лекарственные средства должны строго соответствовать назначению, а пациенты не должны подвергаться риску из-за нарушения требований по их безопасности, качеству и эффективности. Для выполнения таких требований на предприятие должна быть организована система обеспечения качества. Обеспечение качества — это широкая концепция, охватывающая все параметры,

которые по отдельности или совместно влияют на качество продукции.

Система обеспечения фармацевтического качества в производстве лекарственных средств гарантирует:

- 1) проведение разработки препаратов с учетом требований правил производства и лабораторной практики;
- 2) составление четкой документации на все производственные и контрольные операции;
- 3) обеспечение производства, поставки и использования соответствующих исходных и упаковочных материалов;
- 4) изготовление и проверку готовой продукции в соответствии с принятыми инструкциями;
- 5) хранение готовой продукции таким способом, который не влияет на уровень качества;
- 6) проведение самоинспекции и/или аудита (контроля сторонней организации) качества, которые повышают эффективность системы обеспечения качества.

Правила GMP являются частью фармацевтической системы обеспечения качества, гарантирующей, что продукция производится и контролируется в соответствии со стандартами качества.

25.2 Общие представления о системе правил GMP

Одним из основных показателей качества фармацевтической продукции является безопасность для больного. Этот принцип осуществляется на всех этапах разработки, испытания, производства и реализации ЛС (рис. 82).

Правила GMP (в дословном переводе «Правила надлежащего, доброкачественного производства») направлены на решение двуединой задачи: (1) они являются гарантами качества производимой продукции, (2) направлены на уменьшение риска, свойственного любой фармацевтической продукции, который не может быть полностью исключен при проверке на соответствие стандартам качества.

Некачественные лекарства не только представляют опасность для здоровья людей, но и наносят ма-

НИР

GLP

GCP

GMP

GDP

GPP



Рис. 82. Этапы разработки, испытаний, производства и реализации ЛС-жизненный цикл лекарственного средства.

GLP — Good Laboratory Practice

GCP — Good Clinical Practice

GMP — Good Manufacturing Practice

GDP — Good Distribution Practice

GPP — Good Pharmacy Practice

териальный ущерб государству и индивидуальным потребителям. Некачественные лекарства могут содержать токсичные вещества, добавленные неумышленно. Препарат, не содержащий действующих веществ в достаточном количестве, не будет давать ожидаемого терапевтического эффекта.

Правила GMP распространяются на все аспекты разработки нового препарата, проектирования, производства, начиная с исходных материалов, помещений и оборудования и заканчивая подготовкой персонала и его личной гигиеной. Для каждого процесса, способного влиять на качество готового про-

дукта, должны быть в наличии детальные инструкции.

Правила GMP способствуют расширению возможностей экспорта медикаментов. Большинство стран согласно импортировать и направлять на реализацию только лекарства, произведенные с соблюдением правил GMP.

В настоящее время к системе правил присоединились 140 государств, в том числе и Россия.

Основные положения GMP:

- Четкое описание всех производственных этапов, их систематическая проверка.

2. Обоснование всех критических производственных этапов и существенных изменений процессов в соответствии с НАССР.

3. Соблюдение требований к персоналу, условиям производства и помещениям, оборудованию, материалам, емкостям и этикеткам.

4. Составление указаний и описание действий должны быть даны в ясной и однозначной письменной форме и относиться специально к имеющимся установкам.

5. Составление протоколов ведется с указанием всех производственных ступеней, записью и проверкой любых отклонений.

6. Сбыт продукции осуществляется таким образом, чтобы любую угрозу качеству свести к минимуму.

7. Наличие системы отзыва продукции.

8. Проверка претензий и причин нарушения качества для принятия соответствующих мер.

Преимуществами GMP являются:

1) профилактический подход к проблеме обеспечения качества;

2) комплексный и системный подход;

3) улучшение имиджа производителя;

4) экономическая выгода в долгосрочном плане.

Изготовление некачественных препаратов не приводит к экономии средств. В долгосрочной перспективе поиск и исправление ошибок требуют больших затрат, чем их предотвращение.

Цель GMP — избежать ошибок. Внедрение GMP является инвестицией в высококачественные медикаменты. Изготовление и распространение низкокачественных лекарств приводит к утрате доверия ко всем участникам лекарственного обеспечения, в том числе и к производителю.

Российские правила GMP изложены в разделах ОСТ 42-510-98 «Правила правильного производства», они являются общим руководством, устанавливающим порядок организации производственного процесса и проведения контроля, и содержат минимальные практические указания по правильному ведению производства. Они являются обязательными для всех производителей лекарственных средств.

25.3 Микробиологические требования к организации производства фармацевтической продукции

Всю фармацевтическую продукцию по показателю микробиологической чистоты подразделяют на стерильную и нестерильную.

Стерильные препараты производят в асептических условиях, которые должны исключать их загрязнение микроорганизмами, пирогенными веществами и механическими частицами.

Технологические процессы в производстве стерильных препаратов могут предусматривать проведение стерилизации на завершающей стадии производства (финишная стерилизация) или стерилизацию на промежуточных стадиях. К последней группе относят:

• термолабильные препараты, стерилизуемые методом мембранных фильтрования с последующим дозированием;

• глазные мази, не стерилизуемые в конечной упаковке (алюминиевых тубах);

• глазные капли с последующим заполнением стерильного раствора в тюбики-капельницы (предварительно простерилизованные ионизирующим излучением или химическим методом).

К производству таких препаратов предъявляют особые требования по созданию асептических условий, которые изложены в Приложении к правилам.

Нестерильные препараты производят в неасептических условиях, приближенных к асептическим. Требуемый уровень микробиологической чистоты обеспечивается проведением соответствующих мероприятий, включающих организацию производственных помещений, выбор и эксплуатацию оборудования, и микробиологический контроль производства и готовой продукции, подбор и гигиеническую подготовку персонала.

Персонал фармацевтических предприятий является одним из основных источников контаминации ГЛС и полупродуктов механическими частицами и микробиологическими организмами.

Весь персонал, работающий на предприятии, должен иметь знания и опыт, необходимые для выполнения соответствующих обязанностей, а также должен быть ознакомлен с правилами GMP.

Состояние здоровья персонала является важным фактором в системе обеспечения качества ГЛС, поскольку человек может быть источником инфекции или способствовать ее переносу. Весь персонал, занятый на производстве, должен проходить регулярные медицинские осмотры. К работе в чистых помещениях не должны допускаться люди, страдающие аллергическими и кожными заболеваниями, повышенным отделением перхоти, а также курящие. Временно (до нормализации состояния здоровья) к работе не допускаются больные инфекционными заболеваниями и сотрудники, имеющие загар или различные повреждения кожи. Персонал должен ставить в известность руководителей о любых недомоганиях (острых респираторных, кожных) способных оказать нежелательное воздействие на качество ЛС.

Личная гигиена персонала. Персонал, работающий в производстве стерильных лекарственных средств, должен строго соблюдать правила личной гигиены: регулярно принимать душ, мыть голову не реже 2-х раз в неделю. Подготовка персонала к работе должна осуществляться в определенном порядке. Во время работы необходимо носить технологическую одежду,

соответствующую выполняемым производственным операциям (ГОСТ Р 52538-2006).

Во время работы запрещается использование косметики, а также запрещается носить часы и ювелирные изделия, вносить в производственные помещения личные вещи, запрещается принимать пищу и хранить еду, личные лекарства.

Правила поведения персонала. В производстве стерильных лекарственных средств необходимо строго ограничивать число работающих до минимально необходимого уровня. Запрещается бесцельное хождение во время работы. Все движения должны быть медленными и плавными. Запрещаются разговоры на посторонние темы; устное общение с людьми, находящимися вне производственных помещений, осуществляется через телефон или селектор. Запрещается смех, крики, так как при этом увеличивается число выделяемых изо рта микроорганизмов. Нельзя поднимать и использовать упавшие на пол во время работы предметы. Запрещается использование карандашей, перьевых ручек, разрешается применение шариковых ручек или фломастеров, которые один раз в смену протирают салфеткой из специальной ткани, смоченной этиловым спиртом.

Обо всех нарушениях и неблагоприятных изменениях санитарного режима персонал должен сообщать руководителю.

Неправильная подготовка и поведение персонала приводит к резкому снижению показателей микробиологической чистоты.

25.4 Управление рисками для качества

При производстве и применении лекарственного препарата, включая его компоненты, в определенной степени обязательно присутствуют риски [38, 39]. Риски для качества являются только одной составляющей общего риска. Важно понимать, что качество продукции следует поддерживать в течение жизненного цикла продукции, таким образом, чтобы характеристики, имеющие значение для качества лекарственного препарата, оставались такими же, как у лекарственных препаратов, использовавшихся при клинических исследованиях. Эффективный подход к управлению рисками для качества может в дальнейшем гарантировать пациенту высокое качество лекарственного препарата с помощью установления в ходе разработки и производства предупреждающих методов идентификации и контроля возможных проблем, связанных с качеством. Управление рисками для качества основывается на научном и практическом подходе к принятию решений. Оно предусматривает документально оформленные, понятные и воспроизводимые методы по осуществлению этапов процесса управления рисками для качества на основании имеющихся знаний относительно

оценки вероятности, тяжести и иногда способности к выявлению рисков.

Управление рисками для качества — это систематический процесс для общей оценки, контроля, информирования и обзора рисков для качества лекарственного препарата на протяжении его жизненного цикла. Модель управления рисками для качества представлена на рис. 82. настоящего документа.

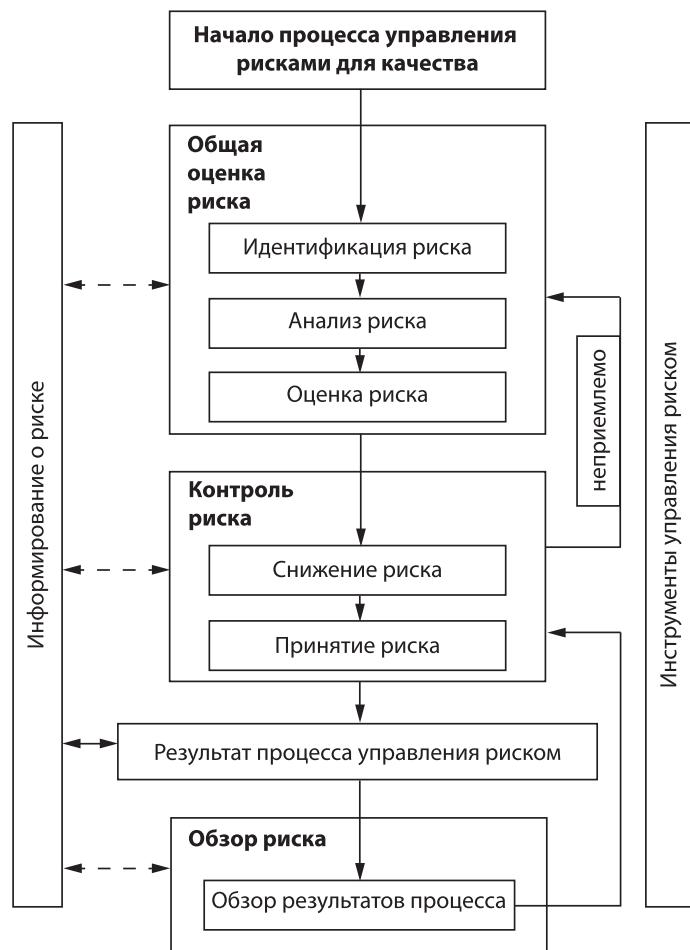


Рис. 83. Общая схема типового процесса управления рисками для качества.

