

# Содержание

Редакторы и коллектив авторов.....	3
Благодарность.....	9
Список сокращений.....	10
<b>ОБЩАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>17</b>
Глава 1. Формы адаптации бактерий к условиям внешней среды.....	19
1.1. Роль системы регуляции «кворум сенсинг» и биопленок в патогенезе инфекционных болезней <i>Т.С.Ильина, Ю.М.Романова</i> .....	19
1.2. L-формы бактерий <i>И.В.Раковская</i> .....	34
1.3. Некультивируемые формы бактерий: феномен и способы их выявления в объектах окружающей среды <i>Ю.М.Романова</i> .....	37
<b>СПЕЦИАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>47</b>
<b>Грамположительные бактерии</b>	
Глава 2. Стафилококки.....	49
2.1. Золотистый стафилококк <i>Staphylococcus aureus</i> – возбудитель гнойно-септических инфекций <i>В.А. Бехало</i> .....	49
2.2. Стафилококковые энтеротоксины <i>Ф.С. Флуер</i> .....	74
2.3. Токсин синдрома токсического шока <i>Ф.С. Флуер</i> .....	92
Глава 3. Стрептококки.....	99
3.1. Пиогенный стрептококк <i>Streptococcus pyogenes</i> – возбудитель острых и хронических гнойно-воспалительных заболеваний и причина ряда иммунопатологических состояний <i>Е.Г. Волина, А.С. Лабинская, А.С. Ещина</i> .....	99
3.2. Пневмококк <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Н.Н. Костюкова</i> .....	156
Глава 4. Коринебактерии. Возбудитель дифтерии <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Н.Н. Костюкова</i> .....	175
Глава 5. Листерии. Возбудитель листериоза человека <i>Listeria monocytogenes</i> <i>И.С. Тартаковский, Л.В. Родина, В.В. Малеев</i> .....	196
Глава 6. Возбудитель эризипелоида человека <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> <i>М.А. Сидоров</i> .....	227
Глава 7. Микобактерии – возбудители туберкулеза <i>В.А. Пузанов, С.А. Попов, В.Ю. Мишин, М.А. Владимирский</i> .....	234
Глава 8. Возбудитель лепры <i>Mycobacterium leprae</i> <i>А.А. Ющенко, Н.Г. Урляпова</i> .....	270
Глава 9. Возбудитель столбняка <i>Clostridium tetani</i> <i>Т.И. Сергеева, Ю.Ф. Белый</i> .....	294

Глава 10. Клостридии — возбудители газовой гангрены <i>Т.И. Сергеева, Ю.Ф. Белый</i> .....	310
Глава 11. Возбудитель ботулизма <i>Clostridium botulinum</i> <i>Ю.В. Вертнев</i> .....	330
Глава 12. Возбудитель сибирской язвы <i>Bacillus anthracis</i> <i>Н.П. Буравцева, Е.И. Еременко, О.Н. Цыганкова</i> .....	374
<b>Грамотрицательные бактерии</b>	
Глава 13. Патогенные нейссерии — возбудители гонореи и менингококковой инфекции	
13.1. Гонококк <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Н.Н. Костюкова, В.А. Бехало</i> .....	407
13.2. Менингококк <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Н.Н. Костюкова</i> .....	421
Глава 14. Диареегенные (энтеропатогенные) <i>Escherichia coli</i> <i>В.М. Бондаренко, А.П. Батура</i> .....	446
Глава 15. Сальмонеллы — возбудители брюшного тифа и пищевой токсикоинфекции <i>В.М. Бондаренко, А.П. Батура</i> .....	461
Глава 16. Шигеллы — возбудители бактериальной дизентерии <i>В.М. Бондаренко, А.П. Батура</i> .....	477
Глава 17. Иерсинии — возбудители псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза <i>Г.В. Ющенко</i> .....	493
Глава 18. Возбудитель чумы <i>Yersinia pestis</i> <i>Ю.С. Королев</i> .....	521
Глава 19. Возбудитель холеры <i>Vibrio cholerae</i> <i>Ю.М. Ломов, В.Н. Савельев, Л.С. Подосинникова</i> .....	549
Глава 20. Хеликобактеры. Возбудитель хеликобактериоза человека <i>Helicobacter pylori</i> <i>В.Г. Жуховицкий</i> .....	583
Глава 21. Кампилобактеры — возбудители кампилобактериозов человека <i>Н.З. Минаева, К.И. Чекалина, В.И. Минаев</i> .....	622
Глава 22. Бордетеллы — возбудители коклюша <i>И.К. Мазурова, О.Ю. Борисова, М.С. Петрова</i> .....	645
Глава 23. Бактерии рода <i>Haemophilus</i> .....	669
23.1. <i>Haemophilus influenzae</i> <i>И.М. Грубер, Л.К. Катосова</i> .....	670
23.2. Возбудитель мягкого шанкра <i>Haemophilus ducreyi</i> <i>Н.Н. Костюкова, В.А. Аковбян</i> .....	688
Глава 24. Бруцеллы — возбудители бруцеллеза <i>Г.И. Лямкин, Л.В. Ляпустина, Р.Е. Цыганкова</i> .....	696
Глава 25. Возбудитель туляремии <i>Francisella tularensis</i> <i>И.С. Мещерякова</i> .....	728
Глава 26. Буркхолдерии — возбудители сапа и мелиоидоза	
<i>В.И. Илюхин, В.В. Алексеев, Ю.С. Королев</i> .....	755
26.1. Возбудитель сапа <i>Burkholderia mallei</i> .....	755
26.2. Возбудитель мелиоидоза <i>Burkholderia pseudomallei</i> .....	769
Глава 27. Спирихеты	
<i>Ю.В. Ананьина</i> .....	788
27.1. <i>Treponema pallidum</i> — возбудитель сифилиса <i>В.Г. Нестеренко, В.А. Аковбян</i> .....	790

27.2. Лептоспирсы — возбудители лептоспирозов человека <i>Ю.В. Ананьина</i> .....	821
27.3. Боррелии — возбудители клещевых боррелиозов и эпидемического возвратного тифа <i>Э.И. Коренберг, В.В. Нефедова</i> .....	844
Глава 28. Хламидии — возбудители хламидиозов человека .....	867
28.1. Таксономия и биологические свойства хламидий <i>Н.А. Зигангирова, В.Р. Мартынова</i> .....	868
28.2. Болезни человека, вызываемые хламидиями — трахома, урогенитальный хламидиоз, венерическая гранулема, пневмохламидиоз, пситтакоз (орнитоз) <i>М.А. Гомберг, В.В. Малеев</i> .....	876
28.3. Лабораторная диагностика <i>Н.И. Колкова, Е.Д. Федина</i> .....	883
Глава 29. Легионеллы. <i>Legionella pneumophila</i> — возбудитель легионеллеза человека <i>И.С. Тартаковский</i> .....	896
Глава 30. Представители порядка Rickettsiales — риккетсии, ориенции. Коксиеллы. Анаплазмы. Бартоanelлы .....	911
30.1. Семейство Rickettsiaceae <i>Н.В. Рудаков</i> .....	913
30.2. <i>Coxiella burnetii</i> — возбудитель коксиеллеза <i>Н.В. Рудаков</i> .....	930
30.3. Иммуниет, эпидемиология, лабораторная диагностика, лечение и профилактика риккетсиозов, лихорадки цуцугамуши и коксиеллеза <i>Н.В. Рудаков</i> .....	931
30.4. Возбудители анаплазмозов человека <i>Н.В. Рудаков</i> .....	940
30.5. Бартоanelлы — возбудители бартоanelлезов человека <i>Л.П. Блинкова</i> .....	953
Глава 31. Микоплазмы — возбудители микоплазменных инфекций человека <i>И.В. Раковская</i> .....	964
<b>Методы выделения и идентификации бактерий — возбудителей инфекционных заболеваний</b> .....	994
Глава 32. Тесты, реактивы, питательные среды для культивирования и идентификации патогенных бактерий .....	994
32.1. Тесты и реактивы для идентификации бактерий <i>А.С. Лабинская</i> .....	994
32.2. Диагностические питательные среды и реагенты к ним <i>А.С. Лабинская, Н.Н. Костюкова</i> .....	1014
<b>Словарь терминов</b> .....	1130
<b>Предметный указатель</b> .....	1132

## Благодарность

Авторы выражают искреннюю благодарность всем специалистам, оказавшим нам бескорыстную квалифицированную помощь при подготовке к изданию второй части этого Руководства.

Понимание того, что мы оказались единомышленниками в стремлении создать полезную книгу на современном научно-методическом уровне, делало наши встречи творчески наполненными и запоминающимися благодаря общению с высокопрофессиональными исследователями, каждый из которых – интересная, яркая личность.

Благодарим члена-корреспондента РАМН профессора Николая Ивановича Брико за сведения по заболеваемости стрептококковыми инфекциями; доктора химических наук профессора Татьяну Вадимовну Петелину за постоянную помощь и консультации по вопросам химии; кандидата биологических наук Наталью Федоровну Дмитриеву за представленные материалы; кандидата биологических наук Владимира Андреевича Бехало за методическую и техническую помощь.

Светлая память И.Г. Костюкову, до последних дней своей жизни оказывавшему нам неоценимую техническую и организационную помощь.

Благодарим также родственников – Е.Ю. Лабинскую и Е.А. Мартынюка за вспомогательный труд, необходимый для завершения работы, и за психологическую поддержку.

*А.С. Лабинская*

## Список сокращений

АГ – антиген	ГНТ – гиперчувствительность немедленного типа
АГВ-агар – агар Гевинталя–Ведьминой и Гридневой	Г–П – тельца Гельбершtedтера–Провачека
АДС-м – адсорбированная дифтерийно-столбнячная вакцина с уменьшенным содержанием анатоксинов	Г+Ц – процентное содержание гуанина и цитозина в нуклеотиде ДНК
АДФ – аденозиндифосфат	ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
АИ – автоиндукторы, сигнальные молекулы в системе регуляции «кворум сенсинг»	ГЭ – гастроэнтерит
АИП – автоиндукторы-пептиды	Д – дальтон
АКБ – аргасовый клещевой боррелиоз	ДАКП – диффузно-адгезирующие кишечные палочки
АКДС – адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина	ДВС-синдром – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови
АПБ – антибактериальные препараты	ДДМ – диско-диффузионный метод
АС – анатоксин столбнячный	ДДС – диаминодифенилсульфон, дапсон
АСЛО – антистрептолизин О	ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
АТ – антитело	ДНКаза – фермент, разрушающий ДНК
БЛНАР-штаммы – бета-лактамазонегативные ампициллинорезистентные штаммы	ДОФА – диоксифенилаланин
БМ – ботулизм младенцев	ДРТ – диагностический рабочий титр
БНМ – белки наружной мембраны	ДФС – двухфазная среда
БСА – бычий сывороточный альбумин	ЕД – единица действия
БТ – бактерицидный тест	ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
БЦЖ (BCG) – бацилла Кальметта–Герена (Calmette–Guerin)	ЖМАС – жидкая минимальная селективная среда с антибиотиками
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека	ЖСА – желточно-солевой агар
в/п – внутриперитонеально	ЖЭКА – железоэритритный кровяной агар
ВИЭФ – встречный иммуноэлектрофорез	ИБ – иммуноблоттинг
ВОЗ – Всемирная Организация здравоохранения	ИД – инфицирующая доза
ВФС – временная фармакопейная статья	ИД <sub>50</sub> – инфекционная доза, поражающая половину подопытных животных
Г – гуанин	ИДЧЛ – иммуноглобулины диагностические чумные люминесцирующие
ГВЗ – гнойно-воспалительное заболевание	ИК – иммунные комплексы
ГЕ – гемагглютинирующая единица	ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа	ИППП – инфекции, передающиеся половым путем
ГКГС – главный комплекс гистосовместимости	ИТШ – инфекционно-токсический шок
	ИФА – иммуноферментный анализ

