Оглавление

Предисловие к изданию на русском языке 7
Предисловие к девятому изданию на английском языке 8
Предисловие к первому изданию на английском языке 9
Участники издания 10
Список сокращений 12

ЧАСТЬ 1. ВВЕДЕНИЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКУЮ МИКРОБИОЛОГИЮ 17
Глава 1. Общие сведения о фармацевтической микробиологии (*Брендан Ф. Гилмор, Стивен П. Дениер*) 19

ЧАСТЬ 2. БИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ 27
Глава 2. Фундаментальные особенности микробиологии (*Норман Ходжес, Стивен П. Дениер*) 29
Глава 3. Бактерии (*Дэвид Эллисон*) 43
Глава 4. Грибы (*Кевин Кавана*) 62
Глава 5. Вирусы и другие неклеточные возбудители инфекций: характеристики и контроль (*Тимофей Скворцов, Жан-Ив Миллард*) 77
Глава 6. Простейшие (*Тим Пейдж*) 111

ЧАСТЬ 3. ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И ОТВЕТ ОРГАНИЗМА-ХОЗЯИНА 131
Глава 7. Принципы патогенности микроорганизмов и эпидемиология (*Дэвид Эллисон, Эндрю Дж. Макбейн*) 133
Глава 8. Микробные биопленки: последствия для здоровья (*Брендан Ф. Гилмор*) 144
Глава 9. Иммунология (*Марк Гумблтон, Мэтью В. Смит*) 154
Глава 10. Вакцинация и иммунизация (*Гэвин Дж. Хамфрис, Эндрю Дж. Макбейн*) 180

ЧАСТЬ 4. НАЗНАЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ И БОРЬБА С ИНФЕКЦИЕЙ 195
Глава 11. Антибиотики и синтетические антимикробные средства: свойства и использование (*Брендан Ф. Гилмор*) 197
Глава 12. Механизмы действия антибиотиков и синтетических противоинфекционных средств (*Питер Ламберт*) 234
Глава 13. Устойчивость бактерий к антибиотикам (*Брендан Ф. Гилмор, Стивен П. Дениер*) 249
Глава 14. Клиническое применение антимикробных препаратов (*Хейли Викенс, Конор Джеймисон*) 271
Глава 15. Назначение антибиотиков и разумное использование антимикробных средств (*Ребекка Крейг*) 286
Глава 16. Профилактика и лечение инфекций: внутрибольничные инфекции (*Элейн Клаутман-Грин*) 299

ЧАСТЬ 5. КОНТАМИНАЦИЯ И БОРЬБА С НЕЙ 313
Глава 17. Микробная порча, риск инфекции и борьба с контаминацией (*Розамунд М. Бэйрд*) 315

Глава 18. Химические дезинфектанты, антисептики и консерванты (*Шон П. Горман, Брендан Ф. Гилмор*) 333

Глава 19. Лабораторная оценка антимикробных средств (*Брендан Ф. Гилмор, Шон П. Горман*) 353

Глава 20. Микробициды: механизм действия и устойчивость к ним (*Стивен П. Дениер, Жан-Ив Миллард*) 371

Глава 21. Методы стерилизации и обеспечение стерильности (*Алистер К. Браун, Стивен П. Дениер*) 386

ЧАСТЬ 6. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО 413

Глава 22. Стерильные фармацевтические препараты и принципы надлежащей производственной практики (*Тим Сэндл*) 415

Глава 23. Производство и контроль качества иммунологических препаратов (*Тим Сэндл*) 439

Глава 24. Технология рекомбинантной ДНК (*Мигель Камара, Стефан Хиб*) 455

ЧАСТЬ 7. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ 479

Глава 25. Вклад микробиологии в развитие фармацевтических наук (*Мэтью В. Смит, Джеймс С. Бирчалл, Сион А. Коулман*) 481

Глава 26. Альтернативы антибиотикам: приоритетные направления разработки (*Брендан Ф. Гилмор*) 498

Предметный указатель 510

Предисловие к изданию на русском языке

Современная фармацевтическая микробиология занимает важное место в системе биологических и медицинских наук, являясь неотъемлемой частью обеспечения качества и безопасности лекарственных средств. Развитие этой дисциплины тесно связано с прогрессом в микробиологии, биохимии, генетике и фармацевтических технологиях, что делает ее одной из ключевых областей для специалистов, работающих в сфере разработки, производства и контроля лекарственных препаратов.

В книге рассматриваются фундаментальные основы микробиологии, методы идентификации микроорганизмов, вопросы стерилизации и контроля микробной чистоты, а также современные подходы к обеспечению стабильности и безопасности лекарственных форм. Особое внимание в книге уделено актуальным проблемам фармацевтической микробиологии, таким как микробная контаминация лекарственных средств и ее последствия; методы стерилизации и валидация процессов обеззараживания; микробиологические требования GMP (надлежащей производственной практики); новые вызовы, связанные с появлением антибиотикорезистентных штаммов и биопленок.

Авторы стремились объединить теоретические аспекты микробиологии с практическими рекомендациями, чтобы читатель мог не только усвоить ключевые понятия, но и применять их в профессиональной деятельности.

Настоящее издание предназначено для студентов фармацевтических и медицинских вузов, аспирантов, исследователей и практикующих специалистов, чья деятельность связана с микробиологическим контролем в фармации.

Р.Н. Аляутдин

Предисловие к девятому изданию на английском языке

Когда мы начали планировать это издание в 2017 г., то не могли и предвидеть, сколько микробиологических аспектов, особенно из области фармацевтической микробиологии, станут известными в последующие годы пандемии. Теперь, когда мы постепенно выходим из COVID-19, мы обогащены жизненно важным опытом в отношении антисептики, мер по профилактике и лечению инфекции, эпидемиологии, иммунологии, разработки вакцин и понимания патогенности вирусов. Сила этой пандемии заставила мобилизовать индивидуальные, национальные, международные и коммерческие усилия по борьбе с инфекцией и исследовать новые подходы к лечению и иммунизации. Именно на этом фоне многие из наших авторов готовили свои главы, иногда в самых стесненных обстоятельствах; мы благодарим их за эту усердную работу и настойчивость. Очень ценны проявленные в это время понимание и терпение наших издателей.

Хотя структура этого издания во многом вытекает из предыдущего, все главы пересмотрены, у иных появились новые авторы, которые внесли много значительных разработок в этой области. Среди них: рост устойчивости к антибиотикам; риск перекрестной устойчивости микробидов; новые возбудители; госпитальная инфекция; новые вакцинные технологии; достижения в области фармацевтического производства; альтернативные антибиозу стратегии. Конечно, хотя в долгосрочной перспективе наше понимание и выводы в отношении особенностей COVID-19 могут измениться, во время развития пандемии наши авторы попытались привнести как можно больше авторитетных идей.

В этом издании мы хотели бы отметить вклад прежних редакторов Ш. Гормана и Н. Ходжеса (оба остаются авторами), а также Б. Хьюго и Д. Рассела, которые сыграли важную роль в признании и формировании дисциплины «Фармацевтическая микробиология». Они бы не были удивлены тем, какой вклад она сейчас вносит в защиту общества.

С.П. Дениер,
Б.Ф. Гилмор

Предисловие к первому изданию на английском языке

Когда издатели впервые обратились к нам с предложением написать фундаментальное руководство по фармацевтической микробиологии с условием его выпуска весной 1977 г., решить эту задачу удовлетворительно в отпущенное время считалось невозможным.

Однако благодаря сотрудничеству редакции и приглашенных экспертов, внесших свой вклад в написание различных глав, эта задача была решена.

Фармацевтическую микробиологию можно определить как часть микробиологии, имеющую особое отношение к фармации во всех ее аспектах. Эта область варьирует от производства и контроля качества фармацевтических препаратов до понимания механизмов действия антибиотиков. В полной мере роль микробиологии для фармацевтической области можно оценить по содержанию глав.

Поскольку эта книга предназначена для студентов бакалавриата по фармации (а также микробиологов, приходящих в фармацевтическую промышленность), мы ограничили объем книги, стремясь удержать ее в определенном диапазоне цен. Результат виден на следующих страницах. За любую недосказанность, что больше всего нас беспокоит, должны нести ответственность редакторы. Объем и глубину проработки вопросов определяли наши издатели. Надеемся, что эта книга послужит неким конспектом для студентов фармацевтических факультетов (у которых на данный момент нет профильного учебника) и поможет выделить части общемикробиологической подготовки, важные для фармацевтической промышленности.

Наконец, редакторы искренне благодарят соавторов этой книги за соблюдение требований в отношении объема их вклада и за вовремя предоставляемый материал, а также наших издателей за их дружелюбность и эффективность при выпуске этой книги. Мы также хотим поблагодарить Х.Дж. Смита за советы по различным химическим аспектам, М.И. Барнетта за полезные комментарии в отношении обратного осмоса и А. Килла, который помог с таблицей по методам стерилизации.