На приведенной схеме не указаны точки принятия решений, поскольку решения могут быть приняты в любой точке процесса. Эти решения могут возвращать на предыдущий этап для поиска дальнейшей информации, чтобы откорректировать модели рисков или даже прекратить процесс управления риском из-за информации, являющейся основанием для такого решения. Примечание: «неприемлемо» на рис. 83 настоящего документа касается не только законодательных, административных или надзорных требований, но также необходимости пересмотреть процесс общей оценки рисков. Общая оценка рисков состоит из идентификации опасностей, а также анализа и оценки рисков, связанных с воздействием этих опасностей (как указано ниже). Общую оценку рисков для качества начинают с четкого описания проблемы или аспекта риска. Если рассматриваемый риск четко

определен, будет легче установить соответствующий инструмент управления риском. Результатом общей оценки рисков является либо количественная оценка рисков, либо качественное описание диапазона рисков. Если риски выражены количественно, используют числовое выражение вероятности. Управление рисками для качества в технологическом процессе необходимо проводить в *критических контрольных точках, которые определяются с использованием системы НАССП*.

Анализ опасностей и (Hazard Analysis and Critical Control Points — НАССП) является системным, предупреждающим и профилактическим инструментом для обеспечения качества, надежности и безопасности продукции. Это структурированный подход с применением технических и научных принципов для анализа, оценки, предупреждения и контроля рисков или неблагоприятных последствий опасности, которые являются результатом планирования, разработки, производства и применения продукции.

НАССП может быть применен для определения рисков, связанных с физической, химической и биологической опасностью (в том числе микробной контаминацией), и управления ими. НАССП наиболее полезен, если понимание продукции и процесса является достаточно полным для обеспечения идентификации критических контрольных точек. Результатом НАССП является информация относительно управления рисками, облегчающая мониторинг критических точек не только в ходе производственного процесса, но и на других этапах жизненного цикла.

НАССП состоит из следующих семи этапов:

1. проведение анализа безопасности и определение предупреждающих мер для каждой стадии процесса;
2. определение критических контрольных точек;
3. установление критических пределов;
4. установление системы проверки критических контрольных точек;
5. определение корректирующих мероприятий, которые должны быть проведены, если при мониторинге установлено, что критические контрольные точки являются неконтролируемыми;
6. введение системы подтверждения, что система НАССП работает эффективно;
7. установление системы хранения записей.

25.5 Принципы GPP в обеспечении качества лекарственных средств

Обеспечение качества ЛС — одна из важнейших задач современной фармации. Для стандартизации и унификации процесса обеспечения качества ЛС на этапе непосредственного их поступления к пациентам (т.е. в розничном звене распределения ЛС) признается необходимым использование принципов и ме-

тодов стандартов «Надлежащая Аптечная Практика» (Good Pharmacy Practice — GPP).

Важнейшим показателем качества ЛС является их соответствие требованиям Фармакопеи по микробиологическим показателям. С этой целью в аптеках, где ЛС изготавливаются по рецепту врача, предусмотрен микробиологический контроль.

Объектами микробиологических исследований являются:

- 1) вода дистиллированная;
- 2) инъекционные растворы до стерилизации;
- 3) инъекционные растворы после стерилизации;
- 4) глазные капли после стерилизации;
- 5) глазные капли, приготовленные в асептических условиях на стерильных основах;
- 6) сухие лекарственные вещества, используемые для изготовления инъекционных растворов;
- 7) аптечная посуда, пробки, прокладки, прочие вспомогательные материалы;
- 8) инвентарь, оборудование, руки и санитарная одежда персонала;
- 9) воздушная среда.

Отбор проб и микробиологический анализ производят сотрудники лицензированных лабораторий соответствующих санитарно-эпидемиологических учреждений.

Микробиологические показатели качества дистиллированной воды и ЛС должны соответствовать требованиям Фармакопеи.

Критерии оценки микробной обсемененности воздуха приведены в табл. 62.

Большое значение имеют внешний вид и поведение персонала аптеки. Опрятность и чистота одежды, рук, прическа, соблюдение гигиенических навыков играют большую санитарно-просветительную роль. Аптечный работник является личным примером культуры поведения для посетителей, с которыми он постоянно общается.

Каждый аптечный работник на работе должен постоянно носить халат и головной убор (шапочку или косынку), которые обязан менять не реже 2 раз в неделю. Придя на работу, следует надеть халат, тщательно вымыть руки с мылом и обработать дезинфицирующим раствором, волосы полностью убрать под головной убор. Хранить личную и производственную одежду необходимо раздельно. Аптечные работники должны иметь сменную обувь. В течение рабочего дня надо следить за чистотой рук, спецодежды, своего рабочего места, ежедневно менять полотенце для рук.

Перед посещением туалета аптечный работник должен снять халат, а после посещения тщательно вымыть руки с мылом и обработать их дезинфицирующим раствором. Все это производится в предуборной, где должны быть раковина с подводкой холодной и горячей воды, емкость с дезинфицирующим раствором,

№ п/п	Наименование помещений	Условия работы	Общее кол-во колоний микро-организмов в 1 м ³ воздуха	Кол-во золотистого стафилококка в 250 дм ³ воздуха	Кол-во плесневых и дрожжевых грибов в 250 дм ³ воздух
1	Асептический блок, стерилизационная (чистая половина)	до работы после работы	не выше 500 не выше 1000	не должно быть не должно быть	не должно быть не должно быть
2	Ассистентская, фасовочная, дефектарная, материальная	до работы после работы	не выше 750 не выше 1000	не должно быть не должно быть	не должно быть не должно быть
3	Моечная	во время работы	не выше 1000	не должно быть	до 12
4	Зал обслуживания	во время работы	не выше 1500	до 100	до 20

воздушная электросушилка, вешалки для полотенца и для халата.

Запрещается выходить в халатах за пределы производственных помещений и тем более за пределы аптеки, входить в производственные помещения без халата, носить в его карманах предметы личного пользования, за исключением чистого носового платка, хранить в одном шкафу личную и производственную одежду.

Уход за кожей и поддержание ее чистоты является одним из основных требований личной гигиены. Особое внимание следует обращать на состояние подногтевых пространств.

Работники, изготавливающие лекарства в асептических условиях, должны особенно строго соблюдать правила личной гигиены. Изготовление стерильных лекарств должно производиться в условиях тщательного соблюдения правил личной гигиены. Следует надевать специально наглоухо закрытый (хирургический) халат, иметь отдельный головной убор и обувь, стерильную марлевую повязку. Смена одежды производится в предасептической (шлюз).

Обработка рук персонала. Обработку рук производят в специально предназначенных местах. Запрещается мыть руки над раковиной для мытья аптечной посуды.

Для механического удаления загрязнений руки моют теплой проточной водой в течение 1-2 мин. мылом с высокой пенообразующей способностью (банное, детское, хозяйственное). Затем руки ополаскивают водой для удаления мыла и обрабатывают дезрастворами.

В асептическом блоке руки моют мылом в течение 1-2 мин., затем ополаскивают, обрабатывают дезраствором, вытирают насухо. После этого надевается стерильная технологическая одежда. Обработку рук повторяют, если работа длится более 4-х часов.

Для дезинфекции рук используют спирт этиловый 70% или другие спиртосодержащие препараты (АХД-2000, октонидерм, октонисепт), раствор хлоргексидина биглюконата 0,5% (в 70% этиловом спирте), раствор йодофоров: йодопирон, йодонат, йодовидона 1%, при отсутствии других препаратов используют 0,5% раствор хлорамина Б.

При обеззараживании рук спиртосодержащими препаратами их протирают марлевой салфеткой, смоченной раствором хлоргексидина или йодофоров препарата наносят на ладони в количестве 5-8 мл и втирают в кожу рук. При обработке рук раствором хлорамина их погружают в 0,5% раствор и моют в течение 2 мин., затем дают рукам высохнуть.

По окончании работы руки обмывают теплой водой и обрабатывают смягчающими средствами: смесью из равных частей глицерина, спирта, 10% раствора аммиака и воды, которую перед применением тщательно встряхивают. Возможно применение смягчающих средств, готовых кремов.

25.6 Хранение в аптечных учреждениях лекарственных средств

Порядок хранения лекарственных средств и изделий медицинского назначения регламентирован Приказом Министерства здравоохранения от 13.11.1996 г. №337.

Соблюдение утвержденного порядка позволяет обеспечить сохранение высокого качества лекарств и создать безопасные условия труда фармацевтов при работе с ними.

Правильное хранение лекарств основано на правильной и рациональной организации складирования, строгом учете его движения, регулярном контроле сроков годности лекарств.

Очень важно поддерживать оптимальную температуру и влажность воздуха, соблюдать защиту определенных препаратов от света.

Нарушение правил хранения лекарств может привести не только к снижению эффективности их действия, но и нанести вред здоровью.

Чрезмерно длительное хранение лекарств (даже при соблюдении правил) недопустимо, так как изменяется фармакологическая активность препаратов.

Инструкция по организации хранения лекарственных средств и изделий медицинского назначения распространяется на все аптеки и аптечные склады.

Оборудование помещений хранения должно обеспечивать сохранность лекарств. Эти помещения обе-

спечиваются противопожарными средствами, в них поддерживаются необходимые температура и влажность воздуха.

Большую роль играет чистота воздуха помещений хранения лекарств, для этого они должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией или в крайнем случае форточками.

Если аптеки расположены в климатических зонах с резкими колебаниями температуры и влажности, их оборудуют кондиционерами. В помещениях хранения лекарств должно быть достаточное количество шкафов, стеллажей, поддонов и т. д. Стеллажи должны находиться на расстоянии 0,5-0,7 м и от наружных стен, не менее 0,25 м от пола и 0,5 м от потолка. Расстояние между стеллажами должно быть не менее 0,75 м, проходы должны быть хорошо освещены. Чистота помещений аптек и складов обеспечивается влажной уборкой не реже 1 раза в день с применением разрешенных моющих средств.

В зависимости от физических и химических свойств лекарственных средств, воздействия на них факторов внешней среды их подразделяют на лекарства, требующие защиты от влажности, света, высыхания, повышенной и пониженной температуры, красящие и пахучие, дезинфицирующие вещества.

Лекарства, хранящиеся в защищенном от света месте, — антибиотики, настойки, экстракты, витамины, кортикостероиды, растительное сырье, нитросоединения, амино- и амидосоединения, производные фенола, фенотиазина — препараты хранят в таре из светозащитных материалов.

Задача лекарственных средств от влаги нужна таким гигроскопичным веществам и препаратам, как сухие экстракты, растительное сырье, соли азотистой, азотной, фосфорной кислот, антибиотики, ферменты. Эти лекарственные средства хранят в сухом помещении в плотной таре из стекла, металла, алюминиевой фольги, пластмассы.

В защите от высыхания и улетучивания нуждаются такие вещества, как спиртовые настойки, густые экстракты, жидкие спиртовые концентраты, эфирные масла, растворы амиака, хлористого водорода, формальдегида, карболовой кислоты, спирт этиловый, перекись водорода, гидрокарбонат натрия, хлорамин В. Такие препараты необходимо хранить в герметичной таре из стекла, металла, алюминиевой фольги в прохладном месте.

В защите от воздействия повышенной температуры нуждаются многие лекарства (антибиотики, гормональные препараты, гликозиды, витамины, мази на жировой основе, иммунобиологические препараты). В инструкции по применению препарата указана температура хранения: комнатная (+18-20°C), прохладная (+12-15°C). Иногда требуется низкая температура хранения (например, для АТФ +3-5°C).

Иммунобиологические препараты хранят раздельно по наименованиям, сериям, с учетом срока их

годности. Температура хранения этих средств указана в инструкции. Не реже 1 раза в месяц иммунобиологические препараты подвергаются визуальному контролю.

Хранение антибиотиков обычно проводится при комнатной температуре в промышленной упаковке, если в инструкции нет других указаний.

Органопрепараты хранят в сухом прохладном и темном месте при температуре от 0 до ±15°C (если нет других указаний на этикетке).