- КА — кровяной агар  
КБ — клещевой боррелиоз  
кД — килодальтон  
КоА — коагутинация, то же, что РК  
КОЕ — колониеобразующая единица  
КПП — конъюгативно-подобная передача  
КУА — казеиново-угольный агар  
КУМ — кислотоустойчивые микобактерии  
ЛА — латекс-агглютинация  
ЛД<sub>50</sub> (то же, что DL<sub>50</sub>) — доза, убивающая половину подопытных животных  
ЛОС — липолигосахарид  
ЛПС — липополисахарид клеточной стенки бактерий  
ЛСМ — лазерный сканирующий микроскоп  
ЛТК — липотейхоевая кислота  
ЛХЭД — липосомальный холерный энтеротоксический диагностикум  
МАМ — митоген *Mycoplasma arthritidis*  
МАТ — моноклональные антитела  
МБ — микобактерии  
МБК — минимальная бактерицидная концентрация  
МБТ — микобактерии туберкулеза  
МД — мегадальтон  
МДК — минимальная допустимая концентрация  
МЕ — международная единица  
МИК — минимальная ингибирующая концентрация, то же, что МПК  
м.к. — микробные клетки  
МКБ — Международная классификация болезней  
МПА — мясопептонный агар  
МПБ — мясопептонный бульон  
МПГА — мясопептонно-глицериновый агар  
МПГБ — мясопептонно-глицериновый бульон  
МПЖ — мясопептонный желатин  
МПК — минимальная подавляющая концентрация, то же, что МИК  
МФА — метод флуоресцирующих антител  
НАД — никотинамиддениндинуклеотид, то же, что фактор V  
НАДФ — никотинамиддениндинуклеотид-фосфат  
НД — нормативная документация  
НИИЭГ — Научно-исследовательский институт эпидемиологии и гигиены  
НИПЧИ — Научно-исследовательский противочумный институт  
НИИЭМ — Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии  
НКС — нормальная кроличья сыворотка  
НРИФ — непрямая реакция иммунофлуоресценции, то же, что РНИФ  
НС — некультивируемое состояние (бактерий)  
НТМБ — нетуберкулезные микобактерии  
НФ — некротизирующий фасциит  
ОБК — отдел биологического контроля  
ОДК — орнитиндекарбоксилаза  
ОКА-сыворотка — поливалентная иммунная сыворотка, содержащая антитела к O- и K-антигенам *Escherichia coli*  
ОКИ — острые кишечные инфекции  
ООИ — особо опасные инфекции  
ОП — оптическая плотность  
ОПН — острая почечная недостаточность  
ОППН — острая почечно-печеночная недостаточность  
ОРЛ — острая ревматическая лихорадка  
ОСА — основной соматический антиген  
ОСГН — острый стрептококковый гломерулонефрит  
ОСО — отраслевой стандартный образец  
ОФД — ортофенилендиамин  
ОФР — опсонофагоцитарная реакция  
ОЦП — основные цитоплазматические протеины  
ПАСК — парааминосалициловая кислота  
ПБГМ — полибета-гидрооксимасляная кислота  
ПВ — пептонная вода  
ПИФ — прямая иммунофлуоресценция  
ПМАС — плотная минимальная селективная среда с антибиотиками

- ПРФ — полирибозилрибитолфосфат  
 ПСС — противостолбнячная сыворотка  
 ПСТК — питательная среда для термофильных кампилобактеров  
 ПСЧИ — противостолбнячный человеческий иммуноглобулин  
 ПТП — противотуберкулезные препараты  
 ПЦР — полимеразная цепная реакция  
 РА — реакция агглютинации  
 РВА — реакция вибриоцидных антител  
 РДС — респираторный дистресс-синдром  
 РИА — радиоиммунный анализ  
 РИВ — реакция иммобилизации вибрионов  
 РИМ — реакция ингибиции метаболизма  
 РИР — реакция ингибиции роста  
 РИФ — реакция иммунофлуоресценции  
 РК — реакция коаггутинации  
 РЛ — реакция лейкоцитоллиза  
 РМА — реакция микроагглютинации (лепто-спир)  
 РНАг — реакция нейтрализации антигена  
 РНАт — реакция нейтрализации антител  
 РНГА (РПГА) — реакция непрямо́й (пассивной) гемагглютинации  
 РНИФ — реакция непрямо́й иммунофлюоресценции, то же, что НРИФ  
 РНК — рибонуклеиновая кислота  
 РОА — реакция объемной агломерации  
 рРНК — рибосомальная рибонуклеиновая кислота  
 РСК — реакция связывания комплемента  
 РТ — ретикулярные тельца  
 РТНГА — реакция торможения непрямо́й гемагглютинации  
 СА — селективный агар  
 САА — стрептококк группы А  
 СД — селективные добавки  
 СИБ — система индикаторных бумажек  
 СКС — среда контроля стерильности  
 СМЖ — спинномозговая жидкость  
 СЛО — стрептолизин О  
 СЛС — стрептолизин S  
 СТШ — синдром токсического шока  
 ТЕ — туберкулиновая единица  
 ТИФА — твердофазный иммуноферментный анализ  
 ТК — тейхоевая кислота  
 т.п.н. — тысячи пар нуклеотидов  
 ТСА — триптиказосоевый агар  
 ТСТШ — токсин синдрома токсического шока  
 Фактор V (НАД) — никотинамидадениндинуклеотид  
 Фактор X — гемин  
 ФГЛ-1 — фенолгликолипид-1  
 ФИТЦ — флуоресцеин-изотиоцианат  
 ФНО (то же, что TNF) — фактор некроза опухолей  
 ФС — фармакопейная статья  
 ФСБР — фосфатно-солевой буферный раствор  
 Ц — цитозин  
 ЦИК — циркулирующие иммунные комплексы  
 ЦПМ — цитоплазматическая мембрана  
 ЭТ — элементарные тельца  
 ЭАКП — энтероагрегативные кишечные палочки  
 ЭГКП — энтерогеморрагические кишечные палочки  
 ЭИКП — энтероинвазивные кишечные палочки  
 ЭПКП — энтеропатогенные кишечные палочки  
 ЭТКП — энтеротоксигенные кишечные палочки  
 Act A — белок листерий, вызывающий полимеризацию актина  
 А/Е — (attaching–effacing, англ.) — отношение активностей прикрепления к сглаживанию  
 Ail — белок адгезии, инвазии  
 ASLO (antistreptolysin O, лат.) — антистрептолизин О  
 BONT — ботулинический нейротоксин  
 CAMP-тест — тест на синергичный гемолиз,

- предложенный Cristie, Atkins и Munch-Petersen
- СврА (он же PspC) — один из холин-связывающих поверхностных белков пневмококка (cholinbinding protein A, англ.), адгезин
- CD (cluster definition, англ.) — антигены кластеров дифференцировки клеток
- Сер — ген, кодирующий пили холерного вибриона
- CFA (colonization factor antigen, англ.) — фактор колонизации фимбриальной природы
- cld (chain length regulator, англ.) — гены, локализованные на малой плазмиде рHS-2, кодирующие полимеризацию специфических цепей О-антигена шигелл
- CLDT — цитолетальный дилатирующий токсин
- СТ — холерный токсин
- СтрА — карбокситерминальная протеаза А
- Сtx+ — штамм холерного вибриона, имеющий ген токсигенности
- Сtxf — филаментозный фаг
- DLM (dosis lethalis minima) — минимальная летальная доза
- Esp — секреторные белки, необходимые для доставки эффекторных белков в цитоплазму эукариотических клеток
- FI — фракция I чумного микроба
- fil — ген, контролирующий наличие филаментов
- fla — ген флагеллина
- Fts — белок клеточного деления
- ftsZ — ген цитрат-синтазы
- gro E1 — ген белка теплового шока
- gro В — ген в субъединице РНК-полимеразы
- HA — гемагглютинин
- Hib — Haemophilus influenzae типа b
- hil (hyper invasion locus, англ.) — локус гиперинвазии
- HLA — главный комплекс гистосовместимости
- Hly+ — гемолитически активные бактерии (холерные вибрионы)
- Hly- — гемолитически неактивные бактерии (холерные вибрионы)
- HPI — остров патогенности (pathogenicity island, англ.) генома иерсиний
- ics (intra/intercellular spreading, англ.) — гены, ответственные за внутриклеточное и межклеточное распространение шигелл
- IF — интерферон
- IL — интерлейкин
- Int A — интерналин А, поверхностный белок листерий, фактор инвазии
- inv — гены инвазии
- ipa (invasion plasmid antigen, англ.) — плазмидные гены инвазии
- ipg — гены, ответственные за экспрессию inv-генов
- kat F — каталаза-сигма-S-фактор, система, связанная с активацией катализа синтеза РНК
- Kat E — ген, участвующий в синтезе каталазы
- LAMP1 (Lysosome associated membrane protein 1, англ.) — мембранный белок эпителиальной клетки, связанный с лизосомами
- Lbp A и B (Lactoferrinbinding protein A/B, англ.) — лактоферрин-связывающий белок А или В наружной мембраны менингококка
- LT (termolabile toxin, англ.) — термолабильный энтеротоксин
- Lyt A — литический фермент А пневмококка
- MALP-2 — активатор макрофагов липопротеиновой природы
- MAP-M (M-association protein, англ.) — М-ассоциированный протеин
- M.f. — Mycoplasma fermentans
- M.g. — Mycoplasma genitalium
- M.h. — Mycoplasma hominis
- M.n. — Mycoplasma penetrans
- M.p. — Mycoplasma pneumoniae

- MOMP (major outer membrane protein, англ.) — основной белок наружной мембраны  
 MR (D-mannose resistant, англ.) — маннозозо-резистентные пили  
 MS (D-mannose sensible, англ.) — маннозочувствительные пили  
 mxi (membrane expression invasion, англ.) — гены вирулентности  
 NAG — N-ацетилглюкозамин  
 NCT — новый холерный токсин  
 NFkB (nuclear factor kB, англ.) — ядерный фактор каппа В  
 NK — нормальные киллеры  
 NspA — один из межвидовых нейссерияльных белков наружной мембраны  
 NTHA (nontoxic nonhemagglutinating, англ.) — нетоксичный негемагглютинирующий белок  
 ntnh — ген, кодирующий NTNH  
 OF (opacity factor, англ.) — фактор опалесценции  
 ONPG (о-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозидол) — реактив для теста на  $\beta$ -галактозидазу  
 Ора и Орс (opacity associated, англ.) — белки мутности колоний наружной мембраны менингококка 5-го класса  
 ozfu — ген, кодирующий продукт с неизвестной функцией  
 PFGE (puls gel electrophoresis, англ.) — метод гель-электрофореза в пульсирующем поле  
 PF — периплазматические флагеллы  
 PhoP-phoQ (phosphate membrane sensor kinase, англ.) — регуляторные гены  
 P1 — главный адгезин и иммуноген *M. pneumoniae*  
 PIcA — фосфатилинозитол-специфичная фосфолипаза А листерий  
 PilC — липкая концевая субъединица белка пилина  
 PilE — структурный белок пилина, формирующий стержень пилуса  
 PorA, P1 — белок класса 1 наружной мембраны менингококка, порин А  
 PorB — белок классов 2/3 наружной мембраны менингококка и гонококка, порин В  
 PPD (pure protein derivate, англ.) — сухой очищенный дериват туберкулина  
 PsaA — один из поверхностных холин-связывающих белков пневмококка (Pneumococcal surface adhesin A, англ.), не являющийся адгезином  
 PspA — важнейший поверхностный холин-связывающий белок пневмококка (Pneumococcal surface protein A, англ.), фактор колонизации  
 pss — ген, контролирующий синтез белка, защищающего возбудитель от переваривания в фаголизосоме макрофага  
 PYV (plasmide yersinial virulence, англ.) — плазмиды вирулентности иерсиний  
 RFLP — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов  
 Rmp — белок наружной мембраны класса 4, общий для гонококка и менингококка  
 groS — гены, контролирующие синтез сигма-фактора, необходимого для выживания сальмонелл в стационарной фазе роста  
 rck (resistance complement killing, англ.) — ген, кодирующий устойчивость к действию комплемента  
 S-сигма — фактор, служащий инициатором процесса транскрипции  
 SE (A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V) — стафилококковый энтеротоксин А, В и т.д.  
 SHI (Shigella island, англ.) — «остров» патогенности шигелл  
 SLO (streptolysin O, англ.) — стрептолизин О  
 SLS (streptolysin S, англ.) — стрептолизин S  
 SLT (shiga-like enterotoxin, англ.) — шигаподобный энтеротоксин  
 SNAP-25 (synaptosomal associated protein, англ.) — белок эукариотической клетки, ассоциированный с синапсосомами