В.Б. Хьюго,
А.Д. Рассел

Глава 2
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОЛОГИИ

Норман Ходжес, Стивен П. Дениер

2.1. ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы сильно разнятся по форме, размерам, внешнему виду, а также по генетическим и метаболическим характеристикам. Все эти свойства используют для классификации микроорганизмов в основные группы, с которыми многие люди знакомы, например бактерии, грибы, простейшие и вирусы, и менее известные — хламидии, риккетсии и микоплазмы. Основные группы рассматриваются в отдельных главах сразу после этой, поэтому цель здесь не в подробном их описании, а в выделении особенностей, чтобы читатель мог лучше понять различия между ними. Также цель этой главы — избежать повторения информации в начале книги при рассмотрении таких микробиологических аспектов, как культивирование, подсчет и генетика, которые являются общими для некоторых типов микроорганизмов.

2.1.1. Вирусы, вироиды и прионы

Вирусы не имеют клеточной структуры. Это частицы из нуклеиновой кислоты, окруженной белком; у некоторых есть липидная оболочка и связанные с ней гликопротеины, но узнаваемые хромосомы, цитоплазма и клеточные мембраны неизменно отсутствуют. Вирусы неспособны к независимой репликации, поскольку не содержат необходимых ферментов для копирования собственных нуклеиновых кислот; в этой связи все вирусы — внутриклеточные паразиты, воспроизводимые с использованием метаболических ресурсов клетки-хозяина. Вирусы и вирусоподобные частицы, например вироиды, иногда называют мобильными генетическими элементами; их считают «эгоистичными» генетическими элементами, которые перемещаются между хозяевами и/или изменяют свою интеграцию в генах хозяев. Вирусы существенно варьируют по форме (спиральная, линейная или сферическая), размеру (20–1500 нм) и нуклеиновой кислоте (одно- или двухцепочечная, линейная или кольцевая, РНК или ДНК), но почти все они меньше бактерий; их нельзя увидеть с помощью обычного светового микроскопа, а только с помощью электронного микроскопа, который обеспечивает гораздо большее увеличение.

Вироиды (вирусоиды) устроены даже проще, чем вирусы: это инфекционные частицы из одноцепочечной РНК без какого-либо связанного с ней белка. Описанные вироиды являются паразитами растений, что иногда имеет экономическое значение; патогенных для человека пока не известно, хотя вирус гепатита D имеет некоторые общие черты с вироидами и, возможно, произошел от них.

Прионы в качестве возбудителей инфекций уникальны, поскольку не содержат нуклеиновой кислоты. Прион — это атипичный белок млекопитающего, который может взаимодействовать с нормальной молекулой белка, приводя к ее конформационному изменению, в результате чего она утрачивает свою нормальную функцию и становится прионом. Прионы вызывают трансмиссивные губчатые энцефалопатии, например болезнь Кройтцфельдта–Якоба (БКЯ) и губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота (BSE — bovine spongiform encephalopathy). Они наиболее просто устроены, недавно признаны возбудителями инфекционных заболеваний и важны для фармацевтики ввиду их крайней устойчивости к обычным средствам стерилизации, таким как пар, γ-излучение и дезинфектанты (см. главу 21).

2.1.2. Прокариоты и эукариоты

Наиболее фундаментальное различие между микроорганизмами, имеющими клеточную структуру (то есть всеми, кроме описанных в разделе 2.1.1), разделяет их на две группы — прокариоты и эукариоты — в основном по структурным характеристикам и способу репродукции. Проще говоря, прокариоты — это бактерии и археи (см. раздел 2.1.2.1), а эукариоты — все остальные клеточные микроорганизмы, например грибы, простейшие и водоросли. Важнейшее различие между этими двумя типами клеток — наличие у эукариот истинного клеточного ядра, где хромосомы отделяются от цитоплазмы ядерной мембраной. Прокариоты не имеют истинного ядра; они обычно обладают лишь одной хромосомой, не отделенной от клеточного содержимого мембраной. Из других отличительных особенностей двух групп важно то, что прокариоты обычно являются гаплоидными (имеют в клетке только одну копию набора генов) и воспроизводятся без полового процесса; эукариоты, напротив, обычно являются

диплоидными (имеют две копии своих генов) и могут воспроизводиться половым путем. Способность к половому размножению дает основное преимущество — создание новых комбинаций генов с увеличением объема материала для отбора и эволюционного развития. Ограничение бесполого режима размножения означает, что такой организм в значительной степени зависит от мутации как средства создания генетического разнообразия и новых штаммов с выгодными характеристиками, хотя многие бактерии способны получать новые гены от других штаммов или видов (см. раздел 2.6.1 и главу 3). В **табл. 2.1** перечислены некоторые отличительные особенности прокариот и эукариот.

Таблица 2.1. Отличительные особенности прокариот и эукариот

Характеристика	Эукариоты	Прокариоты
Размер	Обычно >10 мкм	Чаще 1–5 мкм
Расположение хромосом	Внутри истинного ядра, отделенного от цитоплазмы ядерной мембраной	В цитоплазме; обычно прикреплены к клеточной мембране
Деление ядра	Проявляется митоз и мейоз	Митоз и мейоз отсутствуют
Ядрышко	Имеется	Отсутствует
Размножение	Бесполое или половое размножение	Обычно бесполое размножение
Количество хромосом	>1	1
Митохондрии и хлоропласты	Могут присутствовать	Отсутствуют
Состав клеточной мембраны	Стеролы присутствуют	Стеролы отсутствуют
Состав клеточной стенки	Клеточные стенки (если имеются) обычно содержат целлюлозу или хитин, но не пептидогликан	Стенки обычно содержат пептидогликан
Рибосомы	Цитоплазматические рибосомы 80S	Рибосомы меньше, обычно 70S
Эндоплазматическая сеть	Имеется	Отсутствует
Внеклеточная капсула/слизь	Отсутствует	Часто имеется
Жгутик	Структурно сложный	Структурно простой
Пили	Отсутствуют	Имеются
Фимбрии	Реснички	Имеются
Запасные вещества	Поли-β-гидроксибутират отсутствует	Поли-β-гидроксибутират часто присутствует

2.1.2.1. Бактерии и археи

Бактерии по сути одноклеточные, хотя некоторые виды образуют цепочки клеток под общей оболочкой. Они обладают свойствами прокариот (см. **табл. 2.1**), но, подобно вирусам и другим микроорганизмам, проявляют большое разнообразие по форме, средам обитания, метаболизму, патогенности и другим характеристикам. Бактерии, представляющие интерес для фармации и медицины, относят к группе эубактерий (истинных бактерий. — *Примеч. пер.*). Другой подотдел прокариот — археи; если ранее к нему относили в основном организмы, способные жить в экстремальных условиях (например, при высоких температурах, экстремальных солености или значениях pH) или проявляющие особые способы метаболизма (например, получение энергии через окисление серы или железа или выработку метана), то теперь известно, что они встречаются в самых разных местах обитания. Эта толерантность к экстремальным условиям позволила рассматривать археи в качестве биокатализаторов для промышленных процессов; как источник чрезвычайно стабильных ферментов они хорошо подходят для биотехнологического применения и могут иметь фармацевтическое значение.

Эубактерии обычно имеют форму палочки (палочковидные, см. **рис. 2.1, а**), шара (кокки), изогнутых или спиральных клеток размером примерно 0,5–5,0 мкм (самые длинные); их разделили на две группы, грамположительные и грамотрицательные, в соответствии с их окрашиванием по методу, разработанному в 1884 г. Кристианом Грамом (см. главу 3). Хотя в этот подотдел включены все патогенные виды, существует очень много других эубактерий, безвредных или полезных. Часть бактерий, которые загрязняют или вызывают порчу фармацевтических материалов, относят к сапрофитам (они получают энергию путем разложения животных и растительных материалов), тогда как многие также можно отнести к паразитам (живущим за счет других живых организмов на их поверхности или внутри, не причиняя им вреда) или патогенным микроорганизмам (паразитам, наносящим вред хозяину).