Красящие и пахучие лекарственные средства и парофармацевтическую продукцию (такие как бриллиантовый зеленый, индигокармин, метиленовый синий) хранят в специальном шкафу в плотно укупоренной таре раздельно по наименованиям. Для работы с веществами каждого наименования выделяют отдельные весы, шпатель, ступку и другой инвентарь.

Хранение готовых лекарственных средств проводится с учетом свойств составляющих их ингредиентов.

Лекарственные средства с истекшим сроком годности хранятся отдельно и подлежат переконтролю (после получения результатов анализа).

Таблетки и драже необходимо хранить отдельно от других средств в заводской упаковке в сухом и при необходимости в защищенном от света месте.

Инъекционные препараты хранят в прохладном темном месте в шкафу или изолированном помещении.

Жидкие лекарственные формы (настойки, сиропы и др.) хранят в герметичной таре, наполненной доверху в темном и прохладном месте. При выпадении осадка настойки можно отфильтровать. Она считается пригодной к применению после проверки ее качества.

Плазмозаменяющие и дезинтоксикационные растворы хранят отдельно при температуре от 0 до +14°C в темном месте.

Экстракты подлежат хранению в стеклянной таре с навинчивающейся крышкой и пробкой с прокладкой в темном месте при температуре +12-15°C.

Линименты, мази, суппозитории подлежат хранению в темном и прохладном месте в хорошо укупоренной таре.

Лекарственное растительное сырье хранят в сухом, хорошо вентилируемом помещении в хорошо закрытой таре.

Резаное сырье должно находиться в тканевых мешках, порошки — в двойных мешках (многослойный бумажный — внутренний, тканевый — наружный), в картонных упаковках. Иногда допускается упаковка из полимерных материалов.

Листья наперстянки, почечный чай и другие гигроскопичные травы и плоды хранят в стеклянной плотно укупоренной таре.

Растительное лекарственное сырье периодически контролируют согласно требованиям Фармакопеи.

Если сырье поражено плесенью, вредителями или теряют нормальную окраску и запах, его в зависимости от степени поражения или бракуют, или (после обработки) используют.

Более строгими являются сроки хранения и контроля у растительного сырья, содержащего сердечные гликозиды.

Дезинфицирующие средства хранят в прохладном темном месте, в герметично укупоренной таре, вдали от мест хранения пластмассовых, металлических и резиновых изделий, от помещений получения дистиллированной воды.

Существуют правила хранения наркотических и высокотоксичных лекарственных средств, изделий медицинской техники, огнеопасных и взрывоопасных веществ, которые здесь не рассматриваются.

Заключение

Безопасность лекарственного средства (ЛС) для больного обеспечивается системой требований и контроля на всех этапах разработки, испытания, производства и реализации ЛС.

Правила GMP (Good Manufacturing Practice) являются гарантами качества производимой продукции и направлены на уменьшение риска, который не может быть полностью исключен при проверке на соответствие стандартам качества. Правила GMP охватывают всю сферу производства, в том числе они включают микробиологические требования к производству стерильных и нестерильных ЛС: организация производственных помещений, выбор и эксплуатация оборудования, контроль производства и готовой продукции, подбор и гигиеническая подготовка персонала.

Принципы и методы стандартов GPP (Good Pharmacy Practice) используют для стандартизации и унификации процесса обеспечения качества ЛС на этапе их поступления пациентам, т. е. в розничном звене их распределения.

В аптеках, где ЛС изготавливаются по рецепту врача, предусмотрен микробиологический контроль воды дистиллированной, инъекционных растворов, глазных капель, веществ, используемых для их изготовления, посуды, инвентаря и воздуха.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kathleen Park Talaro. Foundations in Microbiology. 6th Ed. SanFrancisco, 2006. — 834 p.
2. Кольчев Н.М., Госманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и иммунология, М.: КолосС, 2003. — 432 с.
3. Определитель бактерий Берджи / Под. ред. Дж. Хоулта и др. М.: Мир, 1997. — 800 с.
4. Галынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И., Потехина Т.С. Фармацевтическая микробиология. М.: Арнебия, 2003. - 352 с.
5. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: Академия, 2007, 462 с.
6. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. Минск: Высшая школа, 1986. - 186 с.
7. Нетрусов А.И. Общая микробиология. М.: Сельское хозяйство, 2007. — 283 с.
8. Шлегель Г. Общая микробиология. — М.: Мир, 1987. — 563 с.
9. Гаривова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. - 220 с.
10. Мюллер Э., Леффлер В. Микология. М.: Мир, 1995. — 343 с.
11. Елинов Н.П. Химическая микробиология. М.: Высшая школа, 1989. — 453с.
12. Кочеровец В.И., Габидова А.Э., Гунар О.В., Галынкин В.А., Заикина Н.А. Введение в Фармацевтическую микробиологию. СпБ.: Проспект науки. 2014. — 238 с.
13. Галынкин В.А., Заикина Н.А., Коваленко А.Е., Дьяков Ю.Т., Тишенков А.Д. Основы биотехнологии высших грибов. СПб, Проспект науки. 2002. — 316 с.
14. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика. СПб. 2009. — 419 с.
15. Gabidova A.E., Galynkin V.A. Microbial-Plant Interactions in the Prevention of Environmental Risks. Ekologicheskaya Khimiya, 2014, Vol. 23, No. 3, pp. 167-174.
16. А.Э. Габидова, В.А. Галынкин Микробно-растительное взаимодействие в предотвращении экологического риска. Журнал общей химии, 2014, т. 84, №13, С. 112-117.
17. Габидова А.Э., Гунар О.В., Гарабаджиу А.В., Галынкин В.А. Микробиологическая обсеменённость лекарственного растительного сырья. 5 Международный форум «Продовольственная безопасность», СПб, 2013, С. 142-148.
18. Примроуз С., Тваймен Р. Геномика. Роль в медицине. Пер. с англ. - М.: Бином. 2008. — 277 с.
19. Введение в фитопатологию. http://gendocs.ru/v6423/лекции_по_фитопатологии
20. Белошапкина О.О., Бабаева Е.Ю. Защита от болезней лекарственных растений. М.: РГАУ-МСХА, 2012. — 120 с.
21. <http://irrox.com.ru/sroki-poseva-podskazhet-termometr>
22. Надлежащая практика культивирования и сбора лекарственных растений (GACP). Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products.
23. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств. 2009.
24. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 356 с.
25. Киселев О.И., Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. СПб.: Издательство «Росток», 2012. — 272 с.
26. Покровский В.И., Киселев О.И., Черкасский Б.Л. Прионы и прионные болезни. М.: Издательство РАМН, 2004. — 384 с.
27. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск: Изд. Новосибирского университета. 1994. — 303 с.
28. Государственная Фармакопея. Выпуск 1. МЗ РФ, 12-е изд., М.: Медицина, 2009. — 400 с.
29. Biotechnology of Antibiotics. 2-d ed. New-York — Basel — Hong Kong, 1997. 842 р.
30. Красильников А.П. Справочник по антисептике. Мн.: Высшая школа, 1995. — 367 с.
31. Russel, Hugo, Ayliff's. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 4th Ed. Blackwell Publishing, 2004. 678 р.
32. Галынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И., Потехина Т.С., Еникеев А.Х. Промышленная дезинфекция и антисептика. СПб: Фолиант. 2008. — 229 с.
33. Вацков В.И. Антимикробные средства и методы дезинфекции при инфекционных заболеваниях. М.: Медицина. 1977. — 296 с.
34. Медицинская микробиология. Гл. ред. Покровский В.И., Поздеев О.К. М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. — 1200 с.
35. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. — 607 с.
36. Глик Б., Пастренак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. — 589 с.

37. Организация и контроль производства лекарственных средств. Стерильные ЛС. МУ 42-51-1-93 - МУ 42-51-26-93, — М., 1993. — 73 с.
38. Государственный стандарт СТБ 1470-2004. Республики Беларусь. Системы качества управление качеством и безопасностью пищевых продуктов на основе анализа рисков и критических контрольных точек.
39. Федотов А.Е. Основы GMP. Производство лекарственных средств. М.: Асинком, 2012. — 583 с.
40. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание т.1. М.: Гранть. 1998. — 288 с.
41. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология: учебник для вузов. 6-е изд. М.: Дрофа, 2006. — 444 с.
42. Асептическое производство медицинских иммунобиологических препаратов: Методические рекомендации. МУ 44-116. М., 1997.
43. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности. Санитарные правила СП 1.2.011-94. Госкомсанэпиднадзор России. М.: 1994. — 252 с.
44. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами. Санитарные правила СП 1.2.731-99. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. 1999. — 107 с.

Предметный указатель

«с» - после номера страницы - термин упоминается и на следующей странице.

«сс» - термин упоминается на нескольких последующих страницах.

Абсцессы	196	Аминосахара	86
Автоклав	71, 103, 200-202	Аммоний (аммиак)	132, 201, 207, 213-214
Автолиз	33, 93	Амоксициллин	84
Адапромин	64	Ампициллин	84, 114-115
Адаптация	65	Амфотерицин В	43, 75, 88, 119
Адгезины	77	Аналоги нуклеозидов	64
Адгезия	77	Анаморфы	38
Аддитивность	110	Анатоксины	158-159
Аденозиндифосфат (АДФ)	77	Анаэробные бактерии	21, 111, 169, 173, 177, 195
Аденозинмонофосфат (АМФ) - циклический	77	Аноксигенные бактерии - фотосинтез	15, 18, 49
Аденозинтрифосфат (АТФ)	106, 114, 121, 142, 214	Антагонизм лекарственный - микробный	110
Адсорбция	62, 64, 71, 201	Антеридии	34, 37-38
Адьюванты	158	Антибиотики	22, 40, 43, 50, 83, 85-88, 92, 105, 109-111, 114, 117, 121-122, 154, 161, 214
Азидотимидин	64	- влияние на нормальную микрофлору	
Азлоциллин	84	- - на синтез белков	
Азот	17, 39, 129, 169	- - на синтез пептидогликана	
Азотфикссирующие бактерии	50	- - на цитоплазматическую мембрану	
Азtreонам	85, 117	- гибридные	
Акридиновые красители	131, 143	- образование	
Аксостиль	74	- определение активности	
Активный выброс	121, 123	- полипептидные	
- транспорт	26, 39, 118, 121, 142	- промышленное производство	
Актиномикоз	197	- спектр действия	
Актиномицеты	20, 45, 171, 173	- структура	
Актиномицин	161	- устойчивость к ним	
Алкалоиды	41	- чувствительность к ним	
Аллергены	154	Антибиотикообразующие организ- мы (продуценты)	31, 40, 123, 176, 194, 196-198
Аланин	21, 104, 116-117	Антигены	67, 87, 148-158
Аллергия	154	- детерминанты (эпитопы)	
- замедленного типа		Антиметаболиты	
- немедленного типа		Антимикробное действие ЛС	146, 186, 190
Аллотипы	150	- - его устранение	
Аллопуринол	75	Антисептики	137-138,
Амастиготы	74	- методы оценки	142, 200, 205-206
Амбен	64	- механизм действия	
Амебы	73-74	- резистентность к ним	
Амикацин	86, 114	- чувствительность к ним	
Аминогликозиды	86, 106, 117-118		
Аминокапроновая кислота	64		
Аминокислоты	21, 39, 49, 103- 106, 119		