- sod — ген, контролирующий синтез супероксид-дисмугтазы
- Spe (streptococced pyrogenic toxin, англ.) — стрептококковый пирогенный токсин
- SPI (Salmonella patogenicity island, англ.) — геномный «остров» патогенности сальмонелл
- spv (Salmonella plasmide virulence, англ.) — плазмидные гены вирулентности сальмонелл
- ST (thermostable toxin, англ.) — термостабильный энтеротоксин
- Stx (Shiga toxin, англ.) — шигеллезный энтеротоксин
- Tbp A и B (Transferrinbinding protein A/B, англ.) — трансферрин-связывающий белок A или B наружной мембраны менингококка
- TCH (2-thiophenecarboxylic acid hydrazide, англ.) — гидразид 2-тиофен угольной кислоты
- TCR — T-клеточный рецептор
- Tir (translocation intimin receptor, англ.) — рецептор клетки-хозяина для бактериального белка интимина
- TNF (tumor necrosis factor, лат.) — цитокин, фактор некроза опухолей, то же, что ФНО
- tnt — ген столбнячного нейротоксина
- TNT — столбнячный нейротоксин
- Tr-locus — генетический локус, ответственный за синтез типовых антигенов *S.flexneri*
- TSI (Triple Sugar Iron, англ.) — трехсахарный агар с железом, аналог среды Клиглера
- tox+ — дифтерийные штаммы, имеющие ген токсигенности
- U.u — *Ureaplasma urealyticum*
- vac CB — хромосомные гены, ассоциированные с вирулентностью шигелл
- VAMP (vesicle associated membrane protein, англ.) — мембранный белок эукариотической клетки, ассоциированный с везикулами, он же синаптобrevин
- Vb — участок T-клеточного рецептора
- Vir — плаزمида вирулентности, имеющая размеры 140 мД, у энтероинвазивных кишечных палочек и шигелл
- Vi-антигены — капсульные антигены, предположительно связанные с вирулентностью
- VNTR — вариабельное число tandemных повторов
- VPI — остров патогенности вибриона
- Yad A — белок наружной мембраны иерсиний, защищающий их от переваривания фагоцитами и бактерицидного действия сыворотки
- YPM — суперантиген иерсиний
- Yop — токсические белки иерсиний, входящие в систему защиты бактерий от антибактериальных механизмов хозяина



# **ОБЩАЯ ЧАСТЬ**



# Формы адаптации бактерий к условиям внешней среды

---

### 1.1. Роль системы регуляции «кворум сенсинг» и биопленок в патогенезе инфекционных болезней

На протяжении многих десятилетий микробиологи изучали бактерии, выращенные на жидких средах, причем основным критерием при выборе микроорганизма для исследования его физиологии и генетики являлась способность этого микроорганизма расти в виде суспендированной гомогенной культуры. Существовало общепринятое представление, что и в природных условиях бактерии обитают как свободно плавающие (планктонные) клетки, например, в поверхностных слоях морских или речных вод. Все наши знания о росте, метаболизме, адаптационных способностях, физиологии и генетике бактерий были получены при изучении таких планктонных культур бактерий, и накопленная обширная информация позволила получить представление об основных молекулярных механизмах многих жизненно важных процессов, происходящих в их клетках.

Тот факт, что бактерии способны образовывать сложные бактериальные сообщества, играющие важную роль в природе, микробиологам был известен давно, еще со времен Левенгука. Но то, что более 99% бактерий существуют в природных экосистемах не в виде свободно плавающих клеток, а в виде специфически организованных прикрепленных к субстрату биопленок стало известно лишь в последнее десятилетие минувшего века благодаря развитию и применению новых микробиологических и молекулярно-биологических методов исследования. Прогрессу в изучении феномена биопленок способствовало совершенствование техники микроскопирования и особенно применение конфокального сканирующего лазерного микроскопа, позволившего проводить изучение ультраструктуры живых биопленок, а также исследования, связанные с определением экспрессии генов, ответственных за различные стадии развития биопленок и их регуляцию при переходе от планктонного образа жизни к биопленочному. Расширить и углубить исследования по идентификации генов, контролирующих те или иные процессы в бактериальных клетках, в том числе и образование биопленок, позволили работы по расшифровке нуклеотидных последовательностей геномов ряда патогенных бактерий.

Образование биопленок и их функционирование — пример сложного социального поведения бактерий, регулируемого и управляемого не только сигналами из окружающей среды, но и межклеточными связями.

В последние годы расшифровано и описано явление межклеточного общения бактерий, получившее название «quorum sensing» («кворум сенсинг», или «чувство кворума», QS). Оно связано с глубокими изменениями в метаболизме бактериальных клеток при достижении ими определенной критической плотности (количества клеток на 1 мл среды).

Межклеточные общения типа QS и образование биопленок играют ключевую роль во взаимодействии бактерий с высшими организмами, животными и растениями, как при симбиозе, так и при патогенезе, и, следовательно, определяют инфекционные процессы и развитие болезней. Рассмотрение этих явлений составляет предмет данной главы.

### **«Кворум сенсинг» — способ межклеточного общения бактерий**

#### **Открытие феномена QS у бактерий**

Достижения в области микробиологии в последние два десятилетия показали, что бактерии для своего выживания так же, как и люди, широко используют преимущества, которые дает коллективное поведение. Бактериальный «язык» общения, как выяснилось по мере вовлечения в круг изучаемых бактерий все большего числа видов, чрезвычайно богат и обеспечивается различными низкомолекулярными химическими соединениями, разнообразие которых вполне сравнимо с бытовым словарным запасом человека.

Феномен коллективного поведения бактерий, или «чувство кворума», был впервые обнаружен и описан примерно 25 лет назад при изучении явления биолюминесценции у морской бактерии *Vibrio fischeri*. При добавлении свободной от бактерий надосадочной жидкости, взятой от культуры люминесцирующих бактерий, достигших высокой множественности, удалось получить эффект люминесценции у бактерий, имеющих низкую плотность, при которой в обычных условиях выращивания свечения еще не наблюдается. При выяснении природы такого эффекта было установлено, что свечение бактерий, обуславливаемое продуктами генов биолюминесценции, осуществляется лишь при достижении определенной плотности (кворума) популяции и контролируется сигнальными молекулами, продуцируемыми самими бактериями и работающими по принципу аутоиндукторов (АИ).

Биолюминесценция может начаться только после накопления в культуре молекул АИ до определенного порогового уровня, который достигается лишь при наличии высокой плотности бактерий ( $>10^7$  КОЕ/мл). После того, как были выделены молекулы АИ, удалось исследовать их структуру. Первый известный АИ

оказался принадлежащим к группе ацил-гомосерин лактонов (AHL) — 3-оксо-гексаноил-гомосерин лактоном (3-охо-С<sub>6</sub>-HSL), свободно диффундирующим как из бактериальных клеток в окружающую среду, так и обратно. Феномен регуляции работы определенных бактериальных генов в зависимости от плотности клеточной популяции на основе принципа автоиндукции получил название «чувство кворума». Зависимая от плотности клеточной популяции автоиндукция специфических бактериальных генов осуществляется при помощи двух регуляторных белков: 1) белка LuxI, представляющего собой ацил-HSL синтазу, участвующую в биосинтезе сигнальных молекул АИ (N-ацил-гомосерин лактонов), и 2) белка LuxR, являющегося активатором, способным связываться с молекулами АИ и в таком виде активировать транскрипцию оперонов и генов, контролируемых системой QS. Наряду с системой LuxI/LuxR у *V.fischeri* обнаружена вторая система QS AinS/AinR, которая также участвует в регуляции генов люминесценции. Белок AinS участвует в биосинтезе другого АИ — N-октаноил-L-гомосерина. Он гомологичен белку LuxM *V.harvey*, второй также хорошо изученной биолюминесцирующей бактерии.

Как стало теперь известно, по типу QS, помимо биолюминесценции регулируется широкий спектр физиологических процессов, включая синтез детерминант вирулентности у патогенных бактерий, перенос конъюгативных плазмид, синтез антибиотиков, образование биопленок и даже процесс репликации у *E. coli*.

У разных представителей грамотрицательных бактерий сигнальные молекулы АИ являются N-ацил-L-гомосерин лактонами — родственными соединениями, отличающимися по составу и длине ацильных (СН<sub>2</sub>) групп (от 4 до 14). Они синтезируются в клетках бактерий под контролем ацилгомосеринсинтаз, называемых обычно LuxI-подобными (по названию белка LuxI системы QS у *V.fischeri*). Несмотря на большое сходство LuxI-подобных белков у каждого вида бактерий синтезируется преимущественно один вид автоиндуктора.

У грамположительных бактерий в качестве молекул, регулирующих социальное поведение, чаще всего выступают пептиды или модифицированные пептиды. Обычно АИ, синтезируемые различными видами бактерий, специфически взаимодействуют с клетками бактерий своего вида. Недавно был обнаружен автоиндуктор АИ-2, образуемый большим количеством как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, что дало возможность предположить, что он участвует не только во внутривидовой, но и в межвидовой коммуникации бактерий. По своей структуре этот АИ не похож ни на один из ранее описанных АИ; он является фуранозилдиэфиром бора. Пока неизвестно, каким образом он функционирует.

Сенсорные молекулы грамотрицательных бактерий, преобразующие внешний сигнал АИ в транскрипционный или поведенческий ответ клетки, чаще всего являются гистидин киназами, локализованными в цитоплазматической мембране. По аналогии с LuxI они являются LuxR-подобными, так как имеют высокую степень сходства, хотя у каждого вида бактерий названы по-разному. LuxR-подобные белки ответственны за связывание своего «родного» АИ, присоединение к промотору специфического гена-мишени и активацию его транскрипции.

## Роль системы QS в регуляции генов вирулентности у патогенных бактерий

Связь между явлением QS и вирулентностью установлена у нескольких патогенных бактерий, использующих системы LuxI/LuxR во время колонизации растений или животных. Недавно появился ряд работ, в которых показано участие регуляторных систем QS в контроле экспрессии генов вирулентности у холерного вибриона, у бактерий, относящихся к комплексу Burkholderia, энтеропатогенных и энтерогеморрагических Escherichia coli, у сальмонелл. Однако наиболее хорошо системы QS изучены у Pseudomonas aeruginosa и Staphylococcus aureus, и поэтому механизм регуляции генов вирулентности при помощи этих систем будет подробно рассмотрен на примере P. aeruginosa для грамотрицательных и на примере Staphylococcus aureus для грамположительных бактерий.

### Система QS у P. aeruginosa

У P. aeruginosa имеется сложная система регуляции экспрессии генов вирулентности. Эта бактерия обладает по крайней мере двумя системами, работающими по принципу QS — LasI/LasR и RhlI/RhlR, которые работают в тандеме, осуществляя контроль деятельности различных генов. Каждая система QS индуцирует и отвечает на специфический для нее АИ: под действием LasI синтезируется 3-оксо-додеcanoил-HSL (3-охо-C12-HSL), а RhlI ответственна за образование бутирил-HSL (C4-HSL). Методом инсерционного мутагенеза у P. aeruginosa идентифицировано более 40 генов, регулируемых на основе QS. Экспрессия этих генов увеличивается в 5 и более раз в присутствии АИ. Регуляция этих генов при помощи систем LasI/LasR и RhlI/RhlR осуществляется следующим образом. Белок LasI участвует в биосинтезе сигнальных молекул (АИ1), N-(3-оксо-додеcanoил)-гомосерин лактонов, а RhlI белок синтезирует молекулы АИ2, N-(бутирил)-гомосерин лактонов. Молекулы АИ свободно диффундируют из клеток в окружающую среду и обратно. При достижении критического порогового уровня концентрации АИ1 в клетках происходит связывание сенсорного белка LasR с АИ1. Этот комплекс способен присоединяться к промоторам различных генов, кодирующих синтез многих секретлируемых факторов вирулентности, ответственных за повреждения тканей организма хозяина, и стимулировать их транскрипцию. К ним относятся ген lasB, кодирующий эластазу, ген lasA — протеазу, ген toxA — экзотоксин А, ген argA — щелочную фосфатазу, а также гены ряда других факторов патогенности. Наряду с генами вирулентности этот комплекс индуцирует транскрипцию гена rhlR, иницируя таким образом работу второй системы QS. RhlR связывается с соответствующим ему АИ2, активировывает дополнительную транскрипцию ряда LasR-регулируемых генов, а также включает работу нового набора генов, ответственных за синтез вторичных метаболитов, генов синтеза антибиотика тиоцианина, генов синтеза пилей IV типа, иницирующих образование биопленок (см. ниже). Автоиндуктор системы Las препятствует

связыванию АИ2 системы Rhl с сенсорным белком RhlR. Благодаря этому обеспечивается последовательность в инициации каскадов двух регуляторных систем и определенный порядок проявления активности контролируемых этими системами генов.

