

**Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
“Уральская государственная медицинская академия”
Министерства здравоохранения и социального развития
Российской Федерации**

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

Литусов Н.В.

БАКТЕРИОФАГИ

Иллюстрированное учебное пособие

Екатеринбург, 2012

УДК 612

Рецензент: доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней УГМА Борзунов В.М.

Литусов Н.В. Бактериофаги. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2012. - 38 с.

В иллюстрированном учебном пособии рассматриваются вопросы истории открытия и изучения бактериофагов, их строение, свойства, классификация, репродукция и возможность практического использования.

Учебное пособие предназначено для внеаудиторной подготовки студентов 2 курсов, обучающихся по специальностям 060101 (лечебное дело), 060103 (педиатрия), 060105 (медико-профилактическое дело), 060201 (стоматология) и 060301 (фармация).

Содержание

Историческая справка	4
Классификация бактериофагов	8
Строение и химический состав бактериофагов.....	10
Резистентность фагов.....	18
Взаимодействие фага с бактериальной клеткой	18
Участие бактериофагов в генетическом обмене у бактерий	24
Практическое применение бактериофагов	25
Выделение и производство бактериофагов	29
Вопросы для контроля усвоения материала	32
Тренировочные тесты	32
Литература	37

Историческая справка

Бактериофаги (греч. *phagos* - пожирающий, лат. *bacteriophaga* - разрушающий бактерии) - это вирусы бактерий, обладающие способностью специфически проникать в бактериальные клетки, репродуцироваться в них и при выходе потомства вызывать в большинстве случаев разрушение (лизис) бактерий.

Впервые о явлении бактериофагии сообщил в 1896 г. британский бактериолог Эрнест Ханкин (1865-1939 гг.). Он отметил, что вода рек Индии обладает бактерицидными свойствами в отношении холерных вибрионов. При исследовании воды он выявил наличие в ней факторов, проникающих через бактериальный фильтр и вызывающих лизис возбудителя холеры.

В 1898 г. явление бактериофагии наблюдал русский ученый Н.Ф. Гамалея (рисунок 1) на примере спонтанного лизиса сибиреязвенных бактерий.



Рисунок 1 - Николай Федорович Гамалея (1859-1949 гг.).

Н.Ф. Гамалея обнаружил, что мутная суспензия клеток возбудителя сибирской язвы иногда может просветляться, а образующаяся прозрачная жидкость в течение 6-12 часов способна вызывать разрушение свежих культур сибиреязвенного микроба (перевиваемый лизис бактерий). Эти вещества, способные разрушать бактерии, автор назвал “бактериолизинами”.

В 1915 г. английский бактериолог Ф. Туорт (рисунок 2) описал феномен “стекловидного перерождения” колоний стафилококков. Он отметил, что некоторые штаммы стафилококка образовывали колонии, которые со временем изменяли свою типичную форму и становились прозрачными. Клетки из измененных колоний теряли способность к пересевам, а внесение их в свежие культуры стафилококков приводило к лизису бактерий. При микроскопическом исследовании прозрачных колоний стафилококков обнаруживались разрушенные бактериальные клетки. Ф. Туорт объяснял это явление существованием бактериолитического фактора, вырабатываемого самими бактериями.



Рисунок 2 - Фредерик Туорт (1877-1950 гг.).

В 1917 г. канадский микробиолог Ф. д'Эрелль (рисунок 3) при изучении возбудителя дизентерии наблюдал лизис бактериальной культуры при внесении в нее фильтрата испражнений больных людей. Добавление даже одной капли фильтрата испражнений к мутной бульонной культуре дизентерийных бактерий приводило к полному просветлению жидкости. Лизирующее действие агента не только сохранялось, но и значительно усиливалось после многократного пассирования на культуре дизентерийных бактерий.



Рисунок 3 - Феликс Хьюберт д'Эрелль (1873-1949 гг.),

Подобный эффект Ф. д'Эрелль наблюдал на плотных питательных средах, засеянных смесью литического агента и дизентерийных бактерий. При этом на фоне сплошного бактериального роста появлялись участки округлой формы, на которых рост культуры отсутствовал – так называемые стерильные пятна, участки лизиса бактерий, негативные колонии, бляшки. На основании своих опытов Ф. д'Эрелль сделал заключение о том, что литический агент является паразитом бактерий, проходящим через фильтры. Этот литический агент Ф. д'Эрелль назвал **бактериофагом** (“пожирателем” бактерий), а литическое действие бактериофага - **бактериофагией**. В последующем это явление было названо феноменом Туорта -

д'Эрелля (разрушение бактерий в результате инфицирования их бактериальными вирусами).

Кроме того Ф. д'Эрелль высказал предположение, что бактериофаг размножается внутри микробных клеток, в результате чего в окружающую среду поступают многочисленное дочернее потомство. Размножение бактериофага в микробных клетках на плотной питательной среде проявляется формированием стерильных пятен или негативных колоний. В жидкой питательной среде размножение бактериофага приводит к просветлению среды. Позднее было установлено, что бактериофаги размножаются только внутри бактерий определенных видов. Это наблюдение позволило использовать бактериофаги в лечебных целях. Ф. д'Эрелль впервые применил бактериофаги для лечения бубонной чумы в Египте и холеры в Индии. В 1934-1937 гг. Ф. д'Эрелль работал в Тбилиси, где участвовал в создании НИИ бактериофагов, микробиологии и вирусологии им. Г. Элиава (рисунок 4).



Рисунок 4 - Феликс д'Эрелль и Григорий Элиава в Тбилиси.

В последующие годы бактериофаги были обнаружены более чем у 100 видов патогенных и непатогенных бактерий. Однако изучение ультраструктуры бактериофагов стало возможным после изобретения электронного микроскопа. Первый просвечивающий электронный микроскоп сконструировали в 1931 г. немецкие инженеры-электронщики М. Кнолл (рисунок 5) и Э. Руска (рисунок 6).



Рисунок 5 - Макс Кнолл (1897-1969 гг.).

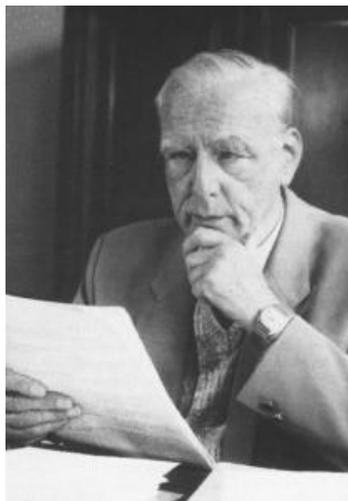


Рисунок 6 - Эрнст Руска (1906-1988 гг.).

В 1986 г. Э. Руска за разработку электронного микроскопа был удостоен Нобелевской премии. Первые электронные микрофотографии бактериофагов получил брат Э. Руска - Г. Руска (рисунок 7).