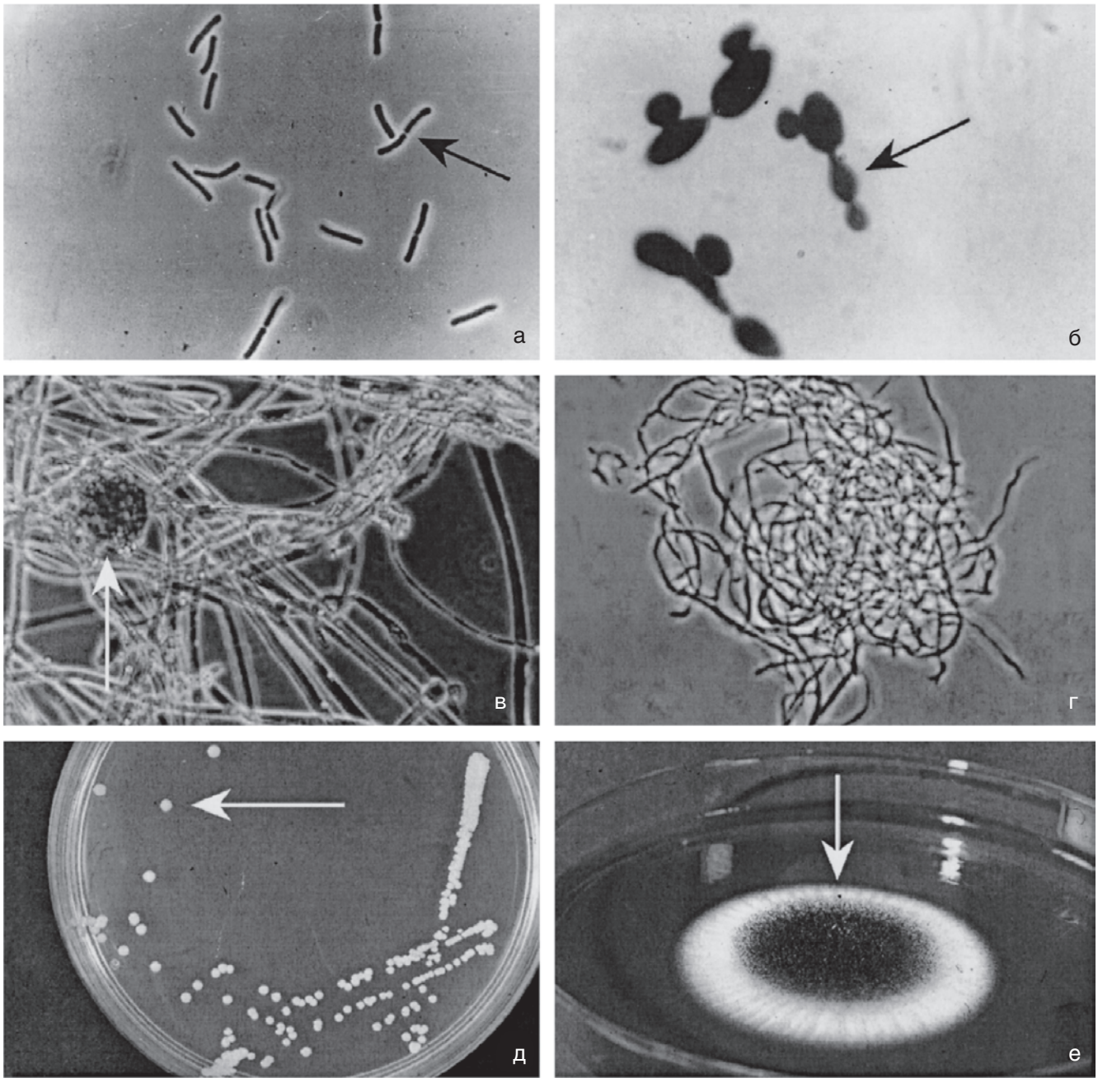


Рис. 2.1. Растущая культура *Bacillus megaterium*: перед бинарным делением у клеток появляется сужение (показано стрелкой) (а). Растущая культура дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с почкованием (показано стрелкой) (б). Плесневый гриб *Mucor plumbeus* с типичного вида мицелием и массами бесполых зигоспор (показано стрелкой) на специализированных гифах (в). Бактерия *Streptomyces rimosus* с разветвленной сетью нитей, внешне напоминающей мицелий плесеней (г). Типичный вид культуры *Micrococcus luteus*, выращенной в течение ночи на питательном агаре для получения изолированных колоний (показано стрелкой) (д). Отдельная колония плесени *Aspergillus niger*: Активно растущая периферия колонии (показано стрелкой) контрастирует со зрелым центром, где развились пигментированные бесполые споры (е)

Риккетсии и хламидии — это бактерии, относимые к облигатным внутриклеточным паразитам, то есть неспособным расти вне клетки-хозяина; в этой связи их нелегко выращивать в лаборатории. Большинство бактерий фармацевтического и медицинского значения имеют жесткие клеточные стенки (то есть относительно устойчивы к осмотическому стрессу), хорошо растут в диапазоне между температурой окружающей среды и человеческого тела и широко варьируют по потребности или доступу кислорода. Строгим аэробам требуется атмосферный кислород, а для строгих анаэробов кислород токсичен. Среди других бактерий будут описаны факультативные анаэробы (обычно лучше растущие на воздухе, но способные расти без него) и микроаэрофилы (предпочитающие концентрации кислорода ниже, чем в обычном воздухе).

2.1.2.2. Грибы

Будучи эукариотами, грибы структурно более сложны, чем бактерии, и варьируют по внешнему виду; их отличают черты, описанные в **табл. 2.1**.

Считается, что грибы — это нефотосинтезирующие растения, а термином *«гриб»* обозначают как дрожжи, так и плесени, хотя различие между этими двумя группами не всегда четкое. Дрожжи — это обычно одноклеточные организмы, которые крупнее бактерий (обычно 5–10 мкм) и делятся либо путем бинарного деления (см. раздел 2.4.2), либо почкованием (дочерняя клетка растет как выбухание от родительской с последующим отделением от нее и независимым существованием, **рис. 2.1, б**). *Плесень* — неточный термин, используемый для описания грибов, не образующих видимые невооруженным глазом плодовые тела, что отличает их от несъедобных и съедобных грибов. Большинство плесеней состоят из спутанной массы (мицелия) нитей (гиф) шириной от 1 до 50 мкм (**рис. 2.1, в**); их различают по специализированным функциям, например поглощению питательных веществ или размножению. Некоторые грибы в зависимости от условий выращивания могут иметь вид одноклеточных (дрожжеподобных) или мицелиальных (плесенеподобных) организмов. Хотя грибы являются эукариотами, теоретически способными к половому размножению, есть виды, у которых оно никогда не наблюдалось. Большинство грибов — сапрофиты с относительно небольшим патогенным потенциалом, хотя в случае пациентов с ослабленным иммунитетом это может быть не так. Способность грибов формировать споры, устойчивые к высушиванию, делает их важными загрязнителями фармацевтического сырья, особенно материалов растительного происхождения.

2.1.2.3. Простейшие

Простейшие — это эукариотические, преимущественно одноклеточные микроорганизмы; в прошлом их относили к животным, но не растениям (*protozoa* означает «первые животные»), хотя различия между простейшими и грибами не всегда четкие.

Многие простейшие — это свободноживущие подвижные организмы; встречаются в воде и почве, хотя некоторые являются паразитами растений и животных, включая человека, например возбудители малярии и амебной дизентерии. Простейшие обычно не контаминируют сырье и не обнаруживаются в готовых лекарственных препаратах; относительно немногие из них представляют интерес для фармацевтики, в первую очередь как потенциальные возбудители заболевания.

2.2. НАИМЕНОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы, подобно другим организмам, обычно называют двумя именами: родовым и видовым. Первое обычно пишут с заглавной буквы, а второе — со строчной, например: *Staphylococcus aureus* или *Escherichia coli*. Их могут сокращать путем сокращения родового названия, но видовое при этом не сокращается, например: *S. aureus* или *E. coli*. Как полные, так и сокращенные названия пишут *курсивом*, чтобы обозначить их как собственные имена (в старых книгах, диссертациях или рукописях их могут печатать прямым шрифтом, но подчеркнутыми). Виды в пределах рода иногда имеют коллективное название, например стафилококки или псевдомонады, но ни эти названия, ни описывающие группы организмов разных родов, например колиформные, не пишут курсивом или с заглавной буквы.

Вирусы, как правило, классифицируют по фенотипическим характеристикам (см. главу 5), например морфологии, нуклеиновой кислоте и природе вызываемого заболевания. По соглашению название семейства, к которому принадлежит вирус, заканчивается суффиксом *viridae*, например *Adenoviridae*, а название рода заканчивается словом *virus*, например *Adenovirus*, их пишут курсивом. Названия видов часто имеют форму [заболевание] *virus*, например: *influenza virus*. Вирусная номенклатура еще должным образом не стандартизирована Международным комитетом по таксономии вирусов.

2.3. МИКРОБНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ

Подобно большинству других аспектов физиологии, метаболизм у микроорганизмов существенно различается. Хотя некоторые виды могут получать углерод из углекислого газа, а энергию — из солнечного света или при окислении неорганических веществ, например сульфидов, подавляющее большинство организмов, представляющих интерес для фармации и медицины, — хемогетеротрофы, получающие углерод, азот и энергию путем разложения органических соединений. Химические реакции, ведущие к высвобождению энергии при переваривании пищевых материалов, называют катаболическими, а те, при которых используется освобожденная энергия для создания сложных клеточных полимеров (белков, углеводов и нуклеиновых кислот), называют анаболическими.

Для расщепления и высвобождения энергии пищевые материалы окисляются. Термин «окисление» означает удаление или потерю электронов, но окисление не всегда связано с кислородом, поскольку в качестве окислителей (принимающих электроны веществ) может действовать широкий спектр других молекул. Поскольку окисляющая молекула принимает электроны, другая молекула реакции, отдающая их, одновременно восстанавливается. Следовательно, реакции окисления и восстановления неизменно связаны, их часто называют окислительно-восстановительными. Используется также термин «окислительно-восстановительный (редокс-) потенциал», указывающий на преобладание условий для окисления или восстановления в конкретной среде, например в биологической жидкости или культуральной среде. Анаэробные организмы предпочитают низкие редокс-потенциалы (обыч-

но от 0 до −200 мВ или меньше), тогда как аэробы растут в средах с высоким потенциалом (например, от 0 до +200 мВ или более).