Антитела	100, 115, 146-150, 155, 158-160, 162	Белки	22-25, 28, 38-39, 59, 61-62, 70-71, 76-77, 95, 101, 119, 121, 135, 146-147, 149, 152, 158, 182
- моноклональные		- биосинтез	
- неполные		- интегральные	
- структура		- памяти	
Аппарат Гольджи	15, 18, 39	- регуляторные	
Апоптоз	70, 151-152	- репрессоры	
Апрессории	38	- трансмембранные см. Порины	
Арбидол	64	- транспортные	
Артрит	155-156, 168, 194	Бензиловый спирт	127
Артюса феномен	155	Бензилпенициллин	83-84, 105, 112-
Архебактерии	17, 173	см. Пенициллин G	114, 141
Асептика	200, 206	Бензоат (бензойная кислота)	130, 202
Аск (сумка)	30-32, 38	Бесполое размножение	26, 32-33, 35, 38
Аскогоны	34, 37-38	Бигуаниды	119, 125, 128-129, 205
Аскомицеты (сумчатые грибы)	31-32	Биполярный	25, 37
L-Аскорбиновая кислота	104	Биомасса	90
Аскоспоры	30-31, 34, 36-38	Биотехнология	11
L-Аспарагиназа	105	Бисептол	111
Астровирусы	67	Бисфенолы	125
Аубазидан	161	Бифидобактерии	167-169
Ауксотрофные мутанты	104	Борная кислота	133
- организмы		Ботулизм	25, 77, 160, 197
Ауреомицин (хлортетрациклин)	85	Бриллиантовый зеленый	131-132
Автоантигены	154	Бронопол	127-128, 142-143
Автоиммунные заболевания	155-156	Бруцеллез	76, 78, 147, 155, 194
Афлатоксины	47	Буньявирусы	67
Ацетат (уксусная кислота)	130-131, 166	Вакуоли	18, 24, 39, 74, 147
N-Ацетилглюкозамин	21-22, 116	- в клетках грибов	
N-Ацетилмуромовая кислота	21	- газовые	
Ацетилтрансфераза	122	Вакцины	77, 126, 149, 157- 159
Ацидофильные бактерии	21	- антидиотипические	
Ацикловир	64-65	- ассоциированные	
Аэрация	93	- аттенуированные	
Аэробные бактерии	173, 177	- генно-инженерные	
Базидии	31, 36-38	- живые	
Бакампициллин	117	- рибосомальные	
Бактериальная клетка	30-32, 37, 40, 42	- синтетические	
- масса		- убитые	
- хромосома		- химические	
бактерии	11, 15-29, 39, 45-55, 57-63, 69- 71, 75-79, 83-89, 95-98, 100-101, 105, 109-111, 114, 116-131, 137-150, 157-159, 165-199	Валидация	
Базидии	31, 36-38	Ванкомицин	114, 117
Бактериостатическое действие	87, 110, 112, 128	Вегетативное тело (таллом)	20, 30
Бактериофаги (фаги)	26, 45, 59, 61-62, 71, 172-173, 183	Вегетативные формы бактерий	124, 127
Бактериоцины	167	Вирионы	65, 67-68
Балантидиаз	75	Видарабин	64
Бацитрацин	87, 111	Виомицин	87
		Вирионы	65, 67-68
		Вироиды	55, 69
		Вирулентность	23, 62, 76, 157, 168
		- ее детерминанты	
		- ее факторы	
		Вирулентные фаги	61

Вирусы	26, 29, 45, 48, 50-51, 55, 59-71, 76, 78, 105, 124, 126-129, 146-152, 158, 165, 167, 172-173, 177, 181, 199	Ганцикловир	64-65
- гепатита В		Гаптены	148
- герпеса		Гаустории	38
- желтой лихорадки		Гексаметилентетрамин	132
- иммунодефицита		Гексамин	128
- карциномы		Гексахлорофен	127, 142-143
- коксаки		Гельминты	150, 155
- лейкозов		Гемолизины	77
- опоясывающего лишая		Генерализованные	183
- оспы		Генные кассеты (кластеры)	123
- папилломы		- элементы мобильные	
- парагриппа		Геномы	101, 122
- полиомиелита		Генотип	17, 23, 200
- полиомы		Геносистематика	16
- полиэдроза насекомых		Гентамицин	86, 114
- растений		Гены	26, 28-29, 37, 62, 65, 76, 95, 98-99, 122-123, 144, 148, 161
- саркомы		- мозаичные	
- табачной мозаики		- регуляторные	
- энцефалита		- резистентности	
- эпидемического паротита		- структурные	
- Эпштейна-Барр		Гепаднавирусы	66
(инфекционного мононуклеоза)		Гепатопротективные	42
- SV40		Гербициды	83
Витамины	43, 50, 103-104, 111, 214	Герпесвирусы	66
Внутриклеточные паразиты	74, 196	Гетерокариоз	30, 37
Вода для инъекций	178	Гиалуронидаза	77
- очищенная		Гиардиоз	74-75
- питьевая		Гибберелины	41
Водород	96-97, 119, 207, 214	Гибридомы	160-161
- концентрация ионов (pH)		Гидрокортизон	105, 160
Водорода пероксид (H_2O_2)	117, 124-125, 130, 133, 142-144, 203	Гидролазы	23, 150
Водоросли	15-16	Гипохлорит	63, 71, 124-126, 129, 142-143, 207, 145, 154
Воздух атмосферный	174	Гистамин	
- вентиляционный		Гифоподии	38
- технологический		Гифы	30, 34, 37-38
Воздушная микробиота	169, 174	Гликоген	30, 39
Волоски, ворсинки (см. Пили)	25, 49	Гликозидные связи	21, 86, 116
Волютин	39	Гликозиды	214-215
Воска	22, 117	Гликоконъюгаты	77, 149, 157
Воспаление	145-146, 153, 172, 196	Гликолиз (фруктозо-1,6-бисфосфатный путь; Эмбдена-Мейергофа-Парнаса путь)	105
Время генерации	27	Гликопротеины	66, 70-71, 77, 149
Вторичные метаболиты	83	Глицеролтейхоевая кислота	22
Высшие грибы	31	Глицин	132, 213
Галазон	129	Гломерулонефрит	155
Галогены	125, 129, 142, 144, 206	Глутамин	104
Гаметогамия	34, 36	Глутаминовая кислота	21, 23, 49, 104, 116, 118
Гаметангии	38	Глутаральдегид	125-126, 128
Гаметы	28, 34, 38	Глюканы	30, 38, 117, 161, 166
Гамонты	72-73	Глюкоамилаза	41
		Глюкозоизомераза	41

Глюкоза	22, 49, 180	Деление	15, 18, 25, 27, 33-36, 38, 72-74, 106
- как репрессор		Дендритные клетки	70, 152
- катаболизм		Депонирование	158
- сбраживание		Дерматоз	62, 64
Глюкоамилаза	41	Десферроксамин (десферол)	132
Глюкозидаза	41	Диагностикумы	162
Глюконат (глюконовая кислота)	125, 128	Диамидины	131
Глюкозооксидаза	41	мезо-Диаминопимелиновая кислота	116
Гольджи аппарат	15, 18, 39	Диаминопиримидины	88, 111
гомоталличные	37	Дибазол	162
Гонококки	78, 157, 194	Дигидроптеровая кислота	118-119
Гонорея	147	Дизентерия	62, 73, 75, 78, 169, 196
Гормоны	49, 91, 147, 160-	Дикарион	34, 36-37
	161	Димедрол	155
Грамотрицательные бактерии	16, 20-23, 48, 51, 61, 77, 84-85, 100, 111, 117-118, 121-125, 128-129, 131, 137, 143-144, 169	Диморфные грибы	119
Грамположительные бактерии	17, 21, 51, 119, 124, 144	Дипиколиновая кислота	25
Грибы	11, 15-17, 30-32, 37-40, 43-45, 47-48, 50-51, 57, 69, 76, 89, 105, 119, 124, 129, 137, 143, 152, 166-167, 169, 171, 173, 177-178, 194, 199	Диплококки	18-19, 194
Грибница	30	Дисбактериоз (дисбиоз)	43, 62, 78, 85, 108-109, 168-169, 196
Гризофульвин	41, 43, 88	Дисульфидные	25, 142, 149
Гуанин	118-119	Диспепсия	196
Гуанозин	64	Дифтерийный токсин	77, 147
Гумус	40, 49, 172	Дифтерия	78, 147, 155, 157-158, 160, 172, 197
Дегидроацетовая кислота	133	2,6-Дихлорфенолиндофенол	113
Дегидрогеназы	117	ДНК См. также Репарация ДНК	26, 29
Дегмицид	132	- бактерий	
Дезинфектанты	63, 119, 124-131, 134-137, 142-144, 172, 178, 205-206	ДНК-лигаза	97
- методы их оценки	26, 69, 124-130, 134-137, 144, 176, 200-207, 213	ДНК-содержащие вирусы	59, 66, 96
Дезинфекция	15-16, 25-29, 32-33, 39, 55, 59, 61-71, 92, 95-101, 105-106, 118, 122-123, 136, 142, 150, 158, 194, 199	Доксициклин	75, 85
- ее динамика	64	Домены	149
- промышленная	131	Древесина	40, 51
Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)	131	Дрожжи См. также Кормовые дрожжи; Пекарские дрожжи; Пивные дрожжи	15, 31-35, 40, 43, 45, 95-96, 99-101, 112-113, 119, 158, 161, 166-167, 199
- использование	77	- использование	
Дейтифорин	64	Дыхание См. также Анаэробное дыхание	18, 197
Декалина хлорид	131	Дыхательная цепь См. также Электрон-транспортная цепь	39, 119
Декарбоксилазы	77	Дыхательные пути, микробиота	78, 111, 151-152, 165, 167, 172, 180, 195-196
Декстран (α -1,6-глюкан)	23, 103, 166	Единица действия	112
		Естественные клетки-киллеры	147

Жгутики бактерий	15, 18-19, 24-25,	Иммунные комплексы	155, 158
- - амфитрихальное расположение	32, 38, 47, 72, 74,	Иммуногенность	148-149, 158-159
- - перитрихальное расположение	148, 194, 196	Иммуноглобулины	77, 79, 148-152,
- - прикрепление к мемbrane		- антилимфоцитарные	158-160, 162, 166
- зооспор		- анти-резус	
- эукариотических клеток		- их получение	
Жгутиковые (жгутиконосцы)	74-75	Иммуноглобулины (Ig)	159-160
Желатина	101, 180	- A	
Железо	103-104, 131, 192	- D	
- коррозия		- E	
Железодефицитная анемия	103	- G	
Железохелирующие агенты	104	- M	
Желтуха	54-55, 68, 177	Иммунокомпетентные клетки	76, 151-152, 154,
Жизненный цикл	28, 31-32, 36-38,	- - их взаимодействие	156, 161
	63-64, 71-75, 208-	Иммуномодуляторы	65, 70, 77, 161-
	212		162
Жирные кислоты	18, 22-23, 88, 117,	Иммунопрепараты	63, 70, 101, 157
	119, 145	Инвертаза	41
Жиры и жироподобные вещества	199	Ингибирование конечным про-	1412, 153
См. также Липиды		дуктом	
Запасные вещества	18, 25, 39	Ингибиторы биосинтеза	116-117
Зеараленон	41	- обратной транскриптазы	
Зигомицеты	30	- протеаз	
Зигоспоры	30-31, 34, 36, 38	Индикаторные бактерии	202
Зигофоры	36	Индол	192
Зигота	34, 36-37, 72-73	Индуктор	65-66, 101
Зимозан	161	Индукция фага	33, 62, 100, 158
Зидовудин	64-65	- ферментов	
Зоонозы	78, 194-196	Инсектициды	83, 105-106
Зооспоры	31-32, 38-39	Интеграция	61, 63
		- вируса	
Идиотипы	150, 156, 158	Интегрон	123
Идиотрофы	92	Интерлейкины	95, 152, 161
Идоксиуридин	64	Интерфероны	65, 71, 95, 146,
Изоантителы	148	- индукторы	153, 161
Изониазид	89, 117	Интоксикация	76, 182-183
Изоникотиновая кислота	88-89	Инфекции	11, 25, 43-44, 53-
Изопропанол	125-127, 138		54, 60-68, 70, 74-
Изотипы	150		75, 77-79, 87-89,
Имидазолы	43, 89, 111, 119,		93, 99, 108-111,
	162		119, 128, 131-132,
Иммунитет активный	11, 79, 123, 145,		145, 147-148, 156-
- врожденный	147-148, 150-151,		159-162, 169, 183,
- гуморальный	153-161, 168	Инфекционные заболевания	194-197, 210
- естественный		- - периоды развития	11, 17, 20, 57, 62,
- искусственный		- - формы	76-79, 88, 108-
- клеточный			111, 147-148, 155,
- пассивный			157-161, 168-169,
- приобретенный			173, 178, 183,
Иммунная система	76, 79, 108, 145,	Инфузории	194, 204, 210
	147, 150, 160-162,	Ионизирующая радиация	70, 134, 136, 147,
	165, 168	Итаконовая кислота	199, 202-203, 210
			41