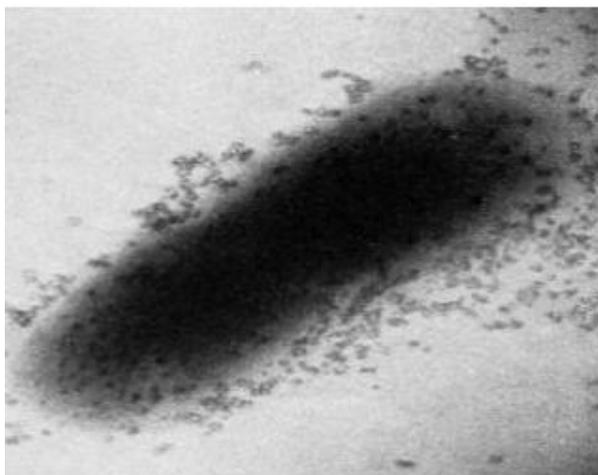


Рисунок 7 - Гельмут Руска (1908-1973 гг.) и сделанная им электронная фотография кишечной палочки, инфицированной бактериофагом.

Бактериофаги широко распространены в природе - их выделяют из воды, почвы, кишечника человека, животных и птиц, из продуктов питания, то есть из тех объектов, в которых обитают микроорганизмы. Во внешнюю среду бактериофаги могут попадать с выделениями больных, реконвалесцентов и носителей. В связи с этим бактериофаги кишечных бактерий являются показателями фекального загрязнения почвы и воды.

Бактериофаги находят широкое практическое применение. В 1921 г. Ричард Брайонг и Джозеф Мэйсин впервые описали способ лечения стафилококковых поражений кожи с помощью бактериофагов. С тех пор бактериофаги находят широкое применение для диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

Классификация бактериофагов

Вирусы бактерий объединены в класс *Bacteriophagae*. При классификации бактериофагов учитывают морфологию фаговых частиц, спектр действия, физико-химический состав, антигенную структуру и другие свойства. В настоящее время согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов в зависимости от типа нуклеиновой кислоты бактериофаги подразделяются на ДНК- и РНК-содержащие. Большинство фагов относится к ДНК-содержащим вирусам с нуклеокапсидом, организованным по принципу смешанной симметрии. В состав бактериофагов может входить как одноцепочечные, так и двуцепочечные молекулы ДНК или РНК. По морфологии фаговых частиц и типу нуклеиновой кислоты бактериофаги распределены на семейства (таблица 1).

Таблица 1 – Семейства бактериофагов

Бактериофаги	Семейства	Особенности строения
ДНК-содержащие бактериофаги	<i>Myoviridae</i>	Головка сферической или овальной формы и сокращающийся хвостовой отросток, двунитевая ДНК
	<i>Siphoviridae</i>	Головка сферической формы и длинный несокращающийся хвостовой отросток, двунитевая ДНК
	<i>Podoviridae</i>	Головка сферической формы и короткий несокращающийся хвостовой отросток, двунитевая ДНК
	<i>Lipothrixviridae</i>	Нитевидная форма, двунитевая ДНК
	<i>Plasmaviridae</i>	Округлая форма, двунитевая ДНК
	<i>Corticoviridae</i>	Округлая форма, липиды в составе многослойной оболочки, шипы, двунитевая ДНК
	<i>Fuselloviridae</i>	Форма лимона, короткий хвостовой отросток, двунитевая ДНК
	<i>Tectiviridae</i>	Округлая форма, отсутствие хвостового отростка, шипы, двунитевая ДНК
	<i>Microviridae</i>	Округлая форма, отсутствие хвостового отростка, однонитевая ДНК
	<i>Inoviridae</i>	Палочковидная форма, однонитевая ДНК
РНК-содержащие бактериофаги	<i>Cystoviridae</i>	Сферическая форма, сегментированная двунитевая РНК
	<i>Leviviridae</i>	Сферическая форма, плюс-РНК

По форме бактериофаги подразделяются на следующие морфологические группы или типы (рисунок 8):

- **нитевидные фаги;**
- **мелкие фаги без отростка;**

- кубические фаги с аналогом (рудиментом) отростка;
- фаги с коротким отростком (хвостом);
- фаги с длинным отростком и несокращающимся чехлом;
- фаги с длинным отростком и сокращающимся чехлом.

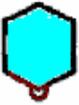
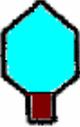
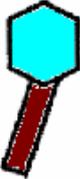
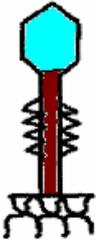
Морфологические типы бактериофагов					
1	2	3	4	5	6
					
Нитевидные фаги	Фаги без отростка	Фаги с аналогом отростка	Фаги с коротким отростком	Фаги с длинным отростком и несокращающимся чехлом	Фаги с длинным отростком и сокращающимся чехлом

Рисунок 8 – Распределение бактериофагов на морфологические типы.

Каждый бактериофаг вызывает лизис (растворение) определенного вида бактерий. Поэтому бактериофаги обозначают буквами латинского или русского алфавита с цифровым индексом, перед которыми указывают название вида бактерий (например, фаги *E. coli* T2). Фаги, лизирующие дизентерийные бактерии, называются дизентерийными бактериофагами, лизирующие сальмонеллы - сальмонеллезными бактериофагами, лизирующие дифтерийные бактерии - дифтерийными бактериофагами и т. д. Бактериофаги не способны инфицировать эукариотические клетки.

По спектру литического действия выделяют следующие группы бактериофагов:

- **типовые** (типоспецифические) бактериофаги (Т-фаги) взаимодействуют с отдельными типами (вариантами) бактерий внутри одного вида;
- **моновалентные** бактериофаги (монофаги) взаимодействуют с бактериями одного вида;
- **поливалентные** бактериофаги (полифаги) взаимодействуют с бактериями нескольких родственных видов.

По механизму взаимодействия с клетками бактериофаги подразделяются на вирулентные и умеренные. **Вирулентные бактериофаги** (литические бактериофаги) проникают в бактерии, размножаются в них и выходят из бактериальной клетки, вызывая ее лизис. **Умеренные бактериофаги** после проникновения в клетку встраивают свою нуклеиновую кислоту в геном бактерии и не вызывают ее лизиса.

Строение и химический состав бактериофагов

Строение бактериофагов изучают с помощью электронной микроскопии. При этом для контрастирования образцы напыляют металлами или фосфорно-вольфрамовой кислотой. Особенности строения бактериофагов разных семейств представлены на рисунке 9.

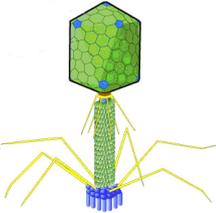
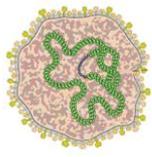
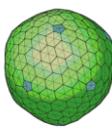
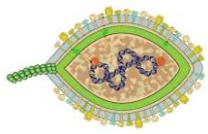
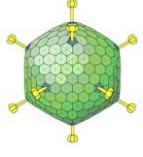
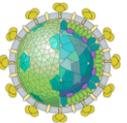
ДНК-содержащие фаги				
				
<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Podoviridae</i>	<i>Lipothrixviridae</i>	<i>Plasmaviridae</i>
				
<i>Corticoviridae</i>	<i>Fuselloviridae</i>	<i>Tectiviridae</i>	<i>Microviridae</i>	<i>Inoviridae</i>
РНК-содержащие фаги				
				
<i>Cystoviridae</i>		<i>Leviviridae</i>		

Рисунок 9 – Особенности строения ДНК- и РНК-содержащих фагов.