Совсем недавно при анализе полной нуклеотидной последовательности генома *P. aeruginosa* идентифицирован ген третьего гомолога LuxR-белка, получившего название QscR, который обладает способностью подавлять продукцию LasI-зависимого АИ.

Кроме того, получены данные, показывающие, что в системах QS *P. aeruginosa* участвует еще один АИ, не принадлежащий к классу гомосеринлактонов, 2-гептил-3-гидрокси-4-квинолон. Он получил название PQS. Вместе с системами Las и Rhl этот АИ осуществляет контроль экспрессии эластазы, LasB. Экспрессия PQS контролируется активированным белком LasR (LasR-АИ), а сам PQS, в свою очередь, индуцирует транскрипцию гена rhlI. Эти данные указывают на существование дополнительной связи между системами Las и Rhl. PQS инициирует Rhl-каскад, активирует образование RhlI-зависимого АИ только после активации LasI/LasR системы. Образующаяся иерархическая сеть обеспечивает точность времени проявления активности каждого из контролируемых системами QS генов *P. aeruginosa*. Такой генетический механизм позволяет патогенным бактериям рационально реализовать свой болезнетворный потенциал. Бактерии не атакуют эукариотическую клетку хозяина, не синтезируют факторы патогенности до тех пор, пока нет полной уверенности в успехе. Данный момент определяется системой QS, которая включает гены факторов патогенности только после достижения бактериями определенной плотности, при которой синтезирующееся количество факторов патогенности гарантирует успешное развитие инфекционного процесса.

### **Система QS у грамположительных бактерий**

Выше уже указывалось, что системы QS обнаружены также у грамположительных бактерий и они используются бактериями при регуляции экспрессии генов, кодирующих разные признаки, например, спорообразование у *Bacillus subtilis*, компетентность у *Streptococcus pneumoniae* и *Bacillus subtilis*, конъюгацию у *Enterococcus faecalis*, вирулентность у *Staphylococcus aureus*. Обычно грамположительные бактерии используют в качестве сигнальных молекул небольшие пептиды, образующиеся в результате разрезания синтезированного ранее предшественника.

Работа механизма QS у грамположительных бактерий включает несколько ступеней. Вначале синтезируется предшественник сигнального пептида, который затем разрезается с выделением процессированного сигнального пептида. Обычно пептид транспортируется из клетки при помощи белкового комплекса, ABC-транспортера. При достижении определенного уровня внеклеточной концентрации пептида фермент гистидинкиназа двухкомпонентной сигнальной системы

реагирует на его присутствие, объединяется с ним, и образовавшийся комплекс гистидинкиназа — пептид инициирует серию событий фосфорилирования, включая сам фермент и родственный регуляторный белок в области консервативного остатка аспарагиновой кислоты. В результате происходит активация белка регулятора, связывание его с ДНК и активация транскрипции генов-мишеней.

Наиболее хорошо изученной является регуляция при помощи системы QS генов вирулентности у *Staphylococcus aureus*. В этом случае экспрессию факторов патогенности регулируют молекулы РНК, получившие название РНКIII, и оперон *agrBDCA*, кодирующий компоненты пептидной системы QS, которые частично ответственны и за регуляцию уровня синтеза РНК. Ген *agrD* кодирует предшественник пептида *AggD* из 46 аминокислотных остатков, который процессируется до конечного октопептида, выполняющего роль аутоиндуктора (АИП). Гены *agrC* и *agrA* кодируют фермент гистидинкиназу и белок-регулятор, соответственно. АИП взаимодействует с киназой на мембране, этот комплекс активирует регулятор *AggA*, который индуцирует транскрипцию как оперона *agrBDCA*, так и гена, ответственного за образование РНКIII. Различные штаммы *S.aureus* могут быть отнесены к разным группам, варьирующим по структуре АИП. Вариабельность определяет специфичность АИП при взаимодействии с определенной сенсорной киназой. АИП, принадлежащий к определенной группе штаммов стафилококков, специфически подавляет систему регуляции QS в других группах *S.aureus*. Это позволяет проникшему и первым установившему QS-контроль штамму быть вне конкуренции по отношению к вторично инфицирующим штаммам стафилококков. В то же время стимуляция экспрессии *agr* оперона сильно зависит от присутствия в среде АИП клеток родственного штамма, являющегося членом той же группы, что и инфицирующий штамм.

### ***Биопленки — способ существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина***

Развитие биопленочных сообществ — одна из основных стратегий выживания бактерий не только в окружающей среде, но и в организмах инфицируемых хозяев. Биопленки — это высокоорганизованные сообщества, образованные бактериями одного или нескольких видов и состоящие как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся (некультивируемых) форм. В составе биопленок клетки бактерий объединены сложными межклеточными связями, осуществляющими регуляцию экспрессии генов в различных частях биопленок и на разных стадиях их развития, в результате чего популяцию биопленочных бактерий многие стали рассматривать как функциональный аналог многоклеточного организма.

Образование биопленок происходит на поверхностях различного происхождения (биотических и абиотических) как в природе, так и в организмах различных хозяев. Такой способ существования бактерий создает большие проблемы

в промышленности (коррозия труб, снижение эффективности работы промышленных установок) и в медицинской практике. В настоящее время установлено, что многие хронические инфекции, а также инфекции, возникновение которых связано с использованием медицинского имплантируемого оборудования (линз, катетеров, протезов, искусственных клапанов сердца) вызываются бактериями, способными расти в виде биопленок. В составе биопленок бактерии значительно более устойчивы к действию антибактериальных препаратов, включая антибиотики, к факторам иммунной защиты организма, а также к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как изменения температуры, рН среды, осмотичности.

### **Определение биопленок и их структурная организация**

До 1990 г. биопленки воспринимались как неструктурированные наросты из бактериальных клеток, окруженные экзополисахаридным матриксом. Такое представление основывалось на результатах изучения биопленок при электронном и световом микроскопировании, дающем артефакты в первом случае из-за полной обезвоженности препаратов, а во втором — из-за внефокусных эффектов. Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (ЛСМ), изобретенный еще в 50-х годах XX века, никогда ранее не применялся для изучения бактерий, поскольку считалось, что у них преобладает планктонная форма жизни. По мере накопления данных о распространённости биопленок в природе и их роли во многих природных процессах, а также в медицине и промышленности, возобновились поиски методов, которые способствовали бы расшифровке природы биопленок.

Выше уже указывалось, что при помощи ЛСМ было выяснено, что биопленки могут быть образованы бактериями как одного, так и нескольких видов. Сочетание ЛСМ и эпифлюоресцентной микроскопии позволило за счет комбинации красителей и специально разработанных компьютерных программ выявлять одновременно общее количество клеток в исследуемой биопленке, а также процентный состав мертвых, живых, некультивируемых и активно метаболизирующих клеток. Независимо от состава биопленки, развивающиеся в природных экосистемах, обладают универсальной сложной структурой с некоторыми незначительными вариациями. Они образуются на твердых поверхностях, имеют характерную архитектуру (трехмерные грибовидные или похожие на колонны образования), включающую микроколонию, заключенные в экзополимерный матрикс, окруженные наполненными жидкостью каналами. По каналам осуществляется приток питательных веществ и кислорода и выведение конечных продуктов метаболизма бактериальных клеток. За образование и сохранение каналов в активном состоянии несут ответственность специальные механизмы, в которых важную роль играют особые поверхностные структуры — рамнолипиды. При их помощи каналы остаются открытыми, изменяются межклеточные взаимоотношения и взаимодействие клеток с поверхностью,

в результате чего сохраняется архитектура биопленок, приток питательных веществ и кислорода, вывод продуктов распада, а также предотвращается попадание в каналы бактерий извне и их колонизация.

Одним из ключевых структурных компонентов биопленок является внеклеточное полимерное вещество, или матрикс. Последний состоит из смеси таких компонентов, как экзополисахариды, белки, нуклеиновые кислоты и другие вещества. Наиболее изученным компонентом матрикса являются экзополисахариды (ЭПС), играющие, по-видимому, различные роли в структуре и функциях биопленочных сообществ в зависимости от условий окружения. Одна из важнейших функций экзополимерного матрикса — обеспечение защиты бактерий от различных стрессовых ситуаций, возникающих в окружающей среде, таких как УФ-облучение, изменения в рН среды, осмотический шок, высыхание, воздействие антибактериальных препаратов и механизмов защиты хозяина.

Сложная архитектура биопленок обеспечивает возможность метаболической кооперации клеток внутри пространственно хорошо организованных систем, создает условия, благоприятствующие установлению симбиотических взаимоотношений между бактериями разных видов.

С целью экспериментального изучения процесса образования биопленок в настоящее время разработаны специальные аппараты и методики для получения биопленок в лабораторных условиях. В качестве субстратов для формирования биопленок используются пластиковые, тефлоновые и металлические пластины. В качестве модельных организмов при исследованиях биопленок используются представители как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, такие как псевдомонады, кишечная палочка, холерный вибрион, некоторые виды бацилл, стафилококков и стрептококков.

## **Стадии образования биопленок**

Началом развития биопленок является переход бактерий от планктонного существования к биопленочному, связанному с прикреплением клеток к биотической или абиотической поверхности. Процесс перехода из одного состояния в другое инициируется определенными сигналами, поступающими из окружающей среды, которые могут сильно отличаться не только для разных организмов, но и в случаях прикрепления одного организма к разным поверхностям. Например, штамм *Escherichia coli* O157:H7 образует биопленки только при недостатке питательных веществ, а некоторые штаммы *E. coli* K12 способны образовывать биопленки на минимальной среде только при добавлении в ее состав аминокислот. Штаммы псевдомонад и холерного вибриона образуют биопленки при выращивании на различных средах, способствующих росту, т.е. реагируют на разные сигналы окружающей среды, инициирующие прикрепление к субстрату. При переходе к сидячему образу жизни большую роль у ряда бактерий играют поверхностные

органеллы-флагеллы, или пили. Часто именно они определяют взаимодействие с различными поверхностями. Так, при колонизации кишечника холерные вибрионы используют Tsr пили, а в случае прикрепления к абиотическим поверхностям — пили, кодируемые локусом *msh*, не относящиеся к факторам патогенности. Эти и накопленные к настоящему времени другие факты, полученные при изучении различных видов бактерий, свидетельствуют о существовании у них разных способов перехода к сидячему образу жизни.

На примере холерных вибрионов можно продемонстрировать, насколько важную роль в их выживаемости в водной экосистеме играет способность к формированию высокоорганизованной имеющей трехмерную структуру биопленки. В настоящее время повсеместно происходит замена биовара классических вибрионов холерными вибрионами биовара Эль-Тор, вызвавшими седьмую пандемию холеры — самую длительную из всех известных (более 40 лет), продолжающуюся до сегодняшнего дня. В числе некоторых геномных различий между этими биоварами есть те, которые имеют отношение к способности формировать биопленки. Сохранение Эль-Тор-вибрионов в водных экосистемах в межэпидемические периоды седьмой пандемии холеры, возможно, связано с присутствием в их геноме чужеродного участка ДНК размером 16,7 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.), содержащего 16 генов, необходимых для биосинтеза пилей *MshA* и их секреции на поверхность клеток. Фланкирование его прямыми повторами нуклеотидных последовательностей из 7 пар позволяет предполагать, что гены пилей *Msh* имеют организацию, характерную для мигрирующих генетических элементов. Возможно, что эти гены исходно имелись у общего предшественника холерных вибрионов обоих биоваров, но в процессе эволюции и дальнейшей дивергенции классические вибрионы утратили значительную их часть и перестали образовывать пили этого типа. Результатом такой утраты явилась меньшая способность сохраняться во внешней среде, поскольку пили *Msh* участвуют в процессе образования биопленок, обеспечивая возможность прикрепления клеток не только к биотическим, но и абиотическим поверхностям. Более того, у вибрионов Эль-Тор обнаружен еще один дополнительный ген *mbaA* (от *maintenance of biofilm architecture*), продукт которого регулирует образование трехмерной структуры биопленки. Таким образом, в процессе эволюции у Эль-Тор-вибрионов возник механизм, дающий этому патогену возможность занимать множество экологических ниш и обеспечивать его устойчивость к условиям внешней среды, высокую жизнеспособность и конкурентоспособность.