Йод	22, 63, 100, 125, 127, 129-130, 132, 143	Клотримазол	43, 89
Йодонат	126	Клубеньковые бактерии	49
Йодофоры	125, 130, 182, 213	КОЕ (колониеобразующая единица)	57, 137-140, 178-179, 184-185, 189-190
Йодохинол	75	Койевая	41, 104
Калицивирусы	67	Кожная микробиота	166
Калия перманганат	69, 130, 133	Кокки	17-21, 23, 28, 58, 76-78, 84, 86-89, 104-105, 109, 114, 121-122, 142, 146, 148-149, 155, 157-159, 165-167, 169, 171-174, 183, 193-197, 213
Канамицин	86	Колистин	87
Капреомицин	87	Колiformные бактерии	171, 173
Капсид	59, 63, 66-67, 71, 99, 157	Колицины	87
Капсомеры	59, 61, 71	Колларгол	131-132
Капсулы (бактерий)	15-16, 22-23, 28, 39, 52, 76, 147, 180, 187, 194, 196-197	Колониестимулирующие факторы	146, 153, 161
Карантин	69, 180	Колонии бактерий	20, 28, 48, 51-52, 55, 61, 98, 100, 106, 140, 166, 170-171, 186, 189, 190, 192-193, 195, 213
Карбапенемы	85, 117	Комплемент	76-77, 79, 146-
Карбенициллин	83-84	- активация	148, 150, 152-155, 162
Кариес	166	Конидиеносец (конидиофор)	30
Кариогамия	33, 36, 38	Конидии	30-32, 38, 139, 185
Каротиноиды	104	Конкурентное ингибиование	142, 153
Карфециллин	84	Консерванты	125-125, 127-134, 138-140, 144, 182, 186
Каталаза	117	Конститутивные гены	121-122
Катионные пептиды	87, 120	Контаминация микробная	11, 91, 124, 137, 175-176, 179-180, 183, 189-190, 197, 206, 210
Кворума чувство	25, 123	Контроль качества вакцин	112, 157, 159, 204
2-Кето-3-дезокси-6-фосфоглюконатный путь (Энтнер-Ра - Дудорова путь; КДФГ-путь)	22	- - иммуноглобулинов	
Кетоконазол	43, 89, 119	- - лекарственных средств	
Кинетика роста	137	Конъюгация	25, 28-29, 99, 101, 122
Кинины	145-146, 155	Коринебактерии	166-167
Кислотоустойчивые бактерии	124, 167, 197	Кормовые дрожжи	111
Кишечная микробиота	167	Коронавирусы	67
Клавамы	84-85	Кортизон	105, 132, 147, 160
Клавулоновая кислота	121	Корь	67, 155, 157
Классификация организмов	16-17, 20, 23, 26, 30, 127, 134	Костный мозг	150-152, 160
Клеточная стенка	15, 17-19, 21-24, 27, 30-32, 38-39, 54, 61, 77, 101, 106, 116-117, 142-143, 148, 161, 197, 202	Коферменты	40
- - при спорообразовании	18, 25, 27, 33-36, 38	Крахмал	41, 179-180, 182
Клеточное деление	26-28		
- ядро	75, 87, 114, 118		
Клеточный цикл	84		
Клиндамицин	92, 95, 97-100		
Клоксациллин	19, 76, 167, 169, 171-173, 197		
Клонирование			
- молекулярное			
Клостридии			

Ксантаны	23	Лизогенные бактерии	61-62
Ксенобиотики	121, 142	Лизоформ	132, 205
Ксиланаза	41	Лизосомы	18, 24, 30, 39, 147
Ксилоза	101, 192, 195	Лизоцим	23, 59, 61, 76, 79, 101, 145, 167
Культивирование микроорганизмов	22, 46, 56-57, 63, 90-93, 95, 99-100, 105, 107, 124, 139, 144, 158, 166, 172, 175-176, 179, 188, 197	Ликопид	161
Культура ткани	17, 25-27, 32, 43, 45, 47, 56, 61-63, 68-71, 87, 91-94, 99-101, 106-107, 109, 112-114, 123-124, 137-138, 155, 159, 161, 176-177, 185, 190, 192, 198, 202	Лимонная кислота (цитрат)	41, 104, 130
β-Лактамаза	83-85, 105-107, 114, 121-122, 186	Лимфатические узлы	145, 151, 168
β-Лактамы	17, 21-22, 83-85, 105, 117, 122	Лимфоидная ткань	150-151
Лактат (молочная кислота)	133, 166	Лимфоциты	65, 70, 77, 145-146, 148, 150-15156, 158, 160-161
Лактобациллы	167-169	Линкомицины	87-88, 118
Лактоза	28-29, 167, 169, 171, 180, 193	Лиофилизация	198
Лангерганса клетки	152	Липаза	41, 101
Латамоксифен	85, 117	Липид А	22, 77, 124, 143
Лауролина ацетат	131	Липиды	22-25, 38-40, 77, 119-120, 144, 149, 168
Левамизол	162	Липополисахариды	22-23, 76-77, 87, 106, 118, 121, 143, 148, 152
Левомицетин	87, 110-111, 114	Липопротеины	22, 26, 67
Лейкотриены	145	Липосомы	158
Лейкоцидины	77, 147, 196	Литический цикл	61-62
Лейкоциты	77, 87, 145-147, 150, 153, 159-161	Лишайники	40
Лейшманиозы	74-76, 147	Лучистая энергия	134, 199
Лекарственные вещества	11, 23, 40, 42, 91, 105-107, 175-178	Люголя раствор	73, 130, 132
- препараты		Люцифераза	114
- средства (ЛС)		Лямблиоз	74
- сырье		Макролиды	86-87, 110
- формы		Макромолекулы	142
- - их качество		Макрофаги	73, 76-77, 79, 146, 152-155, 158, 161
- - контроль		Малат (яблочная кислота)	49
- - микробиота		Малаярия	72, 75, 79, 111, 155
Лектины	77	Маннаны	31, 161
Лентинан	161	Маннитол	101
Лепра	147	Манноза	152
Лептоспирозы	157	Марборан	64-65
Лигаза	97-98	Матрикс	38, 105
Лиганд-рецепторное взаимодействие	77	Матричные РНК (мРНК)	95-96, 100
Лизин	21, 104, 146	Медиаторы	145, 151, 154-155
Лизогения	61-62	Мезлоциллин	84, 114
		Мезосомы	24, 27, 100
		Мезофильные бактерии	45
		Мейоз (редукционное деление)	18, 33, 38
		Мембранные фильтрация	58, 90, 106, 140, 187-190, 210

Мембранные белки	24	Мимикрирующие антигены	148
- потенциал		Минеральное питание	47
Мембранные См. также Плазматическая мембрана	15-16, 18, 21-26, 32, 39, 54, 59, 63, 70, 72, 74-77, 100-101, 116, 118-122, 124, 129, 142-143, 147-148, 154, 156, 158, 190, 201, 19, 67, 79, 195-196, 23, 109, 155	Миноциклин	85
- проницаемость		Митоз	15-16, 18, 27, 38
Менингит	162	Митомицин С	61
Менингококки	72-73	Митохондрии	15-16, 18, 32, 39, 70
Меркаптопурин	125, 131, 133, 142	Мицелий	20, 30-34, 36-38, 40, 48
Мерозоиты	39, 48-49, 64, 75-76, 93, 103, 106-107, 116, 119, 122, 142, 146, 152, 168	Мицетомы	43-44
Мертиолат	40-41, 83, 92, 107, 118, 142-143	Мишень	65, 75, 97, 110, 116, 121-123, 142-143, 146-147, 152-155, 161
Метаболизм (обмен веществ)		Молоко	16-17, 26, 41, 124, 150
Метаболиты		Молочная кислота См. также Лактат	104, 145, 166-167
- вторичные		Молочнокислые бактерии	43, 103, 167
Метан	128	Мониторинг	203-212
Метанобразующие бактерии	21	Монобактамы	85, 122
Метаногенез	18	Монотрихи	24
Метионин	101, 118	Моноциты	65, 152-153
Метицillin	84, 122	Морская вода	171
Метронидазол	75, 89, 111, 118	Морфология	11, 16-20, 30, 32, 48, 60, 168, 194-195, 197
Мециллинам	83-84	Мурамил-дипептид	158, 161
Миелома	160	Мурамовая кислота	17-18, 21
Микобактерии	21, 23, 48, 50, 76, 86, 88, 111, 113, 117, 128, 144, 166-167, 197	Муреин	17, 21-23, 101, 116, 197
Миколовые кислоты	22, 117, 144	Мутагены	61, 93, 106
Миконазол	43, 89, 119	Мутасинтез	92
Микоплазмы	11, 15-17, 21, 54, 167, 197	Мутасинтон	92
Микориза	40, 45, 47, 50	Мутации (мутанты)	23, 29, 61, 65, 92, 100-102, 106, 110, 122, 150, 157
Микотоксин	47	Мучнистая роса	51, 177-178
Микроаэрофильные бактерии	194	Налидиксовая кислота	89, 111, 122
Микробиологические производства	112	Наружная (внешняя) мембрана	19, 22
- методы		Нейраминидаза	62, 66, 77, 105
- синтез		Нейтрофилы	123, 153
Микробиота воды	19, 43, 78, 99, 108-109, 11, 123-	Некрозы	48, 53, 67-68, 74, 77, 95, 146, 153, 155, 177
- воздуха	124, 144, 165-174,	Неомицин	75, 86
- почвы	176-178, 181-182, 195, 197	Несовершенные грибы (дейтеромицеты, митоспоровые)	30-31, 34, 37
- тела человека		Нестерильные ЛС	58, 91, 131, 138-139, 178-179, 182, 210, 215
Микробная трансформация	105	низшие	15, 30
Микробоносительство	79	Низин	87
Микропококки	18	Никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (НАДФ)	118
Микротрубочки	39		
Микрофибриллы	38		
Микрофиламенты	35, 39		
Микроэлементы	101		