Бактериофаги разных морфологических типов и семейств значительно отличаются друг от друга по своему строению. Бактериофаги первого морфологического типа представляют собой палочковидные или нитевидные структуры (рисунок 10).

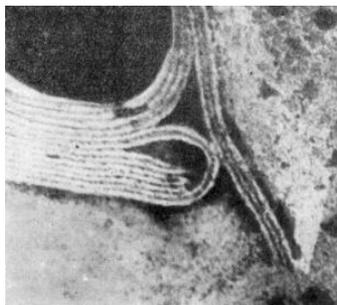


Рисунок 10 - Бактериофаги первого морфологического типа. Электронная микроскопия.

Фагами первого морфологического типа являются представители семейств *Lipothrixviridae* и *Inoviridae* (рисунки 11 и 12).

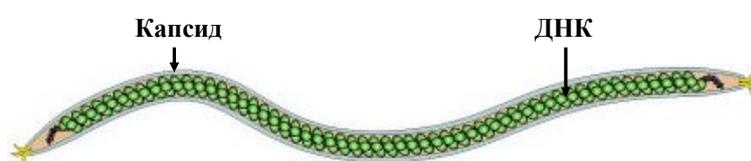
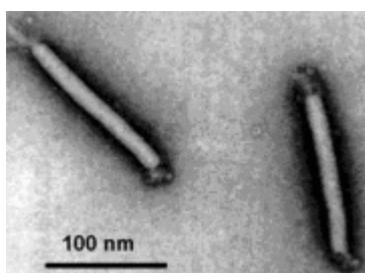


Рисунок 11 - Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Lipothrixviridae*.

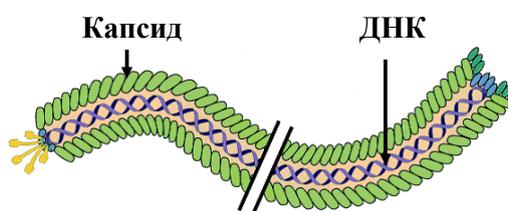


Рисунок 12 - Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Inoviridae*.

Бактериофаги второго морфологического типа состоят из одной головки без отростка (рисунок 13).

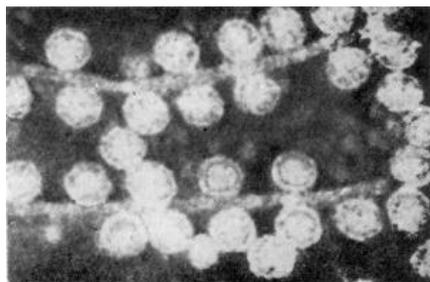


Рисунок 13 - Бактериофаги второго морфологического типа. Электронная микроскопия.

Бактериофаги, не имеющие хвостового отростка, относятся к семействам *Plasmaviridae*, *Corticoviridae* и *Microviridae* (рисунки 14-16).

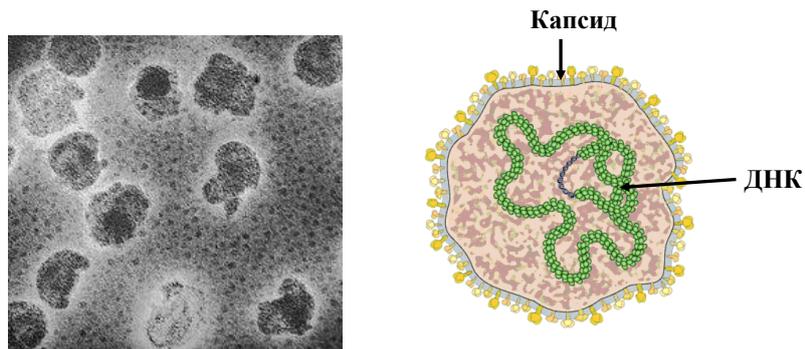


Рисунок 14 - Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Plasmaviridae*.

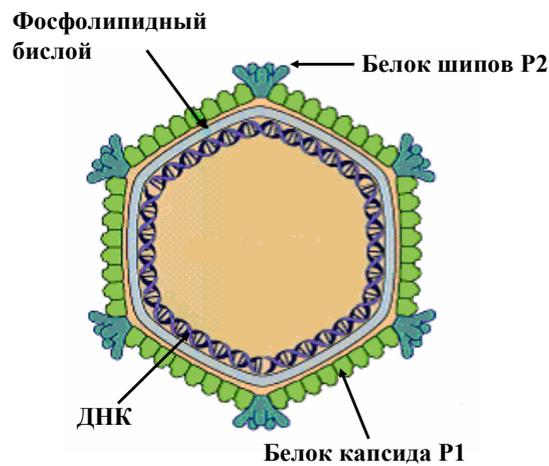


Рисунок 15 - Строение фагов семейства *Corticoviridae*.

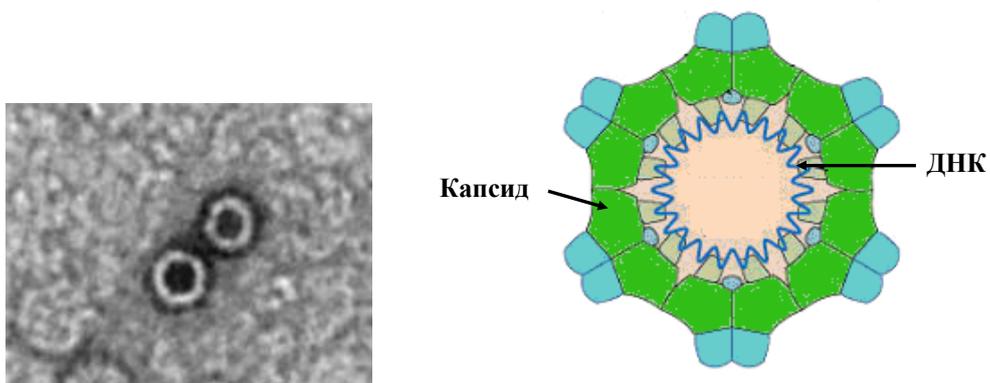


Рисунок 16 - Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Microviridae*.

Бактериофаги третьего морфологического типа имеют головку и небольшие выступы или аналоги отростка (рисунок 17).

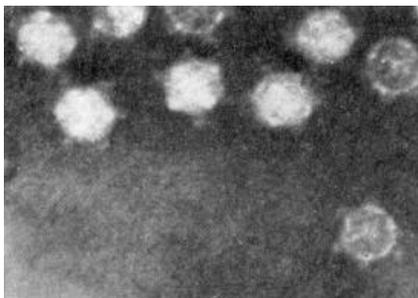


Рисунок 17 - Бактериофаги третьего морфологического типа. Электронная микроскопия.

Выступы и аналоги отростка отмечаются у представителей семейств *Tectiviridae*, *Cystoviridae* и *Leviviridae* (рисунки 18-21).