Одним из важных аспектов в исследовании бактериальных биопленок являются изменения в метаболизме бактерий в процессе их перехода от планктонного образа жизни к сидячему и развитию биопленок. Для его решения изучают мутанты бактерий, у которых нарушен процесс инициации и развития биопленок, а также используют другие подходы, включающие непосредственное микроскопическое наблюдение и сравнительные анализы состава мРНК и белков в клетках планктонных и биопленочных бактерий на разных стадиях развития биопленки. Применение таких методов позволило выделить и охарактеризовать несколько стадий

развития биопленок, включающих прикрепление бактерий к субстрату, образование микроколоний и каналов, созревание биопленок и дисперсию клеток. У широкого круга бактерий стадии развития биопленок являются, по-видимому, консервативными.

Во время начального прикрепления планктонные бактерии контактируют с субстратом и временно фиксируются. Это прикрепление обратимо — некоторые клетки способны снова открепляться. Как уже обсуждалось выше на примере холерного вибриона, в этом процессе важную роль играют пили, или флагеллы. У псевдомонад мутанты, не способные синтезировать флагеллы, прикрепляются к поверхности с меньшей эффективностью, чем клетки дикого типа; разница в этих случаях достигает 2–3 порядков. Следующая стадия развития биопленок (стадия созревания) у псевдомонад подразделена на две — стадию созревания 1 и стадию созревания 2. Во время стадии созревания 1 клетки теряют подвижность, прикрепление становится необратимым, активируется первая система регуляции активности генов «кворум сенсинг», о чем свидетельствует активация гена *lasB*, образуются микроколонии, слой биопленки утолщается. К этому времени зарегистрирована активация второй системы «кворум сенсинг», *Rhl*. Во время стадии созревания 2 образуются кластеры микроколоний, достигающие максимальной плотности. Большинство клеток начинает открепляться внутри кластеров, происходит отделение кластеров от поверхности. Через 9 дней после начала образования биопленки кластеры изменяются в структуре, начинается последняя стадия — процесс дисперсии, или распада, во время которого бактерии способны активно покидать биопленку. Он инициируется координированным распадом окружающего внеклеточного матрикса, осуществляемым при помощи секретлируемых (например, полисахаридлиаз) или связанных с поверхностью ферментов и активации функций подвижности. Бактерии выплывают через открытые каналы. Цикл развития биопленки завершается, бактерии вновь возвращаются к планктонному образу жизни с тем, чтобы при необходимости вновь его повторить.

При помощи ряда современных молекулярно-биологических методов были выявлены значительные отличия в составе и уровне белков, синтезируемых планктонными, биопленочными бактериями и бактериями, находящимися на разных стадиях развития биопленок. Установлено участие в этих стадиях различных регуляторных систем. В таблице 1.1.1 представлены данные исследования биопленок *P. aeruginosa*, находящихся на разных стадиях развития. Они получены при сравнительном анализе грубых экстрактов белков и микроскопических наблюдений. Подобные данные получены также для биопленочных бактерий кишечной палочки, холерного вибриона, стафилококков и стрептококков. Все это свидетельствует, что развитие биопленок — сложный высоко регулируемый генетически запрограммированный процесс.

Таблица 1.1.1

**Фенотипические характеристики стадий развития биопленок  
у *Pseudomonas aeruginosa***

<b>Стадия развития биопленки</b>	<b>Признаки, выявляемые при микроскопировании</b>	<b>Состав белков</b>
Планктонная	Подвижность клеток	Отличный от такового обратимо прикрепленных клеток
Обратимое прикрепление	Контакт с поверхностью полюсами клеток, временная фиксация на субстрате	Различная экспрессия поверхностно индуцируемых генов, независимая от системы «кворум сенсинг» (Las)
Необратимое прикрепление	Переориентация контакта клеток по продольной оси, развитие микроколоний, неподвижность клеток, активация системы Las	Отличия по 50 белкам между Las+ и Las- штаммами; по поверхностно индуцируемым — более чем по 100 белкам
Стадия созревания 1	Наслоение клеток в кластерах, утолщение биопленки до 10 мкм, активация системы Rhl	Глубокие различия по составу белков с планктонными клетками
Стадия созревания 2	Максимальное развитие кластеров клеток, утолщение до 100 мкм, открепление клеток от субстрата	Самые большие различия по составу белков с планктонными клетками и стадией созревания 1; синтез de novo более 100 белков; 50% белков активировано в отличие от белков планктонных клеток
Дисперсия	Изменения в структуре кластеров, подвижные и неподвижные бактерии, дисперсия через каналы и поры	Большее сходство с планктонными клетками, чем с клетками в стадии созревания 2; 35% белков супрессировано в отличие от белков зрелых стадий биопленки

### **Резистентность биопленок к действию антибактериальных препаратов и иммунных механизмов инфицируемых макроорганизмов**

Одним из величайших достижений медицины минувшего века явилось открытие антибиотиков и совершенствование антибиотикотерапии инфекционных заболеваний. Однако увеличение числа антибиотиков и повышение частоты их использования при лечении различных заболеваний привело к возникновению ряда проблем, связанных со снижением эффективности антибиотикотерапии. Одна из них — чрезвычайно быстрое распространение множественной лекарственной устойчивости среди бактерий благодаря существованию мигрирующих генетических элементов (плазмид, бактериофагов, транспозонов, интегронов, генных кассет), содержащих гены лекарственной устойчивости и имеющих специализированные механизмы их распространения среди бактерий как одного, так и разных видов. Другая проблема — способность бактерий объединяться в сложно организованные сообщества — биопленки, в составе которых они оказываются защищенными от различных стрессовых воздействий, включая лекарственные препараты и средства защиты хозяина.

В таблице 1.1.2 представлены данные, полученные при изучении сравнительной антибиотикорезистентности планктонных и биопленочных бактерий.

Повышенная резистентность биопленочных бактерий к стрессовым воздействиям обусловлена рядом факторов: а) снижением проникновения внутрь биопленки антибактериальных препаратов. Бактерии в биопленке окружены биополимерным матриксом, продуцируемым самими бактериями, который может влиять на эффективность проникновения извне антибактериальных препаратов и других стрессовых факторов. Например, в случае пседомонад показано, что аминогликозидные антибиотики медленнее проникают в образуемые ими биопленки, так как они связываются с внеклеточным полимерным веществом, таким как полисахарид альгинат; б) различиями в метаболической активности клеток бактерий, образующих биопленку. Такие различия возникают благодаря тому, что в пределах биопленки создается градиент по содержанию питательных веществ и кислорода, в результате которого на периферии биопленок находятся активно метаболизирующие, а внутри биопленок — метаболически неактивные клетки. Известно, что мишенями для действия антибиотиков являются активно растущие клетки, так что внутри биопленок бактерии оказываются защищенными от воздействия антибиотиков; в) фенотипической вариабельностью клеток внутри биопленки. В настоящее время получены достоверные данные, что даже при гибели большей части биопленочной популяции бактерий после воздействия антибиотиков сохраняется очень небольшой процент жизнеспособных клеток, способных персистировать, но не передающих по наследству эту способность своему потомству. Специально проведенные исследования показали, что гомогенная популяция выращенных в жидкой культуре клеток содержит такие персистирующие клетки. Этим фенотипом обладает метаболически менее активная субпопуляция, которая всегда присутствует в каждой культуре клеток.

Существуют также генетические факторы, ответственные за уровень устойчивости биопленочных бактерий к стрессовым факторам по сравнению с планктонными клетками. Так, мутация в гене *ndvB* делает биопленки, образуемые *Pseudomonas aeruginosa*, более чем на порядок чувствительнее по сравнению со штаммом дикого типа. Причем показано, что ген *ndvB* экспрессируется только биопленочными клетками и ответствен за синтез периплазматических циклических гликанов. В образовании биопленки и устойчивости к антибиотикам принимает участие также ген *rvrR*, кодирующий регулятор транскрипции ряда генов. Из проб, взятых от больных кистозным фиброзом легких, были выделены мутанты с повреждениями в этом гене, образующие мелкие шероховатые колонии и отличающиеся гипертрофированной способностью образовывать биопленки и устойчивостью к антибиотикам. На устойчивость к антибиотикам у кишечной палочки оказывают влияние F-плазмиды и ряд других конъюгативных плазмид, кодирующих антиген, гомологичный антигену 43.

Все вышесказанное свидетельствует о необходимости более детального исследования процессов формирования биопленок, чтобы разрабатывать новые стратегии борьбы с инфекциями.

В настоящее время доказано участие биопленок в контаминации медицинского имплантируемого оборудования. Проведенные электронно-микроскопические исследования медицинских имплантантов выявили следы биопленок на их абиотических поверхностях. Очевидно, что бактериальные биопленки на искусственных клапанах сердца являются основной причиной эндокардитов у пациентов, подвергавшихся хирургическим операциям на сердце. Каждый год для лечения больных используются миллионы катетеров (сердечных, внутривенных, мочевыводящих и др.), и эти имплантанты служат потенциальными поверхностями для формирования биопленок. Последние образуются и на контактных линзах, часто являясь причиной кератитов. Считается, что в среднем около 60% внутрибольничных инфекций обусловлено биопленками.

Если роль биопленок в инфекциях, связанных с имплантацией, несомненна, то при инфекциях, не связанных с имплантацией, она еще не совсем ясна. Пока известен только один вид легочной инфекции у больных с кистозным фиброзом (КФ), вызываемой *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*, при которой доказана роль образуемой этими родственными бактериями биопленки.

Лица, страдающие этим наследственным заболеванием, очень чувствительны к хроническим легочным инфекциям, вызываемым данными патогенами. Механизм такой чувствительности не известен, но прямым следствием инфекции является сверхактивный воспалительный процесс в легких, который приводит к нарушению их функции и служит причиной высокой смертности пациентов.

Электронно-микроскопические исследования препаратов легких больных, умерших от инфекции, выявили наличие биопленок, образованных бактериями *P. aeruginosa*. Как правило, изоляты *P. aeruginosa* из легких больных КФ характеризуются повышенным синтезом альгината, или ЭПС, который, как было показано выше, является ключевым компонентом экзополимерного матрикса

био пленки, защищающим образующие био пленку бактерии от антимикробного воздействия.

Известно, что изменения в уровне и спектре экспрессии генов возбудителя инфекции в ответ на сигналы организма-хозяина является необходимым атрибутом инфекции. Инфекционные заболевания часто являются результатом сложного взаимодействия между патогеном и хозяином, примером которого является и очень тяжелая легочная инфекция у больных КФ. Как правило, при инфекции на фоне кистозного фиброза из мокроты больных выделяют не только *V. septicus* и *P. aeruginosa*, но и разных представителей индигенной (непатогенной) флоры.

Для того чтобы понять роль взаимодействия между патогенами и резидентной микрофлорой и его влияние на характер экспрессии генов патогенных бактерий, было исследовано взаимодействие между патогенными штаммами *P. aeruginosa* и непатогенными штаммами орофарингиальной флоры (ОФ), выделенными из мокроты больных КФ, на модели легочной инфекции у крыс и *in vitro*. Эксперименты, выполненные на лабораторных крысах, показали, что микробы ОФ сами не вызывают повреждений легочной ткани, но могут усиливать повреждения при совместном заражении легких бактериями *P. aeruginosa* вне зависимости от концентрации последних.