Никотиновая кислота	88, 168	Парааминосалициловая кислота	89
Нистатин	43, 88, 112, 119	Парабены	130
Нитрат	131, 190	Парагаметангия	36
Нитрофuranтион	89, 111, 118	Паразитические бактерии	169
Нитрофураны	89, 111	Парамиксовирусы	66
Новокайн	155	Парвовирусы	66
Нокардицины	85	Пастера эффект	157
Нокситиолин	128	Пастеризация	135
Нормальная микробиота	19, 43, 99, 109, 123, 165-169, 173, 176, 181, 195, 197	Патогенность	11, 17, 76-77, 196-197
Норфлоксацин	89, 111, 114, 118	Патология	182
Нуклеазы	59, 96	Пектиназы	41, 101
Нуклеиновые кислоты ДНК; РНК	55, 59, 67-68, 70, 116, 119, 143, 161-162, 199	Пелликула	72
Нуклеоид	18, 24-25, 62	Пенициллановые кислоты	83, 85
Нуклеокапсид	64, 67	Пенициллиназа	26, 83
Нуклеоплазма	18, 39	Пенициллины	21, 23, 26, 41, 55, 83-85, 94, 101, 105-106, 109-114, 117, 121, 141, 148, 154
Нуклеотиды	119	Пептидогликаны	17-18, 21, 23, 25, 116-117, 123
Обратная транскриптаза	59, 63-65, 71, 95-96	Пептиды биологически активные	160
Окрашивание по Граму	16, 22, 25, 194-195	Периплазматическое пространство	22-24, 122
1-Оксацефемы	85	Перитрихи	24-25, 195, 197
Оксациллин	84, 114	Перитонит	128, 195-196
Оксигенные фототрофные бактерии	20	Пермиссивные клетки	99
Окситетратицилин (террамицин)	85	Пероксид, ион (O_2^{2-})	124-125, 130, 133, 142-144, 203
Оксолин	64	Пероксидаза	117
Оксолиновая кислота	89	Персистенция	79
Олеандомицин	86	Персонал	40, 56-57, 91, 99, 175, 180, 201, 204-205, 207, 209-213
Оливановые кислоты	85	Пивампициллин	84
Онкогены	62-63	Пигменты	31, 51, 193-194, 196
Оогонии	34, 37-38	Пикорнавирусы	67
Оомицеты	30	Пили	15, 25, 28, 61, 77
Ооспоры	38	Пиноцитоз	39
Ооцисты	72-73	Пиоцианин	193, 195
Оперон	25, 65, 106, 123	Пиперациллин	84
Опоясывающий лишай	64, 66	Пиридин-2,6-дикарбоновая кислота см. Дипиколиновая кислота	25
Опухоли растений	48, 51-53, 55, 64, 69, 160, 178	Пириметамин	75, 88
Органические кислоты	40-41, 49, 91, 103-104, 130, 133	Пировиноградная кислота (пируват)	104
Орнитин	104	Пирогенал	77, 161
Ортомиксовирусы	66	Питательные среды	17, 20, 51-52, 55, 58-59, 67, 92-94, 99, 101, 106, 112-114, 119, 138-140, 158-159, 166, 169-170, 172, 175-176, 178, 183, 186-194, 200-202
Оспа	64, 66, 157		
Остеомиелит	78, 196		
Отит	132, 194-196		
Офлоксацин	89, 111		
Пандемия	79		
Пандовир	64		
Паповавирусы	66		

Плазматическая мембрана	15	Производственные помещения	57, 174, 179, 200-201, 204, 211, 213, 215
Плазматические клетки	152, 160		
Плазмиды	15, 26, 61, 69, 76, 95-96, 98-102, 122-123, 144, 158, 200	Прокариоты	15-27, 54, 61, 96, 117, 194
Плазмогамия	33-34, 36	Пролиферация	150-155
Плазмодии	72, 75, 158	Промастиготы	74
Плазмозаменители	103	Промидиевая кислота	111
Плазмокоагулаза	77	Промотор	123
Плазмофорез	155	Промышленная микробиология	40
Пластмассы	204, 214-215	Пропамидин	131
Плеоморфизм	30	Простейшие	11, 15, 39, 48-49, 54, 67, 72, 75-76, 78, 89, 111, 152, 165, 167, 172-173
Плодовые тела	32, 34, 37-38, 40	Протаргол	131-132
Пневмококки	23, 28, 77, 86, 122, 149, 155	Протеолиз	77, 152
Пневмония	28, 44, 108, 168, 183, 196	Протеолитические ферменты	159
Поверхностно-активные вещества	128-129, 140, 162, 188, 190, 199, 205-206	Протионамид	88-89
Повидон-йод	125, 132	Протисты	15
Поксвирусы	15, 65-66	Протоплазма	135-136
Поли-β-гидроксимасляная кислота (полигидроксибутират)	18	Протопласти	23, 100-102
Полиаминосахара	38	Профаги	61-62
Поливинилпирролидон	130, 132	Процессинг	70, 152
Полиены	88, 119	Псевдомонады	48, 50, 128, 130, 206
Полимеры	101, 103, 130-131, 159, 179, 201, 203-206, 214	Психрофильные бактерии	40, 198
Полимиксин	87, 119	Птеридин	118
Полиненасыщенные жирные кислоты	18	Пузырчатка	155
Полиноксилин	128	Пурпурные бактерии	51, 202
Полинуклеотиды	98, 162		
Полипептиды	70, 87, 146, 152	Рабдовирусы	67
Полисомы (полирибосомы)	65	Растения	51-55, 68, 177
Полифосфаты	24, 39		
Половое размножение	26, 28-34, 36-38, 73	Реактивность	43, 145, 154-155
Порины	22, 24, 121	Реверсии (ревертанты)	101, 157-158
Посевной материал	93-94, 158, 175-176	Ревертаза	59
Почкование	32	Ревматизм	196
Правила GMP	11, 91, 183, 202, 206, 208-215	Ревматоидный артрит	156, 168
Преднизолон	105, 161	Редукционное деление см. Мейоз	38
Преднизон	105	Резистентность (см. также Устойчивость)	11, 61-62, 65, 75, 78, 85-87, 108-109, 118, 121-123, 130-131, 137, 142-145, 183, 199-200
Преципитация	162, 195	- генетические основы ее	109, 118, 121-123,
Примахин	75	- механизмы	130-131, 137, 142-
Прионы	70-71, 199	- приобретенная	145, 183, 199-200
Прогуанил	75	- природная	
		Резорцин	127, 132, 142, 202
		Реинфекция	79
		Рекомбинация см. Генетическая рекомбинация	28-29, 37, 76, 92, 98, 157
		Ремантадин	64
		Реовирусы	67
		Репарация ДНК	106
		Реплик метод (метод отпечатков)	186
		Репродуктивные структуры	32, 38

Репродукционное размножение	38	Серия (партия)	56-57, 159, 170, 186, 188, 214
Реснички	72, 75		
Рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы)	96-98	Серобактерии (серные бактерии)	24
Рестрикция	33, 96-97, 156	Серологические реакции	162
Ретровирусы	59, 63-64, 67, 71	Сефадекс (декстрановый гель)	103
Рецепторы См. также Хеморецепторы	23-25, 59, 61-62, 65, 76-77, 123, 146-147, 149-152, 154-156, 160	Сибирская язва	17, 19, 25, 76, 78, 135, 137, 157, 196
Рецидив	73, 79, 109	Сидерофоры	104
Рибавирин	64-65	Сизомицин	86
Рибозилтрансфераза	77	Симбиоз см. также Лишайники - антагонистический	45, 47, 78, 168
Рибосомы	15-16, 18, 24, 39, 55, 59, 63-64, 67-68, 117-118, 122, 142-143, 148-149, 159	Симбиотрофы	40
Рибофлавин	104	Сине-зеленые водоросли см. Цианобактерии	15-16, 193, 195
Ризоиды	30, 36	Синергизм	110
Ризоморфы	38	Системная красная волчанка	155-156
Ризосфера	49-50	Сифилис	78, 194
Риккетсии	16, 21, 55, 78, 87, 196	Скарлатина	78-79, 148, 172, 196
Риккетсиозы	78, 196	Склероции	38
Риск	11, 57, 211-212	Скрининг	93, 100, 107, 123
Рифамицин	86, 118	Слизь	22-23, 49, 52, 174
РНК	15, 18, 26, 35, 55, 59, 62-71, 73, 100, 104, 118, 161	S-слой	22-23
РНК-полимераза ДНК-зависимая	62-63, 67, 118, 122	Сорбиновая кислота	130, 133
РНК-содержащие вирусы	66	Спектрофотометрия	115
Роккал	132	Специфичность антигенов	22-23, 148-149, 158-160
Ронасан	161	Сперматозоидами	34
Ронгалит	128, 133	Спиралицин	86
Рост микроорганизмов	186, 190-191	Спириллы	17-19
Салициловая кислота (салицилат)	88, 130, 132-133	Спирохеты	15, 17-20, 24, 87, 166-167, 173, 194
Сальмазан	161	Спирты	127
Сальмонеллез	78, 171, 196	Спорангеносец (спорангифор)	30-32, 38
Санитарная микробиология	170, 172-174	Спорангии	30-32, 34, 36
Санитарно-показательные микроорганизмы	169-170, 173, 196	Спорангиспоры	30-32, 36
Сапронозы	78	Споровики	72
Сарковые	73-74	Спорогония	72
Сарцины	19, 166	Спорозоиты	72-73
Секция	17, 20-21	Спорообразование - у грибов	25, 171
Селезенка	150-151, 160	Спорообразующие бактерии	21, 50-51, 106, 166, 169, 171, 173-174
Селективные условия	144		
Септицемия	78, 108, 194, 196	Споры грибов	17, 20, 25-26, 30-34, 36-38, 45
Септа	25, 30	прокариот	
Септрин	111	Спорынья	51, 177
Сера	24, 39	Стафилококки	19, 26, 58, 76-78, 87, 89, 109, 121, 142, 157-159, 167, 169, 171-172, 174, 213
Серебра нитрат (ляпис)	131-132	Стволовые клетки	151-153
		Стеригма	30-31

Стерилизация	26, 70-71, 106,	Тиомерсал	125, 131
- контроль	124, 127-128, 130,	Тиф	62, 78, 135, 147,
	135, 144, 179,	Тобрамицин	157, 173, 194, 196
	199-204, 206, 210,	Тогавирусы	86, 114
	212-213	Токсикоинфекция	67
Стерильные ЛС	58, 91, 94, 103-	Токсинемия	78, 182-183, 195-
	106, 139-141, 179,	Токсины	196
	182, 184, 200,		78
	203, 206, 210-211,		
	213, 215		
Стероиды	105, 214	Токсоплазмоз	20, 47, 51, 74, 77-
Стеролы	18, 119	Тонизирующие почки	78, 105-106, 111,
Столбняк	19, 25, 77-78, 158,	Толерантность	114, 123, 145-148,
	160, 197	Трансдукция	150, 152-153,
Столон	30, 36, 38	Транскрипция	158-159, 167, 178,
Сточные воды	134, 136, 172-173,	- обратная	182-183, 194-197
- - очистка	197	Трансляция	73, 75, 78-79, 111
Стрептодорназа	104	Транспептидазы	42
Стрептококки	18-19, 76-77, 86,	Транспозоны (Tn)	156,
	89, 104-105, 109,	Транспорт веществ	28-29, 62, 99, 101,
	142, 146, 148,		122
	155, 165-167, 171-	Транскрипция	64-65, 118, 123
	174	- обратная	
	85, 88, 99	Трансляция	64, 100, 146
Стрептомицеты	94, 111, 114, 117-	Транспептидазы	116
Стрептомицин	118, 122	Транспозоны (Tn)	122-123, 144, 200
Стресс	78, 146-147, 168	Транспорт веществ	23-24, 26, 39, 57,
Сульфамиды см. Сульфонамиды	122		77, 118-119, 121,
Сульфонамиды	88, 111, 119, 122,	Трансфекция	142, 144
	129	Трансформация	99-101
Сульфоны	85		28, 83, 96, 98-101,
Сумчатые грибы см. Аскомицеты	30-33, 36		105, 122, 128Э,
Сферопласты	23, 100-101	Трахома	144, 158
Сферические (кокки)	17-18	Трикарбоновых кислот цикл	132, 196
Таксисы	25	Трипаносомозы	39
Таксономия	16	Трифенилметана производные	74-75
Тактивин	160	Трифторидин	131
Талампициллин	84	Трихогина	64
Таллом (вегетативное тело)	36, 38, 51	Трихомоноз	34, 37-38
Тауролидин	128	тРНК	74-75
Тахизоиты	73	Тромантадин	30, 118
Теброфен	64	Трофозоиты	64
Тейхоевые кислоты	18, 22-23	Туберкулез	72-74
Телеоморфы	34, 38, 44		23, 76, 78-79, 86,
Терапевтический индекс	108		88-89, 113, 124,
Термофильные бактерии	40, 49		135, 137, 147,
Тетрациклины	55, 75, 85, 109-	Туляремия	152, 155, 157,
	111, 115, 118		161, 177, 197
Тиенамицин	85		78-79, 147, 157,
Тикарциллин	84		194
Тиминовые димеры	199	Тучные клетки	153-154
Тимозин	160	Тяжелые металлы	127, 130, 132
Тимолин	160	Углеводороды	26
Тимус	150-151, 160, 176	Ультраструктура	32, 38
		Ультрафиолетовое облучение	63
		Ундулирующая мембрана	74-75