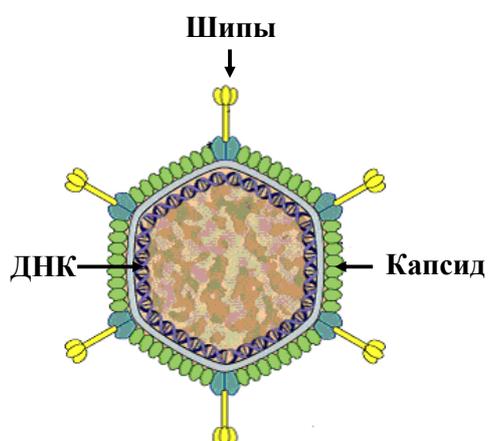


Рисунок 18 - Строение фагов семейства *Tectiviridae*.

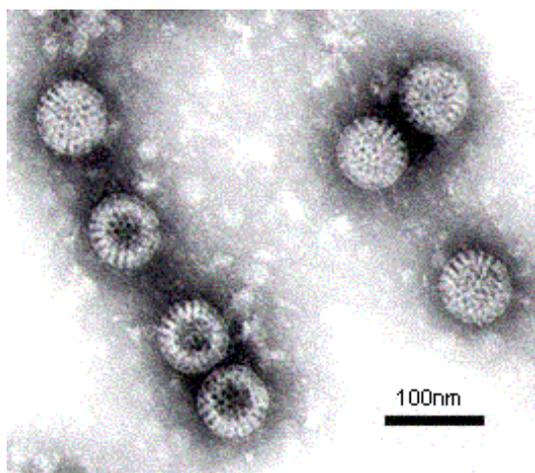


Рисунок 19 - Электронная микрофотография бактериофагов семейства *Cystoviridae*.

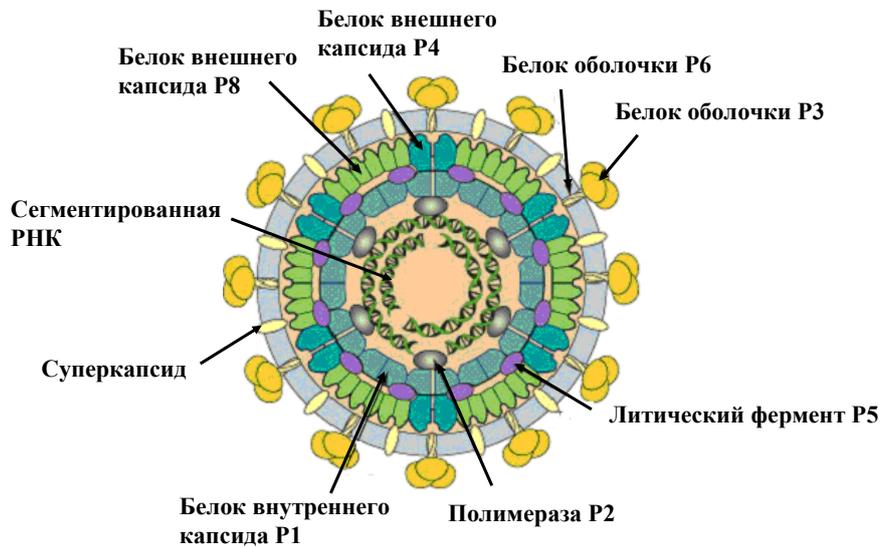


Рисунок 20 - Схема строения фагов семейства *Cystoviridae*.

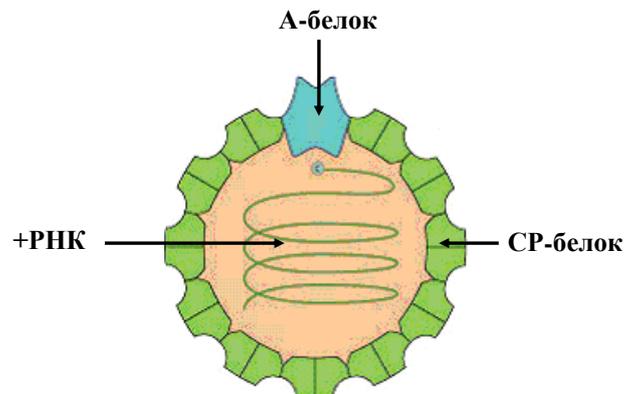


Рисунок 21 – Строение фагов семейства *Leviviridae*.

Бактериофаги четвертого морфологического типа содержат головку и короткий отросток (рисунок 22).

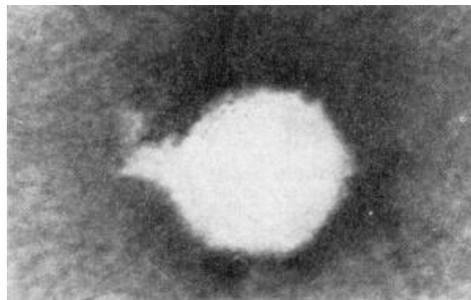


Рисунок 22 - Бактериофаги четвертого морфологического типа. Электронная микроскопия.

К бактериофагам четвертого морфологического типа относятся представители семейства *Podoviridae* и *Fuselloviridae* (рисунки 23 и 24).

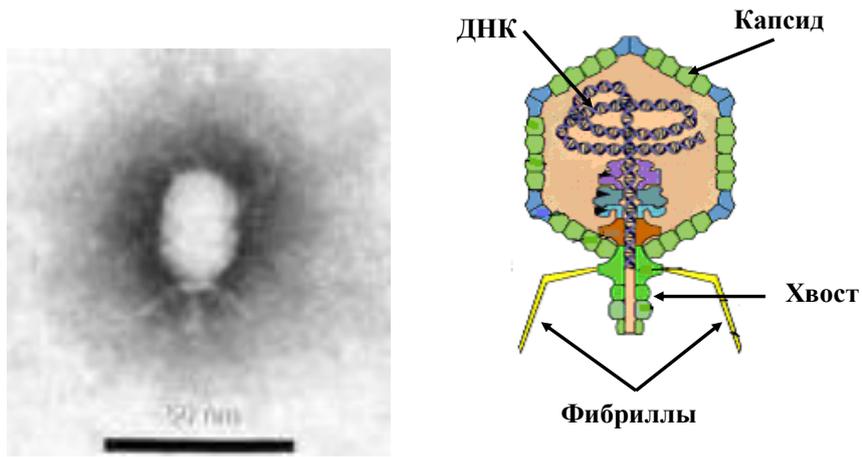


Рисунок 23 - Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Podoviridae*.