Этими же исследователями была сконструирована библиотека промоторов генов *P. aeruginosa*, содержащая люминесцентный ген-репортер, что позволило следить за генной активностью в таких образцах. В результате было показано, что в присутствии в исследуемых образцах непатогенной флоры происходит индукция экспрессии некоторых генов *P. aeruginosa* и в частности генов эластазы и экзотоксина, являющихся факторами патогенности этого возбудителя. Более того, было показано, что аутоиндуктор АИ-2, сигнальная молекула регуляторной системы бактерий «кворум сенсинг», обеспечивающая межвидовой сигнал, также индуцирует экспрессию генов вирулентности. И хотя бактерии *P. aeruginosa* не синтезируют АИ-2, представители ОФ синтезируют его в достаточных количествах. Таким образом, было получено двойное доказательство того, что бактерии ОФ вносят вклад в патогенез КФ за счет межвидовых регуляторных сигналов.

Таблица 1.1.2

**Чувствительность к антибиотикам патогенных бактерий, свободно растущих в жидкой среде и в составе био пленки**

Микроорганизм	Антибиотик	В жидкой среде, МИК*, мкг/мл	Био пленка, МИК*, мкг/мл
<i>S.aureus</i>	Ванкомицин	2	20
<i>E.coli</i>	Ампициллин	2	512
<i>P.pseudomallei</i>	Цефтазидимин	8	800
<i>S.sanguis</i>	Доксициклин	0,063	3,15

\* Минимальная ингибирующая концентрация

Ранее было показано, что добавление АИ, синтезируемых *P. aeruginosa*, к клеткам *V. seraciac* индуцирует у последних экспрессию факторов вирулентности. Эти данные, наряду с представленными выше, показывают, что межвидовое общение помогает смешанным популяциям патогенных *V. seraciac* и *P. aeruginosa* координированно регулировать продукцию факторов вирулентности и способствует прогрессированию заболевания как при одиночной, так и при совместной инфекции.

Для контроля за вспышками легочной инфекции больные КФ обычно получают профилактический курс макролидных антибиотиков, который, как правило, облегчает течение инфекции, несмотря на резистентность к ним бактерий *P. aeruginosa*. С позиций вышеприведенных данных терапевтический эффект может быть объяснен действием макролидов на нормальную ОФ в легких, что приводит к подавлению синтеза АИ-2 этими бактериями и соответственно транскрипционного сигнала к синтезу факторов патогенности бактериями *P. aeruginosa*.

## Заключение

О существовании бактерий в составе биопленок, прикрепленных к твердым поверхностям, известно давно, но только в последние годы благодаря осознанию значения такого сообщества бактерий в медицине и других хозяйственных областях его исследованию стало уделяться большое внимание. Накопленные к настоящему времени знания о социальных взаимоотношениях бактерий позволили взглянуть на них с позиций поведения многоклеточных организмов, что по существу изменило наши представления о микробиологии.

Биопленки оказались высоко организованными бактериальными сообществами, образуемыми бактериями одного или нескольких видов как активно функционирующих, так и покоящихся, или некультивируемых клеток. Для формирования и существования биопленок, состоящих из бактерий одного или нескольких видов, необходимы сложные межклеточные взаимодействия, контролируемые различными регуляторными системами, включающимися в ответ на сигналы внешней среды и направленными на сохранение их структуры, ответственной за коммуникацию бактериальных клеток. Таким образом, для бактерий, входящих в состав биопленок, характерно социальное поведение.

Сравнение профилей информационной РНК и белков, образующихся в клетках одних и тех же планктонных и биопленочных бактерий, а также бактерий, находящихся в составе биопленки на разных стадиях ее развития, выявило значительные различия в числе активированных и ингибированных генов между группами бактерий, т.е. показало, что экспрессия генов является дифференцированной. Более того, было установлено, что такая дифференцированная экспрессия генов наблюдается в клетках бактерий, находящихся в разных участках биопленки, а это свидетельствует о способности отдельных членов бактериального сообщества выполнять разные функции, обеспечивая повышенную выживаемость всего сообщества.

Изучение биопленок и сигнальных генетических систем, регулирующих их формирование, направлено на поиск мер профилактики и защиты от патогенных микроорганизмов, создание новых классов антибактериальных препаратов. Например, в экспериментах, проведенных на *E. coli*, *P. aeruginosa* и *V. serotia*, уже выявлены некоторые ингибиторы сигнальных систем, при действии которых бактерии не способны образовывать биопленочные структуры. Другой путь — создание модифицированных аналогов аутоиндукторов систем QS, которые легко могут быть синтезированы, так как их структура хорошо известна. Такие модифицированные аутоиндукторы должны быть неактивными как индукторы генов, но эффективны, как ингибиторы. Преимущества создания такого типа препаратов заключаются в том, что все известные к настоящему времени аутоиндукторы являются низкомолекулярными соединениями, которые легко модифицировать. Аутоиндукторы высоко специфичны во взаимодействии с мишенью — белками-сенсорами, синтезирующимися в патогенных бактериях. Благодаря высокой специфичности и легкому проникновению через мембрану таких препаратов облегчается задача их адресной доставки.

## 1.2. L-формы бактерий

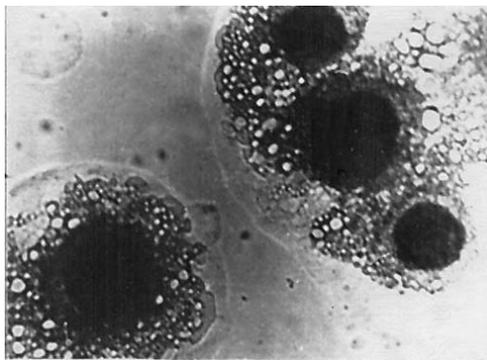
Явление L-трансформации бактерий впервые было описано E. Klieneberger в 1935 г. Свое название L эти формы получили в честь Листеровского института в Лондоне, где они были открыты. С тех пор накопилось большое количество данных, свидетельствующих о том, что L-форма — это одна из форм существования бактерий в природе.

В нашей стране проблема L-трансформации бактерий изучалась В.Д. Тимаковым, Г.Я. Каган, С.В. Прозоровским и их многочисленными учениками и последователями. По мнению исследователей, эта проблема имеет два аспекта: общебиологический и медицинский. Общебиологический аспект определяется принципиальной возможностью существования бактерий в виде обычных бактериальных форм с клеточной стенкой и L-форм, лишенных ее.

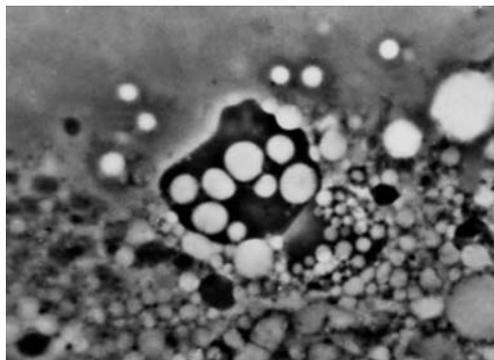
Медицинский аспект определяется ролью L-форм в инфекционном процессе.

Феномен L-трансформации наблюдается у многих бактерий, касается различных признаков и свойств и у разных видов бактерий довольно однотипен. По результатам гибридизации нуклеиновых кислот и по нуклеиновому составу выявляется родство L-форм с исходными бактериями.

L-формы бактерий, частично или полностью лишены клеточной стенки и имеют только цитоплазматическую мембрану. Колонии L-форм разных видов бактерий сходны по морфологии. Некоторые вариации зависят от фазы роста, условий и среды культивирования, но не от видовых особенностей. Как правило, колонии имеют нежный, ажурный, сильно вакуолизированный край и врастающий в агар центр (рис. 1.2.1). Они хорошо видны невооруженным глазом. Микроструктурные



**Рис. 1.2.1.** Колонии L-форм стрептококка



**Рис. 1.2.2.** Микроструктурные элементы колонии L-форм стрептококка

элементы колоний разнообразны: 1) сферические тела, варьирующие по форме, размеру и оптической плотности; 2) элементарные тельца или гранулы, лежащие свободно или внутри сферических тел и вакуолей; 3) аморфные бесструктурные массы различной конфигурации; 4) извитые и нитевидные структуры (рис.1.2.2).

L-формы могут быть стабильными, т.е. способными сохраняться и перевиваться независимо от наличия в среде L-трансформирующих агентов, что связано с необратимой утратой определенных звеньев биосинтеза клеточной стенки и в первую очередь основных компонентов пептидогликана — диаминопимелиновой и мурановой кислот. У них нарушается синтез глюкозамина. Иногда рост стабильных L-форм зависит от трансформирующего агента (например, у пенициллинозависимых L-форм стрептококка). Нестабильные L-формы при культивировании на средах без L-трансформирующего фактора реверсируют в исходные бактерии.

Патогенность стабильных L-форм может быть обусловлена как сохранением способности продуцировать некоторые факторы патогенности, так и приобретением новых факторов патогенности. Патогенность нестабильных L-форм связана с их способностью реверсировать в исходные патогенные виды и индуцировать развитие хронических инфекционных процессов.

Способность стабильных L-форм вызывать инфекционный процесс показана на различных экспериментальных моделях (менингоэнцефалит кроликов, ангина обезьян, экспериментальный листериоз ягнят и кроликов).

L-формы удавалось выделять из крови и органов больных людей при инфекционных процессах, вызванных бактериальными формами. Во всех случаях отмечали длительную персистенцию возбудителя и, как правило, менее тяжелое, но хроническое течение заболевания.

В качестве примеров инфекционных процессов, вызываемых стабильными L-формами, можно привести следующие:

*Туберкулезная инфекция.* Было показано, что от больных туберкулезом L-формы выделяют в виде чистых культур при полном отсутствии классических

бактериальных форм. Выделенные культуры длительно пассировались на искусственных питательных средах и в организме морских свинок, часть из них реверсировала в бактериальные формы. При исследовании остаточных туберкулезных изменений у людей (60 случаев) у 75% пациентов возбудитель персистировал в виде L-формы.

*Стрептококковая инфекция.* При септическом эндокардите и ревмокардите от больных часто выделяли L-формы стрептококка. При экспериментальном инфицировании обезьян стабильными L-формами гемолитического стрептококка группы А наблюдали ангину, длительную персистенцию возбудителя и подъем титров специфических антител в крови. У белых мышей, инфицированных L-формами стрептококка, отмечали прогрессирующие патологические изменения в миокарде и развитие гломерулонефрита. Антигены L-форм обнаруживали в сердце, почках и особенно часто в лимфоидной ткани в течение 1 года (срок наблюдения).

*Брюшнотифозная инфекция.* При экспериментальной брюшнотифозной инфекции кроликов через 6–18 месяцев после заражения от всех животных выделяли бактерии с дефектом клеточной стенки (измененные и увеличенные бактериальные клетки, нестабильные культуры L-форм), частота их выделения из разных органов была в 3–8 раз выше, чем типичных бактерий. Таким образом было показано, что в процессе брюшнотифозной инфекции и бактерионосительстве имеет место образования L-форм.

*Другие инфекции.* Для возбудителей ряда других инфекций (менингококка, гонококка, сальмонелл, листерий, вибриона холеры) показана возможность существования в организме больных в виде L-форм. Однако, если в случае возбудителя туберкулеза и стрептококковой инфекции значение L-форм в их персистенции не вызывает сомнений, то в отношении других микроорганизмов этот вопрос остается нерешенным. Так, в экспериментах на животных и при изучении материала от больных исследователи часто встречались со смешанными популяциями бактерий и их L-форм, что значительно усложняло выяснение собственной роли L-форм в персистенции и инфекционном процессе. Отсутствие универсальной селективной модели для активного размножения, накопления биомассы и трудности выделения L-форм от больных затрудняют решение вопроса об их роли в персистенции возбудителей. Существуют большие методические трудности в решении вопроса о роли L-форм в инфекционном процессе, вызванном различными возбудителями. Система доказательств является достаточно сложной и требует усовершенствования и унификации.

Для выделения, индукции и культивирования L-форм необходимо правильно подобрать питательные среды и защитить L-формы от осмотического лизиса.