Метаболические пути, используемые патогенными бактериями и млекопитающими, во многом схожи. Для начала разложения глюкозы и высвобождения энергии многие бактерии используют тот же процесс гликолиза, что и у человека. Гликолизом описывают преобразование глюкозы посредством ряда реакций в пировиноградную кислоту; кислород для этого не требуется, и гликолиз осуществляется как аэробными, так и анаэробными организмами. При этом из данной молекулы выделяется лишь относительно небольшое количество энергии, и аэробные микроорганизмы, подобно млекопитающим, высвобождают гораздо больше энергии с помощью аэробного дыхания. Кислород является последней молекулой в цепочке респираторных реакций и в конечном итоге принимает электроны, позволяя всему процессу продолжаться, но стоит отметить, что многие организмы также могут осуществлять *анаэробное* дыхание, при котором используются другие конечные акцепторы электронов, например нитрат или фумарат.

В качестве альтернативы дыханию для высвобождения большей энергии из сахара многие микроорганизмы используют ферментацию — процесс, при котором конечным акцептором электронов является органическая молекула. Этот термин часто понимается как выработка дрожжами этанола и углекислого газа из сахара, но на самом деле многие организмы, помимо дрожжей, могут осуществлять ферментацию, и этот процесс не ограничивается сахарозой в качестве начального материала или этанолом и углекислым газом в качестве метаболитов. Многие патогенные бактерии способны ферментировать несколько различных сахаров и других органических соединений с получением ряда метаболических продуктов, в том числе кислот (например, молочная, уксусная, пропионовая), спиртов (например, этанол, пропанол, бутандиол) и других коммерчески важных материалов (например, растворители, ацетон, бутанол). Подобно гликолизу, ферментация — анаэробный процесс, хотя в фармацевтической и биотехнологической промышленности этот термин обычно используют для описания производства широкого спектра веществ микроорганизмами, где биохимический процесс не является ни ферментативным, ни даже анаэробным; например, во многих учебниках упоминается ферментация антибиотиков, но производственные емкости при этом энергично аэрируют.

В отношении пищевых материалов и средств, с помощью которых они расщепляются, микроорганизмы гораздо более универсальны, чем млекопитающие. Некоторые патогенные организмы могут расти в разбавленных растворах минеральных солей и сахара (или других простых веществ — глицерина, молочной или пировиноградной кислоты), тогда как другие могут получать энергию из редко встречающихся углеводов, при расщеплении белков или других неуглеводных материалов. Помимо широкого спектра пищевых материалов, многие микроорганизмы в зависимости от условий окружающей среды могут использовать для питания альтернативные метаболические пути, например, факультативные анаэробы могут переключаться с дыхания на ферментацию, если доступ кислорода прекращается. Способность переключаться на другие метаболические пути отчасти объясняет, почему ни один из основных антибиотиков не мешает химическим процессам метаболизма пищевых соединений у микроорганизмов. Фундаментальный принцип действия антибиотика в том, что он должен использовать разницу в метаболизме паразита и хозяина, чтобы не убивать последнего; без такой разницы антибиотик был бы очень токсичным и для пациента. Вместе с тем бактерии используют пищевые метаболические пути, не только похожие на наши собственные; многие из них способны переключаться на альтернативный путь получения энергии, если был разработан антибиотик, который мешал уникальной для бактерий реакции.

Метаболические продукты, возникающие в период собственно роста микробной культуры, называют первичными метаболитами, а продуцируемые после размножения клеток, замедляющие или останавливающие рост, то есть в «стационарной фазе» (см. главу 3), называются вторичными метаболитами. Основное коммерческое значение имеет метаболит этанол, хотя он в больших количествах производится только некоторыми видами дрожжей. В качестве первичных метаболитов чаще, чем этанол, выступают органические кислоты, поэтому отмечено, что pH культуры во время ее роста постепенно падает, но многие организмы далее усваивают кислоты, поэтому после прекращения роста клеток pH часто возрастает. Метаболиты вторичного метаболизма разнообразны, и многие из них имеют коммерческое или терапевтическое значение (см. главу 25). Среди них антибиотики, ферменты (например, амилазы, расщепляющие крахмал, и протеолитические ферменты, используемые в биологических моющих средствах), токсины (отвечают за многие симптомы инфекции, но некоторые также имеют терапевтическую ценность, например, ботокс — токсин *Clostridium botulinum*) и углеводы (например, декстран, используемый в качестве плазмозаменителя и для разделения молекул посредством гелевой фильтрации).

2.4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Большинство микроорганизмов, представляющих интерес для фармации и медицины, можно вырастить в лаборатории, применяя относительно

простые методы и оснащение. Некоторые являются облигатными паразитами, и их можно выращивать только внутри клеток хозяина, что часто требует оборудования для культивирования клеток млекопитающих, но есть несколько (например, возбудитель проказы), которые не растут вне живого макроорганизма. Культивирование вирусов рассматривается в главе 5.

2.4.1. Культуральные среды

Значительное количество известных микроорганизмов могут синтезировать все необходимые для роста материалы (например, аминокислоты, нуклеотиды, витамины) из простых источников углерода и азота и минеральных солей. Такие организмы могут расти на истинно синтетических (химически определенных) средах, но многие не обладают этой способностью и нуждаются в среде, содержащей эти вещества. Такие среды используют гораздо чаще синтетических; для их обозначения использовали несколько терминов, например: обычные лабораторные среды, среды общего назначения, сложные среды. Они сложны в том смысле, что их точный химический состав неизвестен и, вероятно, незначительно варьирует от партии к партии. Обычно они представляют собой водные растворы экстрактов животного или растительного сырья, содержащих гидролизованные белки, витамины группы В и углеводы.

Среди легкодоступных и относительно недорогих источников белка — экстракты мяса (из тех частей туш, которые не используются для потребления человеком или домашними животными), молоко и соя. Белок гидролизуют до различной степени, чтобы получить пептоны (по определению, не коагулируемые нагреванием или сульфатом аммония) или аминокислоты. Для гидролиза средней степени предпочтительны трипсин или другие протеолитические ферменты, поскольку кислоты больше разрушают аминокислоты; термин «триптический» означает использование этого фермента. Многим микроорганизмам требуются витамины В-группы (но не другие водо- или жирорастворимые витамины, как млекопитающим), и их обеспечивает дрожжевой экстракт. Углеводы используются в виде крахмала или сахаров, но в качестве питательного вещества регулярно применяется только глюкоза (декстроза). Микроорганизмы различаются по способности ферментировать различные сахара, и их профили ферментации могут служить средством для идентификации. В этой связи другие сахара обычно включают в культуральную среду для диагностических целей, а не как источник углерода и энергии. Сложное биохимическое профилирование с применением различных углеводов и индикаторных красителей позволяет распознавать характерные для рода и вида метаболические профили; такая фенотипическая идентификация часто миниатюризирована и автоматизирована в коммерческих наборах. Для регулировки осмотического давления в культуральную среду может быть включен хлорид натрия, а для нейтрализации кислот, возникающих при метаболизме сахара, иногда добавляют буферы. Обычные культуральные среды могут обогащать добавлением молока, крови или сыворотки; организмы, для роста которых требуются такие добавки, называют прихотливыми.

Культуральные среды бывают жидкие или плотные; последние получают из жидких сред, в которые для образования геля добавляют агар-агар (углеводы, извлеченные из некоторых морских водорослей). При концентрации около 1–1,5% масс./об. агар-агар формирует плотный гель, не разжижаемый обычными ферментами растущих бактерий (в отличие от желатина). Агар необычен в том смысле, что температуры плавления и застывания его гелей довольно разнятся. Жидкие растворы агара застывают примерно при 40 °С, но повторно не расплавляются, пока температура не превысит 90 °С. Таким образом, агар-агар (в отличие от желатина) образует плотный гель при 37 °С — нормальной температуре инкубации для многих патогенных организмов, а для подсчета бактерий чашечным методом важно, что он не застывает при 45 °С — довольно низкой температуре для гибели клеток (см. раздел 2.5).

В отличие от состава сред для поддержания роста микробов, для получения селективных или диагностических сред в них обычно добавляют вещества, функция которых заключается в подавлении роста определенных типов микроорганизмов и стимулировании роста других. Примеры: в среды для выращивания грибов включают антибактериальные антибиотики для подавления роста загрязнителей; для подавления роста организмов не из ЖКТ в среды добавляют желчь. Многие добавки используют в составе сред для идентификации микроорганизмов; они рассматриваются в следующих главах. В этом контексте термин «обогащение» иногда вызывает путаницу. Иногда его используют в смысле сделать среду более питательной (богатой) для получения быстрого или обильного роста. Напротив, и чаще, обогащающая среда должна позволить определенному типу организма расти, ограничивая рост других, с увеличением его относительного количества («обогащением») в смешанной культуре.