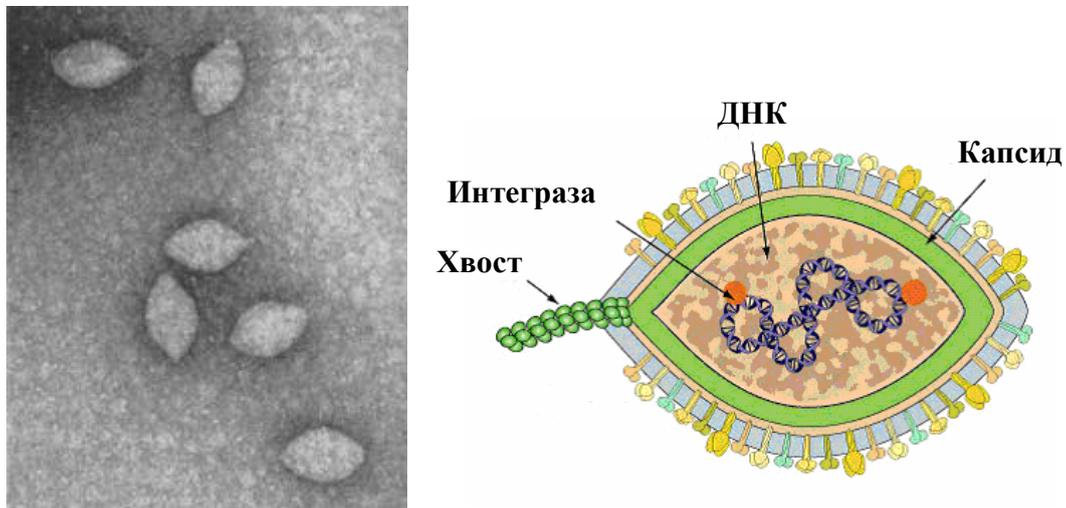


Рисунок 24 – Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Fuselloviridae*.

Бактериофаги пятого морфологического типа состоят из головки и длинного отростка, чехол которого не способен сокращаться (рисунок 25).

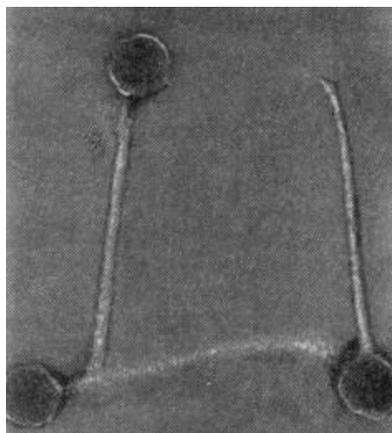


Рисунок 25 - Бактериофаги пятого морфологического типа. Электронная микроскопия.

К пятому морфологическому типу относятся бактериофаги семейства *Siphoviridae* (рисунок 26).

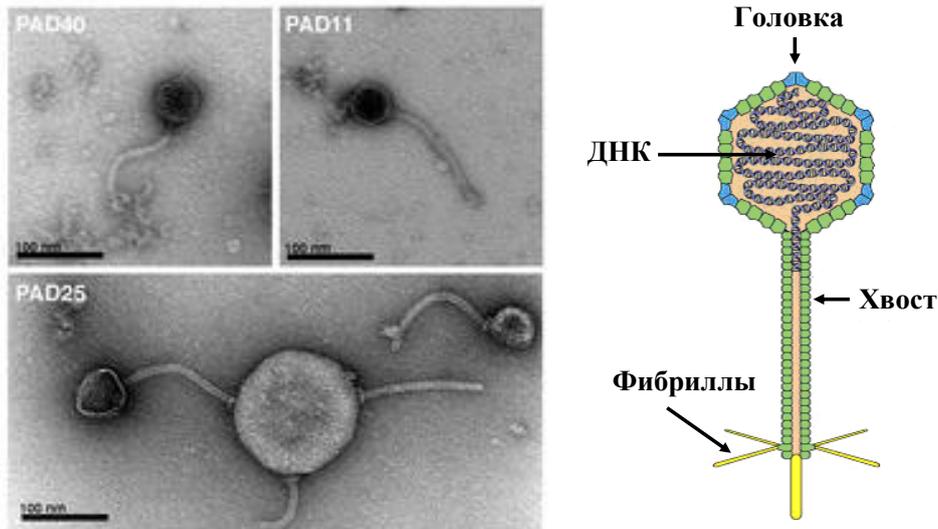


Рисунок 26 – Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Siphoviridae*.

Шестой морфологический тип объединяет бактериофаги, состоящие из головки и отростка, окруженного чехлом. Особенностью бактериофагов этого типа является то, что чехол, окружающий отросток, способен сокращаться (рисунок 27).

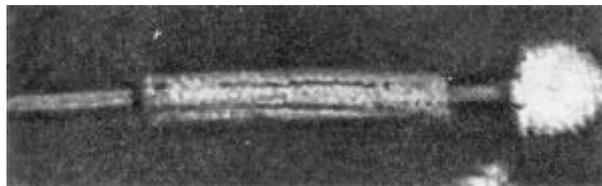


Рисунок 27 - Бактериофаги шестого морфологического типа. Электронная микроскопия.

Представителями шестого морфологического типа являются бактериофаги, относящиеся к семейству *Myoviridae* (рисунок 28).

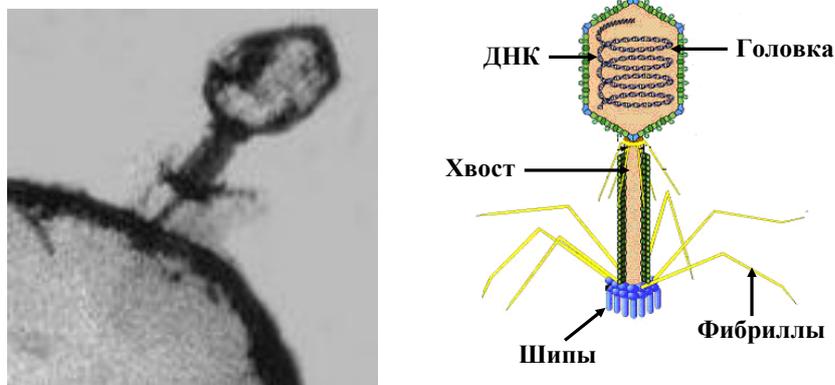


Рисунок 28 – Электронная микрофотография и схема строения фагов семейства *Myoviridae*.

Типичная фаговая частица состоит из головки и хвостового отростка. Длина хвостового отростка обычно в 2-4 раза больше диаметра головки. Размеры бактериофагов колеблются от 2 до 200 нм. Чем крупнее бактериофаги, тем больше у них генов и сложнее их жизненный цикл. Большинство бактериофагов напоминают сперматозоиды (головастики, барабанные палочки), то есть относятся к шестому морфологическому типу.

Головка фага имеет округлую или овальную форму диаметром 60-95 нм. Внутри головки содержится **геном** бактериофага, представленный нуклеиновой кислотой. Нуклеиновые кислоты бактериофагов могут быть одонитевыми, двунитевыми, линейными, кольцевыми. У большинства фагов геном образует спирально упакованная двойная нить ДНК. У некоторых фагов в головке находится белок, обеспечивающий суперспирализацию молекулы ДНК. В таком виде ДНК может упаковываться в сравнительно небольшом объёме головки. Нуклеиновая кислота бактериофага окружена белковой оболочкой - **капсидом**. Капсид состоит из белковых молекул (**капсомеров**), организованных по принципу кубической симметрии. Нуклеиновая кислота и капсид вместе составляют **нуклеокапсид**.