Обычно для L-трансформации используют полутвердые (1,3%) и полужидкие (0,3%) среды. Значительно реже индукция происходит в жидкой среде. Универсальных сред для получения L-форм разных видов бактерий не существует. Состав сред и условия культивирования (температура, длительность, условия аэро- или анаэробноза, либо культивирование в атмосфере углекислого газа) зависят от вида исходных бактерий.

Для индукции L-форм большое значение имеет состав и концентрация солей, стабилизирующих осмотическое давление среды. Для L-форм грамотрицательных бактерий обычная концентрация NaCl в среде составляет 0,5%, для грамположительных бактерий требуется повышенное содержание веществ, стабилизирующих осмотическое давление. В отдельных случаях L-формы можно получить на среде с осмотическими стабилизаторами в отсутствие L-трансформирующего фактора.

Универсальным фактором индукции L-форм является пенициллин. Другие антибиотики оказывают избирательное трансформирующее действие в зависимости от видовой принадлежности микроорганизма. Так, бацитрацин вызывает индукцию L-форм стрептококков. Бацитрацин, ванкомицин и ристоциетин индуцируют образование L-форм *N. meningitidis*. Тетрациклин, канамицин и хлорамфеникол не вызывают образование L-форм.

Индукцию L-форм могут вызвать лизин и лизоцим, антисыворотка и комплемент, некоторые аминокислоты, при этом концентрация аминокислот варьирует в зависимости от вида бактерий.

Сульфаниламиды, соли ртути, кадмия, хрома, лития и многие антисептические вещества, в том числе фенол и формальдегид, не вызывают индукции L-форм. L-формы в небольших количествах могут возникать в популяции как бы спонтанно без видимых внешних воздействий. Предполагается, что трансформация в этих случаях может быть вызвана продуктами метаболизма, накопившимися в среде культивирования.

Основными средами выделения и дальнейшего культивирования L-форм являются триптический перевар мяса, сердечной мышцы крупного рогатого скота, стандартная среда PPLO-агар, экстракт мозга и сердца (см. 32.2.2.26); в качестве дополнительных факторов роста — дрожжевой гидролизат, печеночный и яичный экстракты. В качестве обязательного компонента используют сыворотку крови лошади или кролика.

Накопленные данные о частоте L-трансформации у разных видов бактерий, однотипность и закономерный характер изменений биосинтетических процессов, морфологических и физиологических признаков, передающихся по наследству, значительно расширяют наши представления об изменчивости бактерий и патогенетическом значении L-форм.

### **1.3. Некультивируемые формы патогенных бактерий: феномен и способы их выявления в объектах окружающей среды**

Микробиологам давно было известно, что количество бактерий, высеваемых на чашки из образцов, взятых из естественных источников, значительно ниже того, что можно определить прямым микроскопическим анализом. В конце 70-х годов

было разработано несколько методов, позволивших определить количество жизнеспособных клеток в популяции бактерий без их культивирования на питательных средах. Эти методы позволили количественно подтвердить несоответствия при разных способах оценки титра бактерий и продемонстрировать, что многие из таких некультивируемых клеток в действительности являются живыми и способными к активному метаболизму. Разработка этих методов стимулировала дальнейшие исследования, которые и привели к пониманию того, что многие бактерии в ответ на разные стрессовые условия окружающей среды могут терять способность расти на привычных для них питательных лабораторных средах, но, при этом, сохранять жизнеспособность. Окружающая среда, в которой могут существовать многие патогенные бактерии вне организма хозяина, может сильно ограничивать рост клеток. Это бывает связано с неоптимальными для размножения бактерий физико-химическими характеристиками: температурой, рН, осмотическим давлением, концентрацией ионов металла, а также с низкой концентрацией питательных веществ, необходимых для синтеза органических веществ клетки. При общем дефиците питательных веществ и отсутствии возможности переключения метаболизма с одного субстрата на другой у бактерий работают специальные регуляторные механизмы генной активности, дающие им возможность выживать в подобных условиях. Но что происходит, если крайне неблагоприятные условия сохраняются и индукция стрессовых генов не в состоянии спасти клетку? До недавнего времени считалось, что у грамотрицательных бактерий следующей стадией является гибель клетки. Но к 90-м годам прошлого века появилось достаточно экспериментальных данных, позволивших утверждать, что это не так. Оказалось, что грамотрицательные бактерии так же, как и грамположительные, для которых уже был известен процесс спорообразования, способны к переходу в состояние «покоя», выражающееся во временной потере воспроизводимости клеток. Первое экспериментальное доказательство способности патогенных бактерий находиться в таком «некультивируемом» состоянии было получено в лаборатории R. Colwell в США. Авторы использовали один из методов подсчета бактерий, не требующий культивирования, и показали, что клетки *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli* после инкубации в морской воде сохраняют свою жизнеспособность, хотя и теряют способность к образованию колоний на средах, рутинно используемых для культивирования этих бактерий. С тех пор подобное состояние покоя с временной потерей воспроизводимости у грамотрицательных бактерий, впервые обнаруженное в лаборатории R. Colwell в 1982 году, было предложено называть «некультивируемым» (НС), а сами бактерии в таком состоянии «некультивируемыми формами» (НФ). Таким образом, НС можно определить как состояние бактерий, клетки которых сохраняют низкую метаболическая активность, недостаточную для непрерывного клеточного деления, необходимого для роста в жидких или на плотных средах, в норме поддерживающих рост этих бактерий. Определение явления некультивируемости обязательно подразумевает обратимость этого процесса, то есть восстановление способности к активному метаболизму и размножению при смене неблагоприятных условий существования бактерий на благоприятные. Несмотря на то, что подобное состояние

покоя (спорообразование) уже давно было показано для грамположительных бактерий, для грамотрицательных бактерий оно было неизвестно — считалось, что отсутствие высеваемости бактерий говорит об их отмирании. После того, как стало ясно, что многие представители патогенных бактерий, вызывающие в том числе и особо опасные заболевания, могут находиться в таком состоянии, феномен образования бактериями некультивируемых форм стал привлекать пристальное внимание исследователей. Стало ясно, что способность к образованию некультивируемых форм патогенными бактериями, по-видимому, обеспечивает им сохранение вида в межэпидемические и межэпизоотические периоды. В настоящее время способность к переходу в некультивируемое состояние уже обнаружена у широкого круга патогенных бактерий и в таблице 1.3.1 представлен их перечень.

Долгое время велась дискуссия о том, сохраняют ли бактерии в НФ свой исходный патогенный потенциал. Наилучшим доказательством сохранения и жизнеспособности, и патогенного потенциала является заражение некультивируемыми формами бактерий чувствительных лабораторных животных. Прямые доказательства вирулентности НФ получены при введении инокулята *V. cholerae* и энтеротоксигенных *E. coli* в перевязанную петлю кишечника кролика. НФ *Legionella pneumophila*, как и нормальные вегетативные клетки, высевались из желточного мешка при инокулировании их в куриные эмбрионы. Введение некультивируемых клеток *V. vulnificus* мышам, приводило к гибели животных, что также позволило заключить, что НФ *V. vulnificus* остаются вирулентными и способны вызывать фатальную инфекцию после рекультивации *in vivo*. Суспензией *Campylobacter jejuni*, находящегося в НС в течение 6 мес., были напоены мыши, в результате чего был зарегистрирован инфекционный процесс с летальным исходом и без него, с выделением культуры *C. jejuni* из органов подопытных животных, не отличающиеся от исходных штаммов в культивируемой форме. Главной трудностью при моделировании инфекционного процесса такого рода является доказательство того, что в животную систему инокулируются действительно некультивируемые клетки, а не смесь НФ и отдельных неучтенных клеток, не перешедших в НС. В каждом случае авторами предпринимались различные способы доказательства того, что заражение осуществлялось суспензией, состоящей из некультивируемых форм. Способность НФ сальмонелл к рекультивации в организме чувствительного хозяина и сохранение патогенного потенциала у покоящихся форм была доказана и нами путем внутрибрюшинного введения суспензий НФ мышам, приводившего к гибели животных или размножению бактерий в селезенке и печени лабораторных животных (Романова Ю.М. 1998).

Таким образом, представленные выше данные по переходу бактерий различных таксономических групп в покоящееся (некультивируемое) состояние демонстрируют универсальность этого механизма адаптации патогенных бактерий к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. Сегодня можно утверждать, что обратимый переход бактерий в покоящееся некультивируемое состояние в окружающей среде (почвах, водоемах и пр.) есть адаптивная изменчивость, вызванная сезонными или непериодическими изменениями условий

существования бактерий. Неблагоприятные экологические факторы (абиотические, биотические) в определенных условиях и сочетаниях являются причиной перехода бактерий от активной жизнедеятельности (вегетативные формы) к состоянию анабиоза (покоящиеся формы – споры споробразующих или некультивируемые формы неспорообразующих бактерий). Покоящиеся формы как споробразующих так и неспорообразующих бактерий характеризуются морфологическими изменениями, выражающимися в уплотнении клеточной оболочки и цитоплазмы, принятии клетками кокковидной формы, резко сниженным уровнем метаболизма, утратой способности к размножению при полном или частичном сохранении патогенного потенциала. Благоприятные условия существования стимулируют обратный процесс. Благоприятствующие факторы среды – абиотические (оптимальная температура, достаточность питательных субстратов и др.) и биотические (наличие хозяев, симбионтов и др.) – стимулируют реверсию покоящихся форм в вегетативное состояние с восстановлением активной жизнедеятельности и размножения бактерий. После разработки и применения новых микроскопических, микробиологических и молекулярно-биологических методов исследования, было показано, что большинство бактерий существует в окружающей среде в виде микробиологических сообществ (биопленок), образуемых на самых разных биотических и абиотических поверхностях. Господство биопленок было установлено во всех природных экосистемах за исключением глубоких подземных вод и глубоководных океанов. В составе таких сообществ, состоящих из представителей различных видов микроорганизмов, обнаружены и некультивируемые формы членов сообщества.

Таким образом, экологическая мотивация и генетические механизмы обратимого перехода бактерий в покоящееся состояние в принципе сходны у споробразующих и неспорообразующих бактерий. То, что обычно трактовалось как отмирание патогенных бактерий, если они переставали бактериологически выявляться, зачастую оказывается переходом в покоящееся состояние. Экологический смысл и адаптивный характер такой изменчивости бактерий, особенно при резкой смене условий существования в почвах и водоемах умеренных или высоких широт, вполне очевидны.

Эпидемиологическая (эпизоотологическая) значимость обратимого перехода патогенных бактерий в покоящееся состояние несомненна, учитывая цикличность и дискретность эпидемий (эпизоотий). Покоящиеся (некультивируемые) формы обеспечивают сохранение популяции возбудителя инфекции в почвах и водоемах на протяжении межэпидемических (межэпизоотических) периодов – сезонных и даже многолетних, когда его активная циркуляция среди людей или естественных хозяев в природных очагах невозможна или крайне затруднена. Можно полагать, что переход в покоящееся состояние – один из основных механизмов, обеспечивающих сохранение возбудителя инфекций в окружающей среде на протяжении межэпизоотических и межэпидемических сезонов (периодов), а значит, эндемичность очаговых территорий.