Плотные среды для роста анаэробных организмов обычно содержат нетоксичные восстанавливающие вещества, например тиогликолят или серосодержащие аминокислоты; они придают среде редокс-потенциал на уровне –200 мВ или меньше, уменьшая или устраняя тем самым ингибирующее влияние кислорода или окисляющих молекул на анаэробный рост. Менее важно включение таких соединений в жидкие среды, где достаточно низкого редокс-потенциала можно достичь простым кипячением: растворенный кислород при этом удаляется, а без перемешивания им медленно насыщаются лишь верхние несколько миллиметров среды. Чтобы подтвердить достижение достаточно низкого редокс-потенциа-

ла, в анаэробные среды могут включать индикаторы, например метиленовый синий или резазурин.

У культуральных сред для дрожжей и плесеней часто более низкое значение pH[1] (5,5–6,0), чем для бактерий (7,0–7,4). Для придания низкого pH может использоваться молочная кислота, так как в используемых концентрациях она не ингибирует рост грибов. В некоторые среды для выделения грибов из материала, в котором также могут содержаться бактерии, добавляют антибактериальные антибиотики, например хлорамфеникол или тетрациклины.

2.4.2. Методы культивирования

Большинство бактерий и некоторые дрожжи размножаются бинарным делением, при котором клетка увеличивается или удлиняется, затем образует перегородку, которая разделяет ее на две более или менее равные ячейки, каждая из которых содержит копию генетического материала. Формирование перегородки часто сопровождается сужением, связь между двумя ячейками постепенно уменьшается (см. **рис. 2.1, а**), пока наконец она не нарушается, и дочерние клетки отделяются. У бактерий этот вариант деления при оптимальных условиях лабораторного выращивания может происходить каждые 25–30 мин, хотя в очаге инфекции в организме рост обычно намного медленнее ввиду воздействия иммунной системы и нехватки необходимых питательных веществ, особенно железа. Рост продолжается до исчерпания одного или нескольких питательных веществ или накопления токсичных метаболитов (часто органических кислот) и ингибирования ферментных систем. Многие бактерии после инкубации в течение ночи в обычной жидкой среде, начиная с одной клетки, могут достичь концентрации порядка 10^9 клеток • мл$^{-1}$ или более. При концентрациях меньше или около 10^7 клеток • мл$^{-1}$ культуральная среда еще прозрачна, но постепенно становится мутной, поскольку концентрация клеток возрастает; в этой связи мутность является косвенным признаком роста культуры. Некоторые бактерии образуют цепочки клеток, а некоторые — удлиненные клетки (нити), ветвление которых может принимать вид клубка, напоминающего мицелий плесеней (**рис. 2.1, г**). Многие дрожжи делятся почкованием (см. раздел 2.1.2.3 и **рис. 2.1, б**), и они также обычно растут в жидких средах с помутнением культуры. Плесени, однако, растут путем расширения и разветвления гиф, образующих мицелий (**рис. 2.1, в**) или гранулы (в перемешиваемых жидких культурах).

При инкубации в течение ночи в оптимальных условиях на плотной среде в чашках Петри рост отдельных бактериальных клеток может приводить к формированию колоний. Колония — это просто скопление клеток в результате размножения одной исходной клетки или их небольшой группы (называемой «колониеобразующая единица», или КОЕ). Строго говоря, «колония» не означает какое-либо конкретное количество клеток, но обычно считается, что их достаточно, чтобы видеть их невооруженным глазом. Следовательно, на участке чашки Петри обычно величиной 1–10 мм в диаметре макроскопические бактериальные колонии содержат сотни тысяч, миллионы или десятки миллионов клеток (**рис. 2.1, д**). Подобно концентрации клеток в жидкой среде, размер колонии ограничен доступностью питательных веществ и/или накоплением метаболитов. В зависимости от вида бактерий колонии варьируют по форме, размерам, прозрачности, характеру поверхностности и пигментации, поэтому их свойства могут использовать в процедурах идентификации (см. главу 3).

Анаэробные организмы можно выращивать на чашках Петри при условии инкубирования в анаэробном контейнере. Обычно это контейнер из жесткого пластика с герметичной крышкой; чашки Петри помещают в него вместе с низкотемпературным катализатором. Катализатор состоит из покрытых палладием гранул или проволоки; в его присутствии кислород внутри емкости связывается с водородом, образовавшимся после добавления воды к боргидриду натрия (обычно его в саше также помещают в эту емкость); в другом варианте кислород можно удалить при его взаимодействии с аскорбиновой кислотой. После его удаления достигается анаэробная атмосфера, и это контролируют индикатором окисления-восстановления (редокс-индикатором); часто используется тканевая полоска, пропитанная раствором резазурина.

Дрожжевые колонии часто похожи на колонии бактерий, хотя могут быть больше и чаще окрашены. Внешний вид растущих на плотной культуральной среде плесеней аналогичен их росту на обычных продуктах питания. Колония плесени состоит из мицелия, который может быть рыхлым или плотным в зависимости от вида, часто с пигментацией центральной части (наиболее зрелой области колонии), что связано с продукцией спор (**рис. 2.1, е**). Периферия колонии — та часть, которая активно растет; обычно она не пигментирована.

2.4.3. Планктонный и связанный с субстратом (в виде биопленки) варианты роста

В жидкой культуре в лаборатории бактерии обычно растут в виде отдельных клеток или их небольших агрегатов, взвешенных в среде; рост свободно взвешенных клеток обозначают термином «планктонный». В последние годы, однако, признается, что планктонный рост не является нормальным для бактерий в их естественной среде обитания. В естественном состоянии бактерии гораздо чаще растут, прикрепляясь к поверхности, которая для многих видов может быть твердой, например частицы почвы, камни, металл или стекло, а для патогенных —

[1] pH (от лат. *pondus Hydrogenii*) — водородный показатель.

поверхностью эпителия в организме, например слизистая оболочка легких или кишечника. Прикрепленные (связанные с субстратом) бактерии, как говорят, проявляют рост в виде биопленки или микроколонии.

Планктонные клетки обычно используют практически во всех процедурах испытаний антимикробной активности химических веществ и процессов, но признание планктонного роста неестественным состоянием для многих организмов вызвало исследования относительной чувствительности планктонных культур и биопленок к антибиотикам, дезинфектантам и процедурам деконтаминации или стерилизации. Во многих случаях обнаружено, что планктонные бактерии и биопленки проявляют заметно разную чувствительность к этим летальным средствам; это вызвало переоценку уместности некоторых известных процедур (см. главы 8, 13, 19).

2.5. ПОДСЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ

В фармацевтическом контексте есть несколько ситуаций, когда требуется измерить количество микробных клеток в культуре, образце или материале:

- при оценке уровня микробной контаминации сырья или изготовленного препарата;
- при оценке эффективности химического антимикробного процесса или деконтаминации;
- при использовании микроорганизмов для изготовления терапевтических средств;
- при оценке ростовых характеристик питательных сред.

В некоторых случаях требуется знать общее количество микробных клеток, как живых, так и мертвых: например при производстве вакцины (иммунный ответ стимулируют и живые, и мертвые клетки), при испытании на пирогенность (при введении в организм лихорадку вызывают и те и другие). Однако во многих случаях требуется знать количество или концентрацию именно *живых* клеток. При подсчете микробов терминология иногда вызывает путаницу. *Общее количество* — результат процедуры подсчета с учетом как живых, так и мертвых клеток; подсчет *количества жизнеспособных клеток* гораздо более распространен и учитывает только живые клетки. Тем не менее в большинстве фармакопей и многих материалах регуляторных агентств используется термин *«общее количество жизнеспособных микроорганизмов»* (TVC — total viable count), означающий количество присутствующих в образце жизнеспособных микроорганизмов различных видов или типов (например, бактерии плюс грибы).

В **табл. 2.2** перечислены наиболее распространенные методы подсчета микроорганизмов. Первые три традиционных метода подсчета жизнеспособных клеток основаны на том, что после высева на поверхность или вглубь подходящей среды и инкубирования живая клетка (или КОЕ) приведет к формированию видимой глазом колонии. Так, метод посева заливкой (**рис. 2.2, а**) включает добавление небольшого объема (обычно 1,0 мл) образца (или его разведения) в расплавленный агар при 45 °С, который затем выливают в пустые стерильные чашки Петри. После инкубации подсчитывают выросшие колонии, и общее количество умножают на коэффициент разведения (если имелось), чтобы получить концентрацию в исходном образце. В методе поверхностного посева (**рис. 2.2, б**) образец (обычно 0,1–0,25 мл) распределяют по поверхности агара, заранее высушенного для всасывания жидкости.