Хвостовой отросток бактериофагов организован по принципу спиральной симметрии. Отросток имеет длину до 250 нм и толщину 10-25 нм. Он состоит из **полого стержня** и **сократительного чехла**, который присоединяется к **воротничку**, окружающему стержень около головки. Белковый стержень является продолжением белковой оболочки головки. Стержень заканчивается шестиугольной **базальной пластинкой** с шестью **шипами** (зубцами). От каждого зубца отходит по одной нити (фибриллы) длиной 150 нм. У Т-чётных фагов концы фибрилл опущены вниз, а у нечётных фагов концы нитей загнуты вверх. Базальная пластинка и нити обуславливают адсорбцию бактериофага на бактериальной клетке. У некоторых бактериофагов в дистальной части хвостового отростка содержится лизоцим (эндолизин), облегчающий проникновение нуклеиновой кислоты бактериофага в бактериальную клетку. Строение бактериофага представлено на рисунке 29.

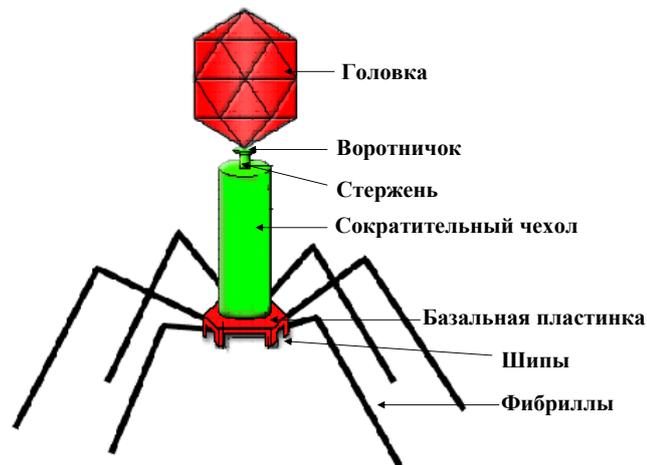


Рисунок 29 - Строение типичного бактериофага.

Сократительный чехол состоит из спирально свернутого белкового тяжа, обладающего способностью сокращаться. Эта способность к сокращению имеет большое значение при внедрении нуклеиновой кислоты бактериофага в бактериальную клетку. При адсорбции бактериофага на клеточной стенке бактерии

чехол сокращается, стержень проникает внутрь клетки и по нему нуклеиновая кислота впрыскивается в клетку.

Фаговая частица содержит 40-50% нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), 50-60% белка, до 12-17% углеводов, 2% липидов.

Бактериофаг является строгим **внутриклеточным паразитом**, так как он размножается только внутри бактериальной клетки. Он не культивируется на искусственных питательных средах и в живых биологических системах (культуры клеток, куриные эмбрионы, лабораторные животные).

Основным признаком бактериофагов является специфичность. **Специфичность бактериофагов** выражается в том, что каждый бактериофаг способен лизировать только определенный вид бактерий.

Бактериофаги обладают выраженными **антигенными свойствами**. При парентеральном введении бактериофага в организме образуются антитела, нейтрализующие литическую (растворяющую) активность фага. При этом действие антифаговых сывороток строго специфично. Кроме того фаги по антигенным свойствам отличаются друг от друга. У некоторых родственных фагов обнаруживаются групповые антигены. По антигенным свойствам фаги подразделяют на серологические группы. Для получения антифаговых сывороток используют кроликов, которых иммунизируют подкожно дважды в течение 3 недель. Сыворотку освобождают от форменных элементов центрифугированием.

Резистентность фагов

По сравнению с вирусами человека и животных бактериофаги более устойчивы к действию физических и химических факторов. Бактериофаги хорошо переносят высушивание и замораживание, длительно сохраняются при низких температурах (минус 195°C), сохраняют активность в широком диапазоне рН (2,5-8,5). Большинство бактериофагов инактивируется при температуре выше 65-70°C. Ультрафиолетовое и ионизирующее излучения снижают адсорбционную способность фага и его патогенность.

Сулема (0,5% раствор), фенол (1-2% раствор), спирт, эфир и хлороформ не оказывают на фаги инактивирующего действия. Губительно действует на бактериофаги 1% раствор формалина. Фаги быстро погибают при кипячении, действии кислот, ультрафиолетовых лучей, химических дезинфицирующих веществ. Некоторые вещества (например, хлороформ) не оказывают влияния на фаги, но вызывают гибель бактерий. Такие вещества используют для сохранения бактериофагов и предотвращения их контаминации микроорганизмами.

Взаимодействие фага с бактериальной клеткой

После проникновения фага в бактериальную клетку возможно два пути их развития: литический и лизогенный. В связи с этим по характеру взаимодействия с бактериальной клеткой различают вирулентные и умеренные фаги. **Вирулентные фаги** проникают в бактериальную клетку, репродуцируются в ней и вызывают ее

лизис (**литический цикл**). **Умеренные фаги**, проникнув в бактериальную клетку, встраивают свою ДНК в геном бактерии и в виде профага передаются по наследству от клетки к клетке, не вызывая лизиса бактерий (**лизогенный цикл**). Жизненный цикл вирулентного фага складывается из следующих стадий.

1. **Адсорбция** бактериофага на клеточной стенке бактерий (рисунок 30).

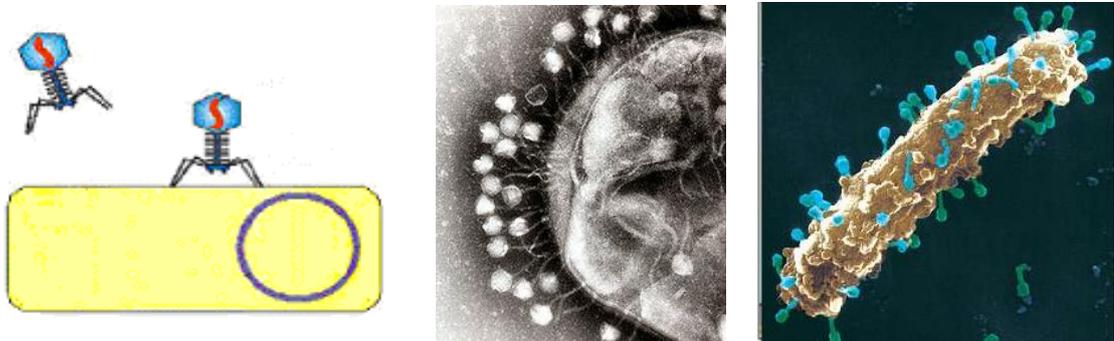


Рисунок 30 - Адсорбция бактериофага на клеточной стенке бактерии.

В процессе адсорбции фаги прикрепляются своими жгутиками (фибриллами), шипами или специфическими белками к фагоспецифическим рецепторам на клеточной стенке бактерий. На бактериях без клеточной оболочки (протопластах, L-формах) фаги не адсорбируются. Некоторые мелкие фаги в качестве рецепторов используют F-пили бактерий (рисунок 31).