Упаковочный материал	175, 180, 208	Формальдегид	125-126, 128, 132-
Уреаза	77, 114		133, 136, 143-144,
Уроновые кислоты	22, 77		157, 201, 203,
			205, 205
Фаги	17, 25-26, 45, 61-	Фоскарнет	64
	62, 71, 76, 95-100,	Фосфаты см. также Высокоэнергетические фосфаты	22, 97, 116, 143
	152-155	Фосфолипиды	22-24, 77, 117-
Фаговая конверсия	62		119, 143
Фаговар	17	Фосфорилазы	116, 122
Фаготипирование	61	Фосфорилирование см. также	39, 106, 122, 142
Фагоцитоз	23, 39, 62, 73, 76-77, 145-147, 158, 161, 172-173	Окислительное фосфорилирование	
Фактор(ы) роста	106, 144, 146, 166	Фотореактивация	199
- F	28-29	Фотосинтез	15, 18, 49
- R	26, 122	- аноксигенный	
- RTF		- оксигенный	
Фармацевтическая промышленность	51, 91, 127	Фототрофные бактерии	20
- продукция	182, 198, 208,	Фрамицетин	86
-- правила производства	210, 214	Фторхинолоны	111
Фенилкетонурия	106	5-Фторцитозин	43, 89, 118
Фенилртуты соли	131	Фузидиевая кислота	87
Фенилэтанол	127-128	Фузидин	41
Феноксиметилпенициллин	83	Фумаровая кислота	41
Феноксиэтанол	127-128, 133, 142	Фунгициды	51, 198
Фенол	125-127, 137, 142-143, 157	Фуразолидон	89, 111
Фенотип	16, 98, 100, 123	Фурункулы	78, 196
Ферментация	17, 83, 85, 87, 93-94, 193	Халькинол	131
Ферментеры	40, 93-94	Хельпин	64
Ферменты	23-24, 26, 39-41, 49, 77, 83, 96-98, 101, 104-107, 114-116-119, 121-123, 142-143, 146-147, 150, 182, 193-194, 196-198, 202, 214	Хемолитотрофные бактерии	18
Фибринолизин	77	Хемотаксис	146, 153-155
ФИТОПЛАЗМЫ	11, 54-55	Химиотерапевтические препараты	83-89, 106, 109-
Фикоцианин	20	- - механизм действия	111
Филовирусы	67	- - устойчивость к ним	
Фильтрация	58, 90, 106, 186-190, 200	Химиотерапия	11, 64, 105, 108,
- мембранныя	25		110, 112, 162
Фимбрии	45, 50	Хинакрин	75
Филлосфера	50	Хинолина производные	131
Филлоплана	45-56	Хинолоны	89, 111, 118
Фитопатогенные микроорганизмы	24	Хиноны	203
Флагеллин	84	Хитозаны	38
Флуклоксациллин	64	Хитин	30-31, 38
Флюреналь	118-119	Хитиназа	101
Фолаты	122, 168	Хламидии	21, 78, 87, 111,
Фолиевая кислота			196

Хлоргексидин	125-129, 132-133, 142-144, 182, 205, 207, 213	Цитоскелет	39
Хлорноватистая кислота	129	Цитохромы	30
Хлорокрезол	125, 131	Четвертичные соединения аммония	129
Хлороксиленол	125-126	Чистые культуры	17
Хлоропластины	15, 18	Чувство кворума	123
Хлорофилл	30, 47	Чума	77-78, 135, 148, 157, 196
Хлороформ	70, 130, 138	Шизогония	72-74
Хлорохин	75	Шизонты	72-73
Хлортетрациклин	85	Шизофиллан	161
Хлорхинальдол	131	Штамм	17, 22-23, 28, 47, 52, 61, 65, 67, 76, 85-89, 92-93, 96, 99, 101-114, 118, 121-123, 131, 138-140, 144, 157-158, 160, 162, 168, 182-183, 185-186, 190, 195, 198-200, 206
Холера	77, 135, 147, 157-158, 173, 196	Эфир	63, 83-84, 86, 88, 103, 130, 201, 214
Холестерол	119	Экзоцитоз	18
Холецистит	78	Эволюция	17, 33-34, 40, 65, 147
Хроматография	90, 94, 160-161	Экзополисахариды	144
Хромосомы	15, 18, 26-29, 34, 37-39, 61-63, 66, 76, 96, 118, 122-123	Экзотоксины	77, 158, 183, 194, 196-197
Целлюлоза	30-31, 190, 193, 201	Экология микроорганизмов	165
Центриоли	38	Эконазол	43, 89
Цетилпиридиний хлорид	129, 205	Элементарная мембрана	54
Цетримид	125-126, 129	Эндокардит	109, 155, 194
Цефалоспорины	41, 84-85, 105-106, 117, 122	Эндоплазматический ретикулум	18, 39
Цефалотин	114	Эндоспоры	16, 18, 47-48
Цианобактерии (сине-зеленые водоросли)	15-16, 40, 173, 193, 195	Эндотоксин	77, 146, 194, 196-197
Цидипол	132	Эндоцитоз	18
Цикл клеточный	26-28, 31-34, 36-39, 71, 73-75, 123	Энтерит	67, 195
Циклический АМФ (аденозин-3¢,5¢-фосфат; цАМР)	77	Энтеробактерии	46, 86, 89, 165, 179, 184, 187-188, 191-192, 196
Циклоспорин	41, 161	Энтеротоксины	195
Циклофосфан	162	Эозинофилы	153
Цимизоль	132	Эпидемиология	79,
Циминаль	132	Эпимастиготы	74-75
Циноксацин	89, 111	Эписомы	26
Ципрофлоксацин	89, 111	Эпитоп см. Антигенная детермина	148-149, 154, 156
Цистит	194-196	нанта	
Цисты	48, 72-76, 173, 198	Эпифитная микробиота	177-178
Цитарабин	64	Эритроцит	15, 27, 72-73, 77, 148-149, 151, 158-160, 166
Цитокинез	27, 35, 38		
Цитокины	145-146, 151-154, 160-161		
Цитоплазма	15-16, 18, 23-24, 26-27, 30, 32, 39, 64, 68, 74, 100-101, 116, 118-119, 142-143, 148		

Эргоалкалоиды	41	Эукариоты	15-18, 24, 28, 32-
Эргостерол	119		33, 39, 47, 72, 95,
Этакридина лактат	133		119, 123
Этилена диоксид	143	Эффекторы	152-153
Этиловый спирт (этанол)	70, 125-127, 157, 205, 207, 211, 213-214	Эхинокандины	88, 117
Этионамид	88-89	Ядерная мембрана	15-16, 26, 39
Этоний	132	Ядро см. Клеточное ядро - бактериальной клетки	15-16, 18, 20, 26-26, 30, 32, 34,
Эубиотики (пробиотики)	168-169, 183	см. Нуклеоид	36-39, 54, 72-75
		Ядрышко	15, 39, 174

УКАЗАТЕЛЬ ЛАТИНСКИХ НАЗВАНИЙ

<i>Acholeplasma</i>	21	<i>- licheniformis</i>	169
<i>Acinetobacter</i>	114	<i>- megatherium</i>	49, 177
<i>Acremonium chrysogenum</i>	84	<i>- polymyxa</i>	196
<i>Actinomyces</i>	111, 165	<i>- pumilus</i>	26, 203
- <i>bovis</i>	197	<i>- stearothermophilus</i>	26, 99, 199, 202-
<i>Actinoplanes</i>	20	- <i>subtilis</i>	203
<i>Aeromonas</i>	177		26, 49, 87, 96,
<i>Agaricus blazei</i>	42		99, 104, 106,
<i>A. bisporus</i>	42		143, 161, 169,
<i>Agrobacterium</i>	47-48, 50, 55,		174, 185, 196,
- <i>tumefaciens</i>	177		199, 203
- <i>tumoralis</i>	50, 177	- <i>thuringiensis</i>	105-106
<i>Ajellomyces capsulates</i>	44	<i>Bacterium</i>	51
<i>Alcaligenes</i>	24	<i>Balantidium coli</i>	72, 75
- <i>faecalis</i>	24	<i>Basidiomycetes</i>	31, 44
<i>Alternaria</i>	46, 48	<i>Bifidobacterium</i>	
<i>Amoeba</i>	73	- <i>infantis</i>	169
<i>Apicomplexa</i>	72	<i>Bordetella pertussis</i>	158
<i>Armillariella mellea</i>	42	<i>Borrelia recurrentis</i>	194
<i>Arthroderma</i>	44	<i>Botritis cinerea</i>	177
<i>Ascomycetes</i>	30-31, 44	<i>Campylobacter</i>	20, 194
<i>Aspergillus</i>	30, 41, 43-44,	<i>Candida albicans</i>	43-44, 118, 124,
- <i>candidus</i> ,	47-48, 88, 139,		137, 139, 143,
- <i>chevalieri</i> ,	143, 174, 178,		183-185, 193-194
- <i>fumigatus</i>	181, 185	- <i>brumptii</i>	41
- <i>nidulans</i>	46	- <i>cloacea</i>	41
- <i>niger</i>	46	- <i>hydrocarbofumarica</i>	41
- <i>ochraceus</i>	44, 46	- <i>lipolytica</i>	41
- <i>oryzae</i>	88	<i>Cephalosporium acremonium</i>	41, 84
- <i>rugulosus</i>	104, 107, 124-	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	111
- <i>terreus</i>	125, 185	- <i>trachomatis</i>	111
<i>Aureobasidium pullulans</i>	41, 46, 161	<i>Chromatium</i>	25
<i>Babesia</i>	73	<i>Chytridiomycetes</i>	31
<i>Bacillus</i>	21, 46-48, 51,	<i>Ciliophora</i>	72
- <i>anthracis</i>	53, 98, 143, 157,	<i>Citrobacter</i>	21, 167
- <i>brevis</i>	181, 183	<i>Cladosporium</i>	43, 46-47, 177
- <i>cereus</i>	17, 19, 111	<i>Claviceps purpurea</i>	41, 51, 177
	99, 104, 196	<i>Clostridium botulinum</i>	174
	46, 173, 177,	- <i>butyricum</i>	104
	183, 185	- <i>histolyticum</i>	89
		- <i>perfringens</i>	46, 49, 77, 109,
			167, 171-174,
			177, 183, 199
		- <i>sporogenes</i>	167, 171, 173-
			174