Таблица 2.2. Примеры традиционных и быстрых методов подсчета микробных клеток

Традиционные методы		Быстрые методы
Подсчет жизнеспособных клеток	**Подсчет общего количества клеток**	**Косвенный подсчет жизнеспособных клеток**
1. Метод глубинного посева (подсчет колоний *в* агаре)	1. Прямой подсчет под микроскопом (с использованием камеры Хелбера или гемоцитометра)	1. Эпифлюоресценция (с красителями, дающими характерную флюоресценцию только в живых клетках); часто сочетают с анализом изображений
2. Методы поверхностного распределения или поверхностной капли (по Майлзу–Мисре) (подсчет колоний *на* поверхности агара)	2. Турбидиметрические методы [измерение мутности (непрозрачности) суспензий или культур]	2. Аденозинтрифосфатные методы [измерение выработки аденозинтрифосфата (АТФ) в живых клетках по биолюминесценции]
3. Метод мембранных фильтров (подсчет колоний, выросших на мембранах, лежащих на поверхности агара)	3. Взвешивание сухой массы	3. Измерение импеданса (учет изменения сопротивления, емкости или импеданса растущих культур)
4. Определение наиболее вероятного количества (подсчеты на основе посева серийных разведений в жидкую среду)	4. Определение содержания азота, белка или нуклеиновой кислоты	4. Обнаружение «дыхания» живых клеток по изменению давления газа либо по восстановлению колориметрического красителя

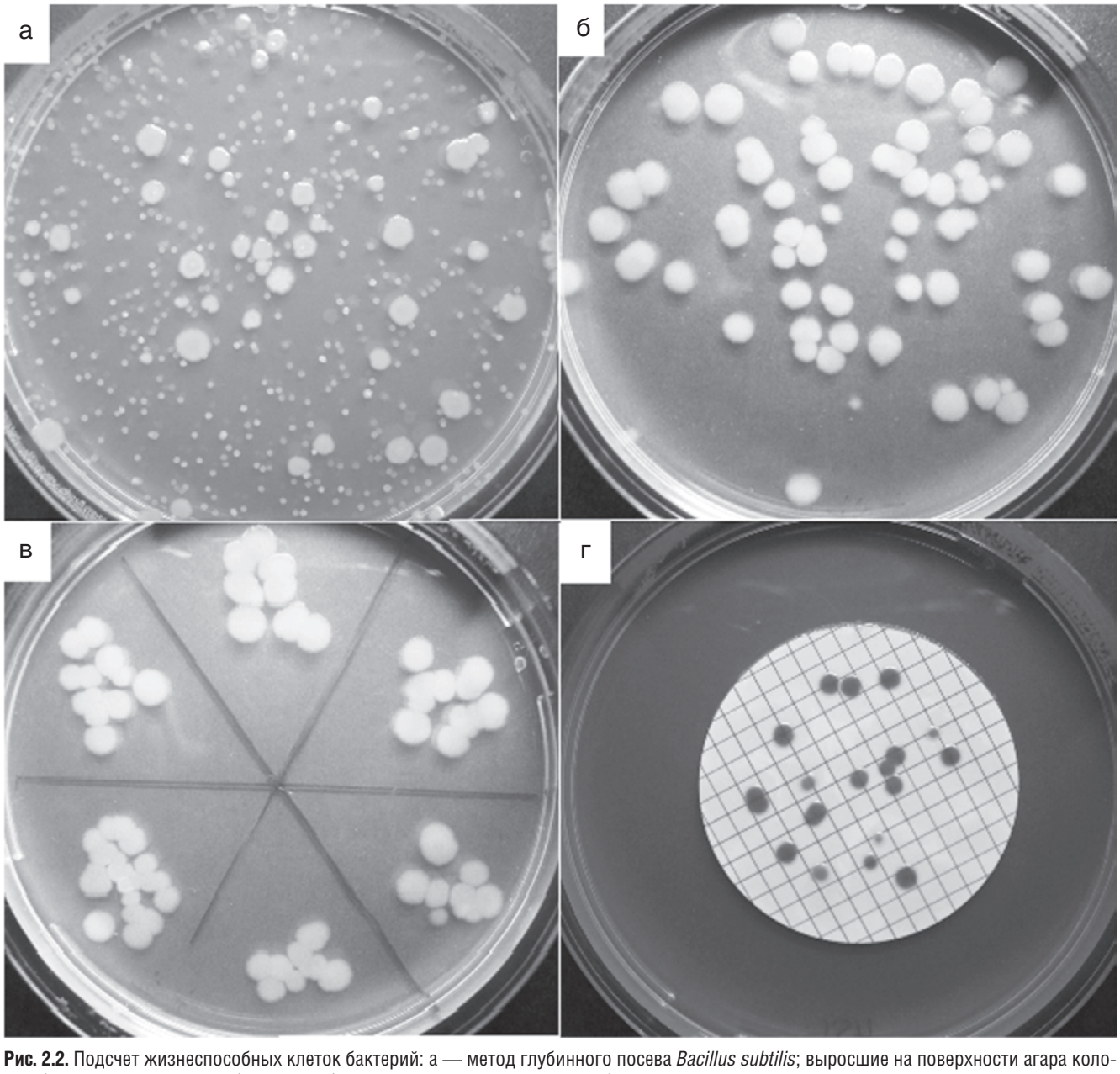


Рис. 2.2. Подсчет жизнеспособных клеток бактерий: а — метод глубинного посева *Bacillus subtilis*; выросшие на поверхности агара колонии больше выросших в глубине ввиду большей доступности кислорода; б — методы поверхностного распределения и в — поверхностной капли (по Майлзу–Мисре) при использовании *B. subtilis*; г — метод мембранной фильтрации: видны колонии *Serratia marcescens*, растущие на мембране диаметром 47 мм

Принцип метода поверхностной капли (по Майлзу–Мисре) (**рис. 2.2, в**) аналогичен: в несколько секторов на поверхности агара вносят отдельные капли разведений культуры на участки диаметром около 1 см. Эти методы подходят для образцов с ожидаемой концентрацией больше примерно 100 КОЕ/мл, чтобы количество выросших колоний было достаточно велико для статистической достоверности. Если нет четких указаний на порядок концентрации в образце, необходимо засевать образец каждого из двух, трех или более десятикратных разведений, чтобы получить чашки Петри с удобным для подсчета количеством колоний (обычно 30–300 колоний).

Если 30 колоний принимают в качестве наименьшего их надежного числа для подсчета, а в методе глубинного посева используют образец 1,0 мл, то описанные выше методы не подходят для образцов с ожидаемой концентрацией <30 КОЕ/мл, например образцов воды, где количество может быть 1 КОЕ/мл или менее. В этих случаях используют методы мембранной фильтрации (**рис. 2.2, г**): известный большой объем образца пропускают через мембрану, которую затем, не переворачивая, укладывают на поверхности агара. Питательные вещества диффундируют через мембрану, позволяя клеткам на ней формировать колонии так же, как на самом агаре. Некоторые относительные преимущества методов с подсчетом колоний описаны в **табл. 2.3**.

Определение наиболее вероятного количества можно использовать при относительно низких ожидаемых концентрациях — от <1 до 100 микроорганизмов в 1 мл. При этом засевают по несколько

Таблица 2.3. Относительные преимущества методов подсчета общего количества жизнеспособных микроорганизмов

Метод подсчета	Преимущества	Недостатки
Глубинный посев	Не требуется предварительно подсушенная поверхность агара. Определяются более низкие концентрации, чем при методах поверхностного посева	Можно пропустить очень мелкие колонии строгих аэробов в глубине агара. Колонии внутри агара кажутся одинаковыми, поэтому трудно отличить колонии контаминантов
Методы поверхностного распределения/капли	При поверхностном посеве колонии часто большего размера, чем при глубинном посеве, и их легче сосчитать. Легче идентифицировать контаминанты по виду их колоний	Для всасывания образца поверхность агара требуется заранее подсушить. Возможен сливной рост, маскирующий отдельные колонии, особенно у плесеней
Мембранная фильтрация	Можно определять более низкие концентрации, чем другими методами. Антимикробные вещества в образце можно физически отделить от клеток	Вязкие образцы не пройдут через мембрану, а частицы в образце могут блокировать мембрану, ограничивая ее способность к фильтрации

пробирок культуральной среды (обычно три или пять) тремя различными объемами образца, например: три по 0,1 мл, три по 0,01 мл и три по 0,001 мл. Если концентрация в образце находится в указанном выше диапазоне, должна быть часть пробирок, в которые микроорганизмы при посеве не попали; после инкубации они останутся стерильными, тогда как в других, куда попали одна или несколько КОЕ, будут признаки роста. Для каждого объема образца отмечают долю пробирок с ростом и результаты сравнивают со стандартными таблицами, где указано наиболее вероятное количество организмов в 1 мл (или в 100 мл) исходного образца. Чаще этот метод используют при анализах воды, в пищевой и молочной, но не в фармацевтической, промышленности; тем не менее это валидный метод, описанный в фармакопеях, и он подходит для фармацевтических материалов, особенно воды. Невысокая точность и прецизионность определения наиболее вероятного количества обычно приводят к тому, что этим методом пользуются как одним из последних средств, когда другие методы подсчета неуместны.

Измерение мутности — наиболее распространенный метод оценки общего количества бактерий в образце. Измерение мутности спектрофотометром или колориметром с определением концентрации по калибровочным кривым — простой способ стандартизации клеточных суспензий инокулятов при испытаниях антибиотиков или других антимикробных веществ. Эти методы мало подходят для грибов, так как их суспензии могут быть неоднородными или они могут оседать в кювете спектрофотометра. Альтернативным средством оценки грибковой биомассы является определение сухой массы центрифугата или выпаренного из дистиллированной воды осадка культуры известного объема. Прямой подсчет под микроскопом может подходить для бактерий, дрожжей и спор грибов, но не для плесеней; косвенные измерения биомассы, например по нерастворимому азоту, белку или нуклеиновым кислотам, возможны для всех типов клеток, но редко используются вне исследовательской лаборатории.