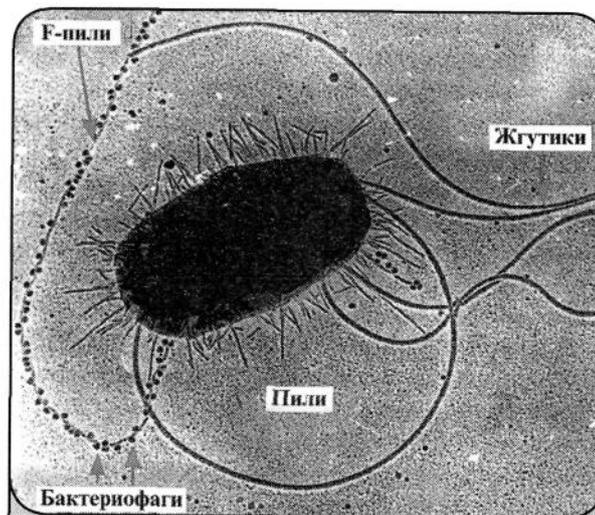


Рисунок 31 – Электронная фотография кишечной палочки, на F-пилях которой адсорбированы бактериофаги.

Адсорбция фага зависит от pH среды, температуры, наличия в среде катионов. Например, в дистиллированной воде адсорбция фага не происходит; наличие двухвалентных катионов кальция и магния стимулирует процесс адсорбции. На одной бактериальной клетке может адсорбироваться до 200-300 частиц фага.

Различают обратимую и необратимую фазы абсорбции. **Обратимая фаза** характеризуется тем, что частицы фага после адсорбции возможно отделить от

клетки путем энергичного встряхивания. Во время **необратимой фазы адсорбции** частицы фага не могут быть отделены от бактериальной клетки.

2. **Проникновение нуклеиновой кислоты фага (инъекция, пенетрация)** внутрь бактериальной клетки (рисунок 32).

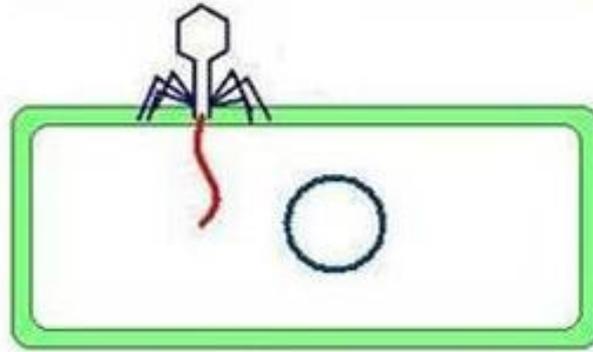


Рисунок 32 - Введение ДНК фага в бактериальную клетку.

После адсорбции происходит ферментативное расщепление клеточной стенки лизоцимом, находящимся в дистальной части фагового отростка. Одновременно в сократительном чехле бактериофага высвобождаются ионы кальция, которые активируют АТФазу. В результате этого происходит сокращение чехла и вталкивание стержня хвостового отростка через цитоплазматическую мембрану внутрь клетки. По каналу стержня ДНК фага впрыскивается в цитоплазму бактериальной клетки. Поскольку диаметр стержневого канала незначительно превышает диаметр молекулы ДНК (около 20 нм), то ДНК попадает в цитоплазму в линейной форме. При этом капсид и отросток остаются вне клетки (рисунок 33).

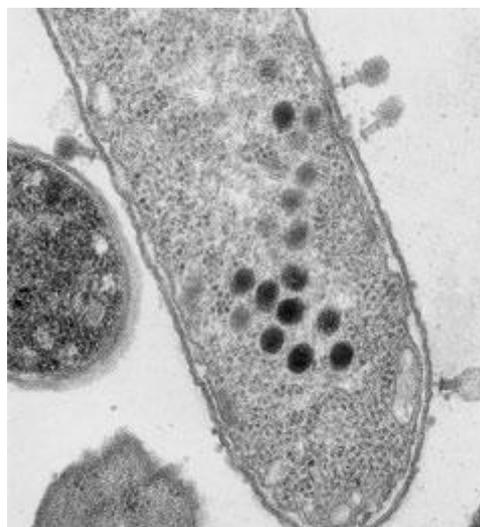


Рисунок 33 - Пустые фаговые капсиды и отростки на поверхности клетки.

Около 10% фаговой ДНК активно впрыскивается внутрь клетки во время сокращения чехла, а остальная часть ДНК втягивается в цитоплазму бактерии благодаря процессам транскрипции и трансляции.

При адсорбции фагов на половых ворсинках проникновение нуклеиновой кислоты происходит по каналу F-пили.

3. **Биосинтез компонентов фага** внутри бактериальной клетки (рисунок 34).

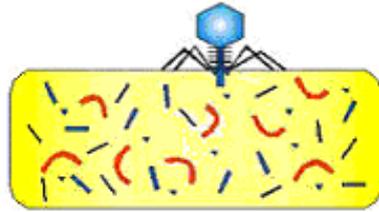


Рисунок 34 - Биосинтез компонентов фага.

Инъецированная нуклеиновая кислота вызывает перестройку метаболизма бактериальной клетки: прекращается синтез бактериальных нуклеиновых кислот и белков. В эту стадию ДНК бактериофага транскрибируется с помощью собственной транскриптазы и образуется иРНК, которая поступает на рибосомы клетки-хозяина, где синтезируются фаговые белки.

4. Сборка структурных компонентов фаговых частиц (рисунок 35).

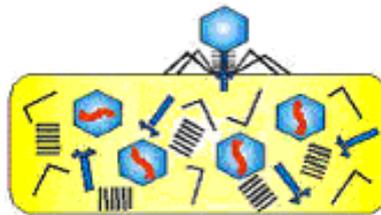


Рисунок 35 – Сборка структурных компонентов фаговых частиц.

Вновь синтезированные белки в цитоплазме клетки формируют капсиды, отростки и другие структуры дочерних фаговых частиц. После этого синтезированная нуклеиновая кислота фагов заполняет пустотелые капсиды головок.

5. Сборка (морфогенез) зрелых фаговых частиц (рисунок 36).

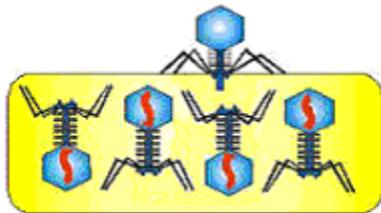


Рисунок 36 - Сборка зрелых фаговых частиц.

Заполненный нуклеиновой кислотой капсид взаимодействует с хвостовой частью и образует зрелую фаговую частицу. Соединение хвоста с головкой происходит только после полной их сборки. Точно так же ворсинки присоединяются к хвосту только после полного соединения отростка с головкой. Благодаря строгому генетическому контролю со стороны фага обеспечивается последовательность и согласованность всех процессов его внутриклеточного размножения. После сборки в каждой бактериальной клетке накапливается до 200 фаговых частиц (рисунок 37).

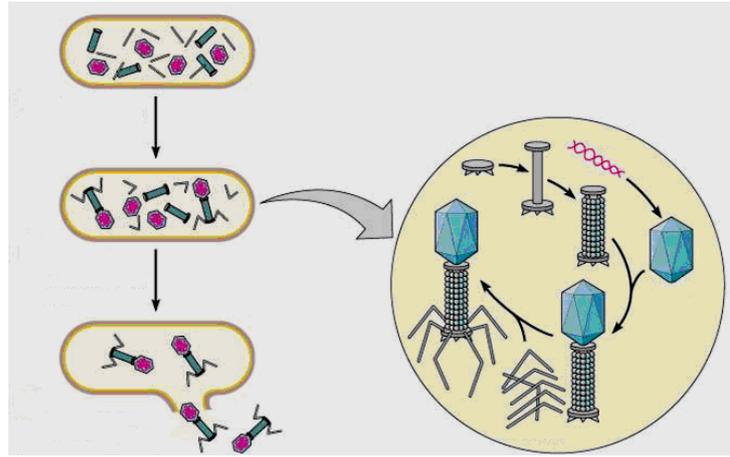


Рисунок 37 – Сборка фаговых частиц.