<i>- tetani</i>	49, 182, 199	<i>Helicobacter</i>	194
<i>Coccidioides immitis</i>	40, 44	<i>- pylori</i>	167
<i>Cryptococcus laurentii</i>	46	<i>Histoplasma capsulatum</i>	44
<i>- neoformans</i>	44	<i>HTLV</i>	67, 126
<i>Cryptosporidium</i>	73	<i>Klebsiella</i>	
<i>Deuteromycetes</i>	44		21, 50, 88, 121,
<i>Dientamoeba fragilis</i>	75		143, 158, 167,
<i>Drechslera</i>	48		169, 183, 195
<i>Entamoeba coli</i>	167		196
<i>- histolytica</i>	72, 75	<i>- ozaenae</i>	
<i>Enterobacter</i>	21, 50, 105, 143,	<i>- pneumoniae</i>	159, 182, 196
	167, 182-183,	<i>- rhinoscleromatis</i>	196
	195		
	105	<i>Lactobacillus</i>	21, 104, 165-166,
<i>Enterococcus</i>	114, 137, 165,	<i>- acidophilus</i>	169
	169, 173	<i>Lactococcus</i>	87
<i>- faecalis</i>	167, 173-174	<i>- lactis</i>	87
<i>- faecium</i>	137, 167	<i>Lamblia intestinalis</i>	72, 74
<i>Entomophthora</i>	44	<i>Legionella</i>	86, 178
<i>Epidermophyton</i>	44, 166	<i>- pneumophila</i>	86, 178
<i>Erwinia amylovora</i>	53, 178	<i>Leishmania</i>	74
<i>- carotovora</i>	48, 50, 105, 177	<i>- brasiliensis</i>	74
<i>Erysiphe graminis</i>	177	<i>- donovani</i>	72, 74
<i>Escherichia</i>	21, 143-144	<i>- mexicana</i>	74
<i>- coli</i>	17, 19, 96, 104,	<i>- tropica</i>	74
	111, 116, 137,	<i>Lentinula edodes</i>	42
	139, 143-144,	<i>Lenzites betulina</i>	42
	167, 169, 179,	<i>Leptospira</i>	
	184-185, 195	<i>- interrogans</i>	20, 167, 173
<i>Epulopiscium</i>	15	<i>Leuconostoc</i>	194
		<i>- dextranicum</i>	103
		<i>- mesenteroides</i>	23, 103
		<i>Listeria</i>	23, 103
<i>Flavobacterium</i>	173	<i>Lobosea</i>	21
<i>Flammulina velutipes</i>	42		
<i>Fomes fomentarius</i>	42	<i>Malassezia</i>	73
<i>Fomitopsis pinicola</i>	42	<i>- furfur</i>	44
<i>Francisella</i>	20	<i>Micrococcus</i>	44
<i>Fungi</i>	30		18-19, 21, 173-
<i>Fusarium</i>	41, 43, 46, 48,	<i>Microsporum</i>	174, 199
	178	<i>Mollicutes</i>	44, 166
	177	<i>Moraxella</i>	21
<i>- oxysporum</i>	41, 87	<i>Mucor</i>	20
<i>Fusidium coccineum</i>			30, 36, 41, 43-44,
<i>Fusobacterium</i>	166		46-47, 174
		<i>- racemosus</i>	46
		<i>- strictus</i>	46
<i>G. applanatum</i>	42	<i>Mycobacterium</i>	21, 87, 124, 137,
<i>Giardia lamblia (Lamblia intestinalis)</i>	72, 74		143, 157, 165,
<i>Glossina</i>	75		173
<i>Grifola frondosa</i>	42	<i>- bovis</i>	21
<i>Gymnosporangium</i>	177	<i>- tuberculosis</i>	21, 124-125, 143,
<i>Haemophilus</i>	21, 114, 165	<i>Mycoplasma</i>	157, 197
<i>- influenzae</i>	86, 88, 96, 109,	<i>- hominis</i>	17, 21, 167, 197
	111, 122, 157-	<i>- pneumoniae</i>	17, 197
	158, 196		17, 197

<i>Mycota</i>	30	<i>Pseudomonas</i>	19, 25, 46-48, 50-53, 83-84, 88, 98, 104, 109, 111, 114, 119, 121, 124, 127-130, 137, 139, 143-144, 161, 173, 177-179, 181-185, 193-194
<i>Naegleria fowleri</i>	74		46, 83-84, 88, 104, 109, 121, 124, 128-129, 137-140, 143-144, 161, 178-179, 182, 184-187, 193, 195
<i>Nanochlorum</i>	15		48, 50, 53, 177
<i>Neisseria</i>	19-20, 88, 121, 157, 165		51
- <i>meningitidis</i>	88, 157		37
<i>Nocardia</i>	20-21, 85, 111		44
<i>Oscillatoria</i>	15		44
<i>Olpidium brassicae</i>	177		36, 41, 46-47, 104-105
<i>Oomycetes</i>	44		43, 46, 161
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	40, 44		161
<i>Pasteurella</i>	21		21
<i>Penicillium</i>	30, 41, 43-44, 48, 83, 88, 143, 174, 178, 181		21
- <i>chrysogenum</i>	41, 83		193
- <i>griseofulvum</i>	41, 88		194
- <i>notatum</i>	41, 83		195
- <i>purpurogenum</i>	41		196
- <i>raciborskii</i>	46		197
- <i>steckii</i>	46		198
<i>Phialophora</i>	44		199
<i>Phlebotomus</i>	74		200
<i>Phoma</i>	48		201
<i>Phytium debarianum</i>	177		202
<i>Phytophthora infestans</i>	177		203
<i>Pichia membranaefaciens</i>	41		204
<i>Pityrosporum</i>	44, 166		205
<i>Planococcus</i>	21		206
<i>Plasmodiophora brassicae</i>	177		207
<i>Plasmodium</i>	72		208
- <i>falciparum</i>	72-73		209
- <i>malariae</i>	72-73		210
- <i>ovale</i>	72-73		211
- <i>vivax</i>	72-73		212
<i>Plasmopara viticola</i>	177		213
<i>Pleurotus ostreatus</i>	42		214
<i>Pneumocystis carinii</i>	44, 117		215
<i>Propionibacterium acnes</i>	165		216
<i>Proteus</i>	19, 21, 25, 88, 111, 114, 121, 137, 143, 158, 168-169, 173, 177, 181, 195		217
- <i>mirabilis</i>	19, 88, 111, 114, 137-138, 143		218
<i>Protozoa</i>	72		219
<i>Providencia</i>	195		220
<i>Pseudococcus</i>	21		221
		<i>- aeruginosa</i>	222
		<i>- syringae</i>	223
		<i>Puccinia graminias</i>	224
		<i>Pyronema omphaloides</i>	225
		<i>Rhinosporidium</i>	226
		<i>Rhizopus</i>	227
		- <i>delemar</i>	228
		<i>Rhodotorula</i>	229
		- <i>rubra</i>	230
		<i>Rickettsia</i>	231
		<i>Saccharomyces</i>	232
			233
			234
		<i>- boulardii</i>	235
		<i>- cerevisiae</i>	236
		<i>Salmonella</i>	237
			238
			239
		<i>- typhi</i>	240
		<i>Sarcina</i>	241
			242
		<i>Sarcocystis</i>	243
		<i>Sarcomastigophora</i>	244
		<i>Sclerotinia</i>	245
		<i>Serratia</i>	246
			247
		<i>- marcescens</i>	248
		<i>Shigella</i>	249
		- <i>dysenteriae</i>	250
		<i>Spirillaceae</i>	251
		<i>Spirillum</i>	252
		- <i>minor</i>	253

- <i>volutans</i>	24	<i>Streptoverticillium</i>	20
<i>Spirochaetales</i>	20	<i>Synchytrium endobioticum</i>	177
<i>Spirosomonaceae</i>	20	- <i>taraxaci</i>	177
<i>Spirulina maxima</i>	20		
<i>Sordaria</i>	30	<i>Thermoactinomyces</i>	25
<i>Sporomusa</i>	25	<i>Thiospirillum</i>	25
<i>Sporosarcina</i>	21, 25	<i>Thiomargarita</i>	15
<i>Sporozoa</i>	72	<i>Toxoplasma gondii</i>	73
<i>Staphylococcus</i>	19, 21, 86, 88, 109, 114, 121- 122, 137, 139, 143-144, 158, 165-166, 178- 179, 183-185, 193	<i>Trametes versicolor</i>	42
- <i>aureus</i>	19, 84, 86, 88, 109, 114, 121- 122, 137-140, 143-144, 165- 166, 178-179, 183-187, 193, 195	<i>Tremella fuciformis</i>	42
- <i>epidermidis</i>	165-166, 185, 195	<i>T. mesenterica</i>	42
- <i>haemolyticus</i>	196	<i>Treponema</i>	165, 167, 194
- <i>pilosus</i>	104	<i>Triatoma</i>	75
- <i>saprophyticus</i>	166	<i>Trichoderma</i>	41, 46
<i>Streptococcus</i>	19, 21, 111, 114, 122, 143, 157- 158, 165, 169	- <i>polysporum</i>	41
- <i>faecium</i>	137, 167, 169	- <i>roseum</i>	41
- <i>pneumoniae</i>	157, 165	<i>Trichomonas</i>	72, 74, 89, 167
- <i>pyogenes</i>	167	- <i>vaginalis</i>	72, 74, 89
<i>Streptomyces</i>	20, 47-48, 55, 84-86, 98, 104, 173-174	<i>Trichosporon</i>	43
- <i>antibioticus</i>	86	<i>Trypanosoma</i>	72, 74
- <i>aureofaciens</i>	85	- <i>brucei</i>	75
- <i>clavuligerus</i>	84	- <i>cruzi</i>	75
- <i>erythreus</i>	86		
- <i>lincolniensis</i>	87	<i>Urocystis occulta</i>	177
- <i>olivaceus</i>	85, 104	<i>Ustilago maidis</i>	177
- <i>rimosus</i>	85	- <i>tritici</i>	177
- <i>venezuelae</i>	87		
		<i>Venturia</i>	177
		<i>Verticillium</i>	48, 51, 177
		<i>Vibrio</i>	21, 24-25, 105
		- <i>cholerae</i>	24, 196
		<i>Xanthomonas</i>	23, 48, 50-51, 53, 111, 177, 181
		- <i>beticola</i>	177
		- <i>campestris</i>	23
		- <i>vesicatoria</i>	177
		<i>Yersinia</i>	21, 198
		- <i>enterocolitica</i>	196
		- <i>pestis</i>	196
		- <i>pseudotuberculosis</i>	196
		<i>Zygomycetes</i>	30-31, 44

Для заметок

Для заметок

Для заметок

Для заметок

Самые актуальные новости из мира медицины и натуропатии, актуальная информация об антигомотоксических и микробиологических лекарственных препаратах и натуральной косметике - на сайте

www.arnebia.ru

ARNEBIA



В.А. Галынкин, В.И. Кочеровец, А.Э. Габидова

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Авторы книги:



Галынкин Валерий Абрамович. Доктор технических наук, проф. кафедры технологии микробиологического синтеза ФГУ Технологического института СПб, зам. исполнительного директора ООО «РОСБИО». Автор 320 печатных работ, в том числе 18 монографий и 6 учебных пособий, 58 патентов.



Кочеровец Владимир Иванович. Доктор медицинских наук, профессор. В настоящее время профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России. Председатель секции «Медицинская и фармацевтическая микробиология» МО Всероссийского научно-практического общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. Эксперт специальной комиссии по медицинским и аграрным наукам ВАК РФ. Член специализированных диссертационных советов при Московском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского и Первом МГМУ им. И.М. Сеченова. С 1995 г. член Американской ассоциации микробиологов. Автор 300 печатных трудов по вопросам медицинской, военной, фармацевтической микробиологии и фармакологии в т.ч. более 10 монографий, справочников и руководств.



Габидова Альфия Эркиновна. Кандидат фармацевтических наук. Член Фармакопейного совета Минздрава России, зам. председателя Технического комитета по стандартизации — ТК458 «Разработка, производство и контроль качества лекарственных средств». До 2013 г. работала директором Центра внедрения инновационных медицинских и фармацевтических технологий ГОУ ВПО «Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. В настоящее время заместитель генерального директора по науке и регуляторным вопросам ООО «Нанолек». Автор 57 печатных работ, в том числе 2 монографий.

ISBN 978-5-9244-0082-2



9 785924 400822