Таблица 1.3.1

**Бактерии, для которых показана способность к переходу  
в некультивируемое состояние**

<b>Вид бактерий</b>	<b>Автор</b>
Aeromonas salmonicida	Morgan et al., 1993; Byrd et al., 1991
Agrobacterium tumefaciens	Byrd et al., 1991; Manahan 1997
Arthrobacter globiformis	Демкина и др., 2000
Campylobacter coli	Jacob et al., 1993
Campylobacter jejuni	Rollins and Colwell, 1986
Суанобактерия	Moller, 1997
Enterobacter aerogenes	Byrd et al., 1991
Enterococcus faecalis	Barcina et al., 1990
Escherchia coli	Xu et al., 1982; Linder and Oliver, 1989
Francisella tularensis	Романова и др., 2000
Helicobacter pylori	Shahamat et al., 1993
Klebsiella pneumoniae	Byrd et al., 1991
Legionella pneumophila	Hussong et al., 1987
Listeria monocytogenes	Пушкарева и др., 1997
Micrococcus flavus	Byrd et al., 1991
Pasteurella multocida	Thomson et al., 1992
Pseudomonas flavus	Byrd et al., 1991
Pseudomonas fluorescens	Duncan et al., 1994; van Overbeek, 1995
Pseudomonas putida	Morgan et al., 1989
Pseudomonas syringae	Wilson and Lindow, 1992
Pasteurella piscicida	Magarinos et al., 1994
Rhizobium leguminosarum	Manahan and Steck, 1997
Salmonella enteritidis	Rozsak et al., 1984
Salmonella typhi	Cho and Kim, 1999
Salmonella typhimurium	Аксенов и др., 1994
Shigella sonnei, flexneri	Colwell et al., 1985
Shigella dysenteriae	Islam et al., 1993
Staphylococcus aureus	Diaper, 1994; Watson et al., 1998
Streptococcus faecalis	Byrd et al., 1991
Vibrio anguillarum	Hoff, 1989
Vibrio campbelli	Wolf and Oliver, 1992
Vibrio cholerae	Xu et al., 1982; Wolf and Oliver, 1992
Vibrio harveyi	Duncan et al., 1994
Vibrio mimicus	Wolf and Oliver, 1992
Vibrio natrigens	Wolf and Oliver, 1992
Vibrio parahaemolyticus	Wolf and Oliver, 1992
Vibrio proteolyticus	Wolf and Oliver, 1992
Vibrio salmonicida	Hoff, 1989
Vibrio vulnificus	Linder and Oliver, 1989
Yersinia pseudotuberculosis	Аксенов и др., 1995
Yersinia pestis	Сучков и др., 1997

*Цит. по Литвин и др., 1998.*

Выявление и обнаружение некультивируемых форм бактерий различных видов стало возможным благодаря разработке и применению ряда методов, позволяющих определять жизнеспособные клетки в популяции без их культивирования на питательных средах (табл.1.3.2). Одним из первых разработанных методов является метод прямого подсчета клеток при окрашивании их красителем акридиновым оранжевым и просмотре в флуоресцентном микроскопе, предложенный Hobbie J.E. с соавт. в 1978 году. Наиболее широко распространенным методом для определения клеток в НС является метод прямого подсчета жизнеспособных клеток (DVC — direct viable count, англ.), разработанный К. Когге с соавт. в 1979. При этой процедуре к исследуемой бактериальной популяции на несколько часов инкубации добавляются в небольших количествах питательные вещества, обычно дрожжевой экстракт, и ингибитор синтеза ДНК — налидиксовая кислота. Если клетки реагируют на добавление питательных веществ, они начинают увеличиваться в размере, но поскольку деление их непосредственно связано с синтезом ДНК, который подавляется налидиксовой кислотой, они не делятся. В результате при микроскопическом исследовании можно четко видеть и подсчитать количество таких укрупненных клеток.

Проведенные в последнее время исследования по сравнению некоторых методов определения жизнеспособности клеток позволили выявить хорошую корреляцию между методом «прямого подсчета», гетеротрофной активностью клеток из природных образцов и метаболической активностью, определенной путем микроавторадиографии (Roszak, Colwell, 1987). Надо учитывать лишь то, что бактерии ряда видов устойчивы к налидиксовой кислоте, как, например, *Aeromonas salmonicida* и *Legionella pneumophila*.

Следующий метод для демонстрации жизнеспособности клеток основан на использовании INT (p-iodonitrotetrazolium violets) — акцептора электронов, извлекающего их из активной электронно-транспортной цепи (Zimmerman et al., 1978). Восстановление растворимого INT в метаболизирующих клетках приводит к образованию нерастворимого INT-формаза, вызывающего видимую преципитацию в клеточной мембране. Этот метод позволяет значительно быстрее получить результат, так как в отличие от DVC не требуется длительной инкубации клеток с INT. Однако при длительном пребывании клеток в НС и уменьшении их размеров, иногда довольно затруднительно идентифицировать INT-преципитаты, и необходимо переходить на другие методы, например DVC.

Наиболее перспективным в исследовании НФ в объектах внешней среды может быть метод, комбинирующий метод DVC с добавлением специфических моноклональных антител (МА) (Roszak et al., 1987). Применение этого метода позволяет определить количество жизнеспособных клеток наряду с идентификацией видовой принадлежности бактерий. Но антигенные изменения в клеточной стенке, происходящие в процессе образования НФ, иногда искажают картину специфического взаимодействия бактерий с МА.

Для идентификации НФ природно люминесцентных бактерий, например, *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora* стал широко применяться метод

Таблица 1.3.2

**Методы, используемые для выявления  
и идентификации НФ бактерий**

<b>Методы</b>	<b>Комментарий</b>
Прямого подсчета жизнеспособных клеток (DVC)	Не универсален, ограничения из-за резистентности бактерий ряда видов к определенным антибиотикам. Создание дифференциального и комбинированного DVC
Прямого подсчета клеток с использованием флуоресцентных красителей и эпифлуоресцентной микроскопии: – акридиновый оранжевый; – изотиоцианат; – эукризин	Невозможность или трудность дифференциации живых и мертвых клеток
Методы, основанные на извлечении электронов из электронно-транспортной цепи жизнеспособных клеток (INT-метод, CTC-метод)	Не требует длительной инкубации клеток, позволяет выявлять только живые метаболизирующие клетки. Затруднен при длительном пребывании клеток в НС
Иммунофлуоресценция: прямая иммунофлуоресценция; непрямая иммунофлуоресценция; метод DVC с добавлением специфических моноклональных антител (МА)	Ограничения: неспецифическая адсорбция флуоресцирующих антител, авто-флуоресценция субстратов внешней среды, возможность искажения специфического взаимодействия бактерий с МА из-за изменений в клеточной стенке в процессе образования НФ
Люминометрия	Идентификация только природно люминесцентных бактерий и бактерий с введенным lux геном
Метод, использующий в качестве репортерной системы gfp ген	Для бактерий, маркированных gfp геном
Проточной флуоресцентной цитометрии	Очень высокая стоимость оборудования и реактивов
Молекулярно-генетические: – ДНК-ДНК гибридизация; – ПЦР; – ОТ-ПЦР; – конкурирующая ПЦР; – ПЦР-анализ на основе 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы; – метагеномный анализ природных популяций	Высокая чувствительность и специфичность. Универсальность. Постоянное совершенствование и развитие различных модификаций методов позволяет решать большой спектр научных и прикладных задач, связанных с НФ. <i>Исследование с помощью ПЦР и других молекулярных методов суммарного генофонда популяций с использованием информационных баз данных</i>

люминометрии (Duncan et al., 1994). Этот метод можно использовать и для тестирования бактерий, которым генно-инженерными методами переданы гены, кодирующие комплекс ферментов люцеферин-люцеферазы.

В настоящее время разработан и, по-видимому, будет получать повсеместное распространение метод жидкостной флюороцитометрии, позволяющий за счет комбинации красителей и специально разработанных компьютерных программ выявлять одновременно общее количество клеток в исследуемой популяции, а также процентный состав мертвых, живых и некультивируемых, но жизнеспособных клеток (G.Nebe-von-Caron, 2000). Несмотря на предположение, что этот метод должен заменить в ближайшем будущем столь любимые микробиологами чашки Петри, повсеместному его распространению в микробиологических исследованиях разного типа мешает огромная дороговизна необходимого оборудования и не менее дорогостоящих реактивов.

В последнее время для выявления бактерий в любой форме существования широко применяются молекулярно-генетические методы, и, в первую очередь, полимеразная цепная реакция (ПЦР). Методический подход на основе ПЦР позволяет обойти основную трудность, связанную с тестированием бактерий, находящихся в НС, так как дает возможность заменить размножение бактерий как таковых, амплификацией видоспецифичного для данной бактерии фрагмента ДНК. В качестве исследуемых образцов для выявления НФ методом ПЦР можно брать любые биологические жидкости, клетки, ткани и пробы из внешней среды (водных источников и почвы), причем содержащие не только свежую ДНК, но и высушенные и мумифицированные ткани, содержащие фрагментированную ДНК. Используя данный подход, успешно выявляли НФ *V. vulnificus*, *L. pneumophila*, *S. dysenteriae*, *H. pylori*, *V. cholerae*, *Y. pestis*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*.

Однако, некоторые исследователи считают не вполне правомочным использование метода классической ПЦР для выявления НФ бактерий из-за возможности индикации не только жизнеспособных некультивируемых клеток, но и мертвых клеток, содержащих генетический материал. Методом, исключающим этот недостаток, является сочетание ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Маркером присутствия и жизнеспособности бактерий в этом случае является коротко живущая специфичная для каждого гена молекула мРНК, наличие которой в клетках является показателем его активности. По наличию информационной мРНК изучаемого гена в полученном из образца суммарном препарате всей клеточной РНК можно судить о его активности, а, следовательно, о жизнеспособности искомых бактерий. С помощью метода ОТ-ПЦР успешно выявляли НФ *V. cholerae*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *Enterococcus* spp., *S. typhimurium*. При этом, можно использовать те же самые тест-системы, которые используются и для идентификации бактерий в нормальном активном состоянии.

Молекулярно-генетические методы постоянно совершенствуются и в настоящее время стало возможным оценивать разнообразие микроорганизмов в различных средах обитания не только без предварительного культивирования, но и без поиска видоспецифических фрагментов. Такой метод получил название метагеномного

анализа состава бактериального сообщества, существующего как в окружающей среде, так и в организме хозяина, например, при исследовании нормальной микрофлоры кишечника. В таких случаях из образца выделяется суммарная ДНК и амплифицируются гены, кодирующие рибосомальные РНК (рРНК). В настоящее время признано, что рРНК являются лучшими мишенями как для изучения филогенетических взаимоотношений, так и для идентификации микроорганизмов. Это объясняется тем, что они присутствуют во всех бактериях, находящихся в активном и в некультивируемом состояниях, и в большом количестве копий на клетку. Они функционально константны и состоят как из высоко консервативных, так и из сильно варьируемых доменов. В настоящее время для подавляющего большинства представителей микроорганизмов уже существуют банки данных для многих известных последовательностей самих рРНК и генов, их кодирующих. К примеру, секвенирование 16S РНК с помощью консервативных праймеров и обратной транскриптазы дало большой толчок исследованиям филогении и затем идентификации микроорганизмов. В настоящее время эта техника практически полностью заменена прямым секвенированием части или практически полных 16S или 23S рДНК молекул с использованием техники ПЦР и соответствующих праймеров. В международных базах данных представлены все опубликованные и даже неопубликованные частичные или полные последовательности генов для рРНК. Сегодня выполнены сотни подобных работ, исследованы различные экологические ниши, такие как биопланктон, морские осадки, почвы, горячие источники, пресные озера и т.п. При этом во многих случаях обнаруживаются новые флотипы, т.е. последовательности рРНК, принадлежащие к новым видам и типам микроорганизмов, большинство из которых еще не описано. Эти микроорганизмы можно назвать истинно некультивируемыми, так как для них действительно не описано еще сред, на которых можно продемонстрировать их рост в лабораторных условиях. Такие микроорганизмы надо отличать от некультивируемых форм хорошо известных бактерий, перечень которых представлен в таблице 1.3.1. Общее число прокариотических организмов, обитающих в почвах, водах и океанах, по предварительным оценкам составляет 150–200 тысяч различных видов, однако описано к настоящему времени не более 5000 видов. На основании этих данных получается, что нам вообще удастся культивировать примерно 1% микроорганизмов из природных источников. По-видимому, природная популяция микроорганизмов представлена как пока неизвестными нам видами микроорганизмов, которые не могут расти на тех средах и в тех условиях, в которых мы хотели бы их культивировать, так и известными, описанными видами, находящимися в естественных условиях обитания в активном вегетативном или некультивируемом состояниях.

В НИИЭМ им. Гамалеи проводилось системное исследование феномена образования некультивируемых форм патогенными бактериями и получены результаты, отличающиеся принципиальной новизной и значимостью: описаны покоящиеся (некультивируемые) формы у многих неспорообразующих бактерий, в том числе патогенных для человека, дана разносторонняя характеристика условий,

способствующих образованию некультивируемых форм, разработаны методы их идентификации, основанные на ПЦР и ОТ-ПЦР, показан генетический контроль их образования, доказана возможность сохранения вирулентности покоящимися формами, а также их реверсии в вегетативное состояние (Гинцбург, Романова, 1997; Литвин и др., 1998, 2000).