Традиционные методы подсчета жизнеспособных организмов одинаково ограничены:

- относительно трудоемки;
- нелегко автоматизировать;
- медленные, поскольку требуется инкубационный период, чтобы выросли колонии или помутнела жидкая культура;
- могут потребоваться довольно большие объемы культуральных сред, много чашек Петри и места в термостате.

По этим причинам в последние годы большой интерес и усилия направлены в сторону использования так называемых быстрых методов обнаружения и подсчета микроорганизмов (см. также главу 3). Они позволяют подсчитать жизнеспособные организмы — обычно бактерии и дрожжи, но не плесени — за несколько часов; типичная для традиционных методов 24–48-часовая (или более длительная) инкубация не требуется. В этих альтернативных методах используют принцип косвенного обнаружения живых клеток; наиболее распространенные из них представлены ниже.

- В эпифлюоресцентных методах используют флюоресцентные красители, которые окрашивают в разные цвета живые и мертвые клетки (например, акридиновый оранжевый), либо, будучи бесцветными вне клетки, флюоресцируют при поглощении и участии в метаболизме клетки (например, диацетат флюоресцеина в неповрежденных клетках расщепляется внутриклеточной эстеразой, и накапливающийся флюоресцеин светится в ультрафиолетовых лучах). Это используется в автоматизированной эпифлюоресцентной микроскопии и методологии лазерного сканирования.
- Живые клетки вырабатывают легко высвобождаемый АТФ, который затем обнаруживают с помощью ферментных анализов; например, люциферин в присутствии АТФ под воздействием люциферазы светлячков излучает свет (процесс биолюминесценции). Чтобы получить достаточное для обнаружения количество АТФ, часто используется этап обогащения; затем

можно измерить излучение и получить значение концентрации бактерий. Когда клетки располагаются на мембранном фильтре, образцы можно проанализировать с помощью программы для анализа изображений.

- Электрические свойства культуральной среды (сопротивление, емкость или импеданс) в результате роста и метаболизма бактерий или дрожжей изменяются в зависимости от концентрации клеток.
- Для мониторинга роста клеток, которые в ходе метаболизма потребляют кислород или производят значительные количества углекислого газа, подходят методы респирометрии, где изменения давления газа можно измерить датчиками давления (в закрытом сосуде) или при манометрии. Накопление углекислого газа в ростовой среде может также привести к снижению pH, что обнаруживается подходящим колориметрическим индикатором. Обнаружение жизнеспособных микробов в том или ином количестве не имеет прямой связи с исходной бионагрузкой.
- Метаболически активные («дышащие») клетки можно обнаружить методом колориметрического анализа, например с использованием солей тетразолия, продукты восстановления которых (формазаны) изменяют цвет среды пропорционально количеству «дышащих» организмов; этот метод можно адаптировать для микротитровальных планшетов.

Эти быстрые методы легко автоматизировать, и для них не требуется много чашек Петри и термостатов. С другой стороны, в отличие от традиционных методов, для них часто требуется дорогое оборудование, есть ограничения по пределам обнаружения и по определенным типам образцов. Кроме того, иногда возникают проблемы с согласованием результатов, полученных альтернативными и традиционными методами. Новыми методами можно обнаружить метаболизирующие организмы, которые неспособны к размножению и формированию видимых колоний [жизнеспособные, но не культивируемые организмы (viable but non-culturable — VBNC)], поэтому они могут давать результаты намного выше, чем у традиционных методов; в этой связи регуляторные органы должны внимательнее относиться к данным, полученным быстрыми методами. Тем не менее их все более широко применяют, а теперь и указывают в фармакопейных статьях; предпочтительные из них в обозримом будущем, вероятно, станут неотъемлемой частью методов подсчета в фармацевтической микробиологии.

2.6. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Природа генетического материала в микробных клетках и способ его переноса в другие клетки в значительной степени зависят от того, является организм прокариотом или эукариотом (см. раздел 2.1.2).

2.6.1. Бактерии

Гены для роста и метаболизма бактерий обычно содержатся в хромосоме — двуспиральной кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ее обозначают как ccc ds DNA — covalently closed circle double-stranded deoxyribonucleic acid). Дополнительные гены, обычно придающие клетке преимущество для выживания в определенных условиях, также могут содержаться в плазмидах; по структуре они обычно похожи на хромосому, но намного меньше и реплицируются независимо (см. главы 3, 13). Полный комплект генов клетки, то есть в хромосоме, плазмиде(ах) и полученных из других источников материалах, например в бактериофагах (вирусах бактерий), называют геномом клетки.

Как правило, длина бактериальной хромосомы составляет 1 мм или более; она содержит 1000–3000 генов. Поскольку размер клетки у многих бактерий около 1 мкм, ясно, что в таком объеме хромосома должна быть плотно уложена. Хотя все гены содержатся в одной хромосоме (а не в двух или более), клетка в любое время может содержать несколько копий этой хромосомы. Обычно несколько копий бывает в периоды быстрого деления клеток, но у некоторых видов постоянно много копий. Механизмы передачи бактериальных генов из одного организма в другой описаны в главе 3.

Нуклеотидные последовательности бактериального генома обычно высококонсервативны, особенно в случае рибосом, и не зависят от условий культивирования; в этой связи они идеально подходят для целей идентификации. Разработанные методы генотипической идентификации бактерий включают ДНК–ДНК-гибридизацию с зондом, генное секвенирование рибосомальной РНК 16S и 23S и аналитическое риботипирование после расщепления ДНК особыми рестрикционными ферментами. Целевую ДНК можно амплифицировать методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (см. главу 24). Эти методы генотипирования технически сложны и, как правило, не используются для обычной характеристики микрофлоры, а только для критической идентификации контаминантов.

Плазмиды обычно напоминают хромосому, но составляют лишь 0,1–1,0% размера бактериальной хромосомы; известно несколько линейных, а не кольцевых плазмид. Гены плазмид необязательны для нормального функционирования клетки, но могут кодировать свойство, дающее преимущество при выживании в определенных условиях окружающей среды; когда такие условия возникают, бактерии с рассматриваемой плазмидой будут отобраны (и размножатся). Кодируемые плазмидами свойства включают способность использовать необычные сахара или источники питания, выработку токсина, пилей, облегчающих прикрепление клетки к субстрату (например, кишечному эпителию), устойчивость к антибиотикам. В клетке может содержаться несколько копий плазмиды, а также две

или более разных плазмид. Некоторые разные плазмиды не могут сосуществовать внутри одной клетки (несовместимы); это позволяет классифицировать плазмиды по группам несовместимости.

Плазмиды реплицируются в клетке независимо от хромосомы, и после бинарного деления копию плазмиды содержат обе дочерние клетки. Плазмиды могут также передаваться различными путями из одной клетки в другую (см. главу 3). Некоторые плазмиды в высокой степени специфичны и могут передаваться только между штаммами одного и того же вида, а другие, особенно те, которые часто встречаются у грамотрицательных кишечных бактерий, могут преодолевать при этом видовые и даже родовые барьеры. Конъюгативные (самотрансмиссивные) плазмиды кодируют гены, обеспечивающие их собственный перенос из одной клетки в другую посредством формирования пилей. Эти половые ворсинки сначала образуют контакт между двумя клетками, а затем сокращаются, удерживая донора и реципиента вместе, пока не произойдет слияние их мембран.

2.6.2. Эукариоты

Эукариотические микроорганизмы (дрожжи, плесени, водоросли и простейшие) имеют ядро, в котором обычно содержится одна или несколько пар линейных хромосом в виде комплекса двуспиральной ДНК с белком. Клетки делятся бесполым путем, а ядро подвергается митозу — ряду событий, посредством которых ядро и хромосомы внутри него реплицируются с образованием идентичных копий. У большинства эукариот также есть потенциал для полового размножения, когда ядро подвергается мейозу — более специализированному делению ядра и хромосом с формированием новых комбинаций генов, в силу чего потомство отличается от родителей. Несмотря на потенциал, у некоторых эукариотических клеток, особенно грибов, половую стадию в жизненном цикле никогда не наблюдали. У многих эукариотических микроорганизмов имеются плазмиды, а плазмиды некоторых грибов содержат не ДНК, а РНК.

2.6.3. Генетическая изменчивость и экспрессия генов

Микроорганизмы могут быстро адаптироваться к новой среде, применяя стратегии избегания или минимизации стрессовых или потенциально вредных воздействий. Их способность выживать в неблагоприятных условиях может объясняться использованием существовавших генов или приобретением новой генетической информации. Термином «генотип» обозначают генетический состав организма, то есть гены, которыми обладает организм, независимо от того, экспрессируются они или нет. Микробная клетка нередко обладает тем или иным геном, но не экспрессирует его (то есть не производит кодируемый им белок или фермент) до тех пор, пока такой продукт реально не требуется; это простой механизм, чтобы избежать затрат энергии. Так, многие бактерии обладают генами, кодирующим синтез β-лактамаз — ферментов, которые гидролизуют и инактивируют β-лактамные антибиотики (например, пенициллины). У многих организмов β-лактамазы продуцируются только в ответ на присутствие антибиотика. Такую форму негенетической адаптации называют фенотипической, и существует много ситуаций, когда бактерии фенотипически изменяются для противодействия стрессовому фактору среды. Но могут также использовать альтернативную стратегию — генетическую адаптацию, когда они приобретают новые гены посредством мутации или конъюгации (см. главу 3); последующий процесс отбора обеспечивает количественное доминирование мутантных организмов, которые лучше подходят для новой среды.

У бактерий мутация является важным механизмом приобретения устойчивости к антибиотикам и другим антимикробным химическим средствам, хотя очень важно также получение совершенно новых генов от других бактерий. Частота спонтанных мутаций (независимых от мутагенных химических веществ или ионизирующего излучения) существенно варьирует в зависимости от гена и организма, но типичная их частота — 10^{-5}–10^{-7}. Это означает, что мутант возникает в среднем 1 раз на каждые 100 тыс. — 10 млн делений клетки. Хотя эти цифры указывают, что мутация происходит относительно редко, с учетом скорости размножения микроорганизмов можно ожидать, например, что мутанты с повышенной устойчивостью к антибиотикам возникнут довольно быстро в ходе терапии.

2.7. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ КАТЕГОРИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ

В **табл. 2.4** показаны различные типы актуальных для фармации микроорганизмов. Важность вирусов почти исключительно обусловлена их патогенным потенциалом; ввиду отсутствия внутреннего метаболизма они нечувствительны к антибиотикам. Отчасти по этой причине вирусные инфекции — одни из наиболее опасных и трудных в лечении; из всех микроорганизмов к категории 4 (наиболее опасным) Консультативный комитет по опасным патогенам отнес только вирусы. Поскольку они не являются свободноживущими, то неспособны расти в готовых лекарствах или сырье; они не вызывают порчу продукции, и у них нет синтетических способностей, которые можно использовать при производстве лекарств. Вирусы довольно легко уничтожить прогреванием, радиацией или химическими веществами, поэтому контаминация ими не представляет проблемы. В этом они контрастируют с прионами; хотя некоторые власти не поддерживают отнесение этих возбудителей к микроорганизмам, они включены

Таблица 2.4. Фармацевтическое значение основных категорий микроорганизмов

Тип микроорганизма	Фармацевтическая значимость				
	Загрязнение или порча сырья и лекарственных препаратов	Патогенные микроорганизмы	Устойчивость к антибиотикам и микробицидам	Устойчивость к средствам и процессам стерилизации	Использование в изготовлении терапевтических средств
Вирусы	+	+	–	–	+ (вакцины)
Прионы	+	+	–	+	–
Бактерии					
Грамотрицательные	+	+	+	–	+
Грамположительные	+	+	+	+ (споры)	+
Дейнококки	–	–	–	+ (*D. radiodurans*)	–
Микобактерии	–	+	+	–	–
Стрептомицеты	–	+	–	–	+
Хламидии	–	+	–	–	–
Риккетсии	–	+	–	–	–
Микоплазмы	–	+	–	–	–
Грибы					
Дрожжевые	+	+	+	–	+
Плесневые	+	+	+	–	+
Простейшие	–	+	–	–	–

сюда ввиду их несомненной способности вызывать пока еще неизлечимые смертельные заболевания и ввиду их крайней устойчивости к летальным воздействиям. Фармацевты и медицинский персонал в целом должны знать о способности прионов легко выдерживать условия стерилизации, губительные для всех других категорий возбудителей инфекций.

В **табл. 2.4** приведены примеры бактерий, важных для каждого из направлений, обозначенных заголовками столбцов. Многие из важных для медицины и фармацевтики бактерий являются патогенными, и некоторые из них давно известны по своей способности противостоять активности антибиотиков и микробицидов (дезинфектантов, антисептиков и консервантов). В дополнение к ним позднее причиной озабоченности стали другие бактерии, включая устойчивые к метициллину *S. aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA), устойчивые к ванкомицину энтерококки (VSE) и полирезистентные *Mycobacterium tuberculosis* (см. главу 13).

Если антибиотики пенициллин и цефалоспорин вырабатывают грибы, то большинство категорий других клинически важных антибиотиков вырабатывают бактерии, особенно стрептомицеты. Кроме того, различные бактерии коммерчески используют в производстве других лекарств, включая стероиды, ферменты и углеводы. Способность бактерий расти на различных субстратах определяет их хорошо известный потенциал для порчи изготовленных лекарств и сырья, а способность многих видов выживать после высушивания означает, что они хорошо выживают в пыли и поэтому важны как контаминанты производимых лекарств. В наибольшей степени способность выживать не только в сухих, но и в других неблагоприятных условиях (тепловое, лучевое, химическое воздействие и др.) проявляется у бактериальных спор, и их положение «чемпионов» по сопротивлению летальным средствам привело к применению спор в качестве индикаторных организмов, которые должны уничтожаться в большинстве методов стерилизации (см. главу 21).

Подобно бактериям, грибы формируют выживающие при высушивании споры, которые также обычно рассматривают в качестве контаминантов производимых лекарств. Вместе с тем степень резистентности спор обычно меньше, чем у бактерий, и грибы не представляют проблемы для стерилизации. Грибы обычно не являются значимой инфекционной угрозой; лишь немногие виды грибов считаются важными возбудителями болезней животных с полностью функциональной иммунной системой. Однако есть несколько грибов, которые, будучи малоопасными для иммунокомпетентных лиц, способны вызвать инфекцию у людей с нарушением иммунной функции; для описания таких микроорганизмов (всех типов) применяют термин «оппортунистические».

В этой связи стоит отметить, что группа иммунодефицитных пациентов все возрастает, и не только за счет ВИЧ/СПИД. Иммунная функция нарушается по ряду других причин, например врожденный иммунодефицит, рак (особенно лейкоз), лучевая терапия и химиотерапия, использование системных глюкокортикоидов и иммуносупрессивных препаратов (часто после трансплантации тканей или органов), тяжелые ожоги, недоедание.

Простейшие имеют значение в основном из-за патогенного потенциала нескольких видов. Поскольку у простейших нет клеточной стенки, они плохо выживают при высушивании (кроме цист) и не являются проблемой в производственной среде; даже в форме цист у них не проявляется такая устойчивость к стерилизующим факторам, как у бактериальных спор. Следует отметить, что в умеренном климате простейшие сегодня не являются проблемой для здоровья человека; они значительно более важны в условиях тропиков и для ветеринарной медицины. Существуют опасения, что ввиду глобального потепления географические зоны протозойных инфекций, таких как малярия, могут существенно сдвинуться.

2.8. СОХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Помимо изготовления лекарств, микроорганизмы используют в различных анализах, особенно для измерения активности антимикробных веществ (см. главу 19). В этой связи полезные организмы следует правильно хранить, чтобы при хранении их желаемые свойства не менялись или ценная культура не погибла, что еще хуже. В течение нескольких дней или даже недель многие бактерии и грибы удобно хранить в виде жидких культур в пробирках или колоний на чашках Петри. Если спорообразующие организмы, бактерии *Bacillus* и *Clostridium,* а также большинство грибов можно хранить в течение месяцев или даже лет при условии, что культуральная среда не высыхает, то неспорообразующие существенно различаются по способности к выживанию. Грамположительные бактерии, как правило, выживают лучше, чем грамотрицательные: например, *Pseudomonas aeruginosa* в виде колоний на среде в незапечатанных чашках Петри могут погибнуть в течение нескольких недель, даже при охлаждении. Если даже сохраняемая в холодильнике культура не погибает полностью, существует риск того, что *выжившие* клетки не являются типичными для популяции в целом; это могут быть, например, мутанты с повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям, которые не дадут ожидаемых результатов в тестах на антибиотическую активность. Следовательно, две цели хранения культуры — это поддержание жизнеспособности максимально возможного процента клеток и минимизация риска отбора атипичных мутантов.

Наиболее распространенные методы длительного хранения: замораживание при −80 °C (или ниже) в морозильниках, хранение в жидком азоте при −196 °C в специальных сосудах или лиофильная сушка (также называемая лиофилизацией). В каждом случае, чтобы минимизировать образование повреждающих кристаллов льда и осмотических напряжений, губительных для клеток при замораживании-оттаивании, в жидкую культуру включают (около 10% об./об.) криопротекторы, например глицерин или диметилсульфоксид.

Референсные культуры с четко определенными биосинтетическими способностями или резистентностью можно получить в лиофилизированной форме из международных коллекций культур, например из American Type Culture Collection — Американской коллекции типовых культур (они имеют аббревиатуру ATCC перед своим номером) или из Британской национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий Великобритании (National collection of industrial, food and marine bacteria — NICMB). Все чаще фармакопеи и регуляторные агентства требуют испытаний с использованием культур или тест-суспензий микроорганизмов, прошедших не более пяти пассажей (субкультур) из эталонного материала определенной коллекции культур.