6. Выход фаговых частиц из клетки (рисунок 38).

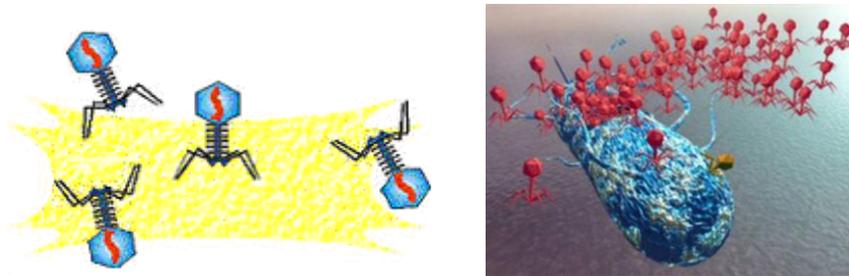


Рисунок 38 - Выход фаговых частиц из клетки.

Вновь образованные фаговые частицы выходят наружу в результате лизиса клеточной оболочки изнутри фаговым лизоцимом. Он синтезируется на последнем этапе размножения фага. Некоторые нитевидные фаги высвобождаются из клетки путем прохождения нуклеиновой кислоты через цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку бактерий. Во время такого прохождения фаги приобретают капсиды. Один цикл от момента адсорбции фага на поверхности клетки до выхода потомства из клетки продолжается 30-40 минут. Такие циклы продолжаются до тех пор, пока не будут лизированы все чувствительные к фагу клетки.

ДНК умеренных фагов после проникновения в цитоплазму встраивается в геном бактериальной клетки. ДНК фага, встроенная в хромосому бактерии, называется **профагом**, а культура таких бактерий – **лизогенной культурой** (рисунок 39).

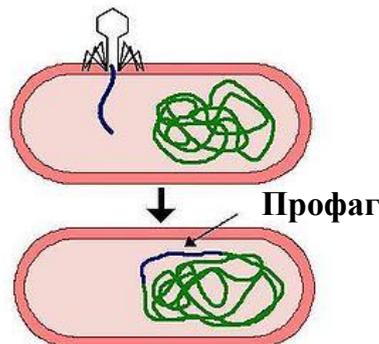


Рисунок 39 - Лизогенная культура бактерий.

Совместное сосуществование бактерии и умеренного бактериофага называется **лизогенией** (от греч. *lysis* - разложение, *genea* - происхождение). Различают монолизогенность и полилизогенность. Бактериальная культура, образующая после индукции один вид фага, называется **монолизогенной**, а бактериальная культура, образующая несколько видов фагов, называется **полилизогенной**.

ДНК умеренного фага встраивается в строго определенную область генома, синхронно с ним реплицируется и передается по наследству. При лизогении фагового потомства не образуется, так как в бактерии синтезируется специфический низкомолекулярный белок **репрессор**, подавляющий транскрипцию фаговых генов. Биосинтез репрессора детерминируется генами профага. Лизогенные бактерии приобретают **иммунитет (невосприимчивость)** к последующему проникновению и размножению в них родственного фага.

У некоторых лизогенных культур спонтанно или под действием физических факторов и химических веществ (УФ-лучи, ионизирующее излучение, перекисные соединения, митомицин С и др.) профаг может исключаться из хромосомы и становиться литическим фагом. Этот процесс называется **индукцией профага**. Он заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий.

Лизогенизация бактерий может приводить к изменению их морфологических, культуральных, ферментативных, антигенных и биологических свойств. При этом профаг может придавать бактерии новые ранее отсутствовавшие у нее свойства. Феномен изменения свойств микробов под влиянием профага называется **фаговой конверсией** (от лат. *conversio* - превращение). Например, профаг придает дифтерийной палочке способность продуцировать экзотоксин.

Таким образом, различают следующие типы взаимодействия фагов с бактериями:

- **продуктивный тип взаимодействия**, при котором в клетке образуется фаговое потомство, обуславливающее лизис бактерий;
- **интегративный тип взаимодействия**, при котором нуклеиновая кислота фага встраивается в геном бактерии и сосуществует с ним в течение длительного времени.

Схема продуктивного и интегративного типов взаимодействия бактериофага и клетки представлена на рисунке 40.

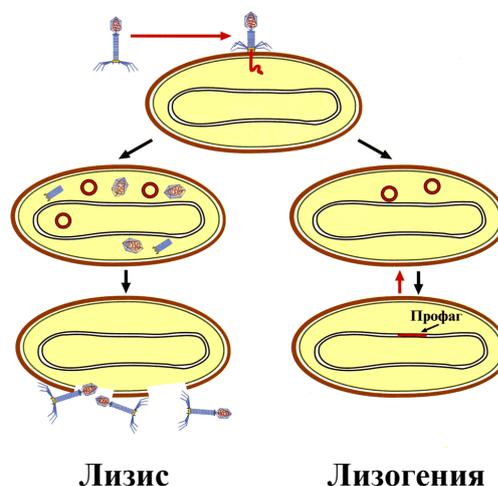


Рисунок 40 - Схема продуктивного и интегративного путей развития фага.

Некоторые умеренные фаги могут быть **дефектными**, то есть неспособными образовывать зрелые фаговые частицы ни в естественных условиях, ни при индукции профага.

Участие бактериофагов в генетическом обмене у бактерий

Умеренные фаги, встраиваясь в геном микробной клетки, способны захватывать некоторые бактериальные гены и передавать их новому хозяину. Передача генов от одной бактерии (от бактерии – донора) другой бактерии (бактерии – реципиенту) с помощью умеренного фага называется **трансдукцией**. Различают три типа трансдукции: неспецифическую (общую, генерализованную), специфическую (локализованную) и abortивную. Впервые **неспецифическую трансдукцию** описали Д. Ледерберг (рисунок 41) и Э. Тейтем (рисунок 42).



Рисунок 41 - Джошуа Ледерберг (1925-2008 гг.).



Рисунок 42 - Эдвард Тейтем (1909-1975 гг.).

Механизм неспецифической трансдукции заключается в том, что в процессе внутриклеточного размножения фага в его геном случайно включается какой-либо фрагмент бактериальной ДНК. В результате этого возникают фаговые частицы, у которых наряду с собственной фаговой ДНК содержится фрагмент ДНК бактерии. Эти фаги сохраняют инфекционную способность и при адсорбции на бактериальной клетке вводят в нее ДНК клетки донора. В случае встраивания привнесенного

фрагмента ДНК в гомологичную область генома клетки-реципиента этот признак будет наследственно закрепляться (рисунок 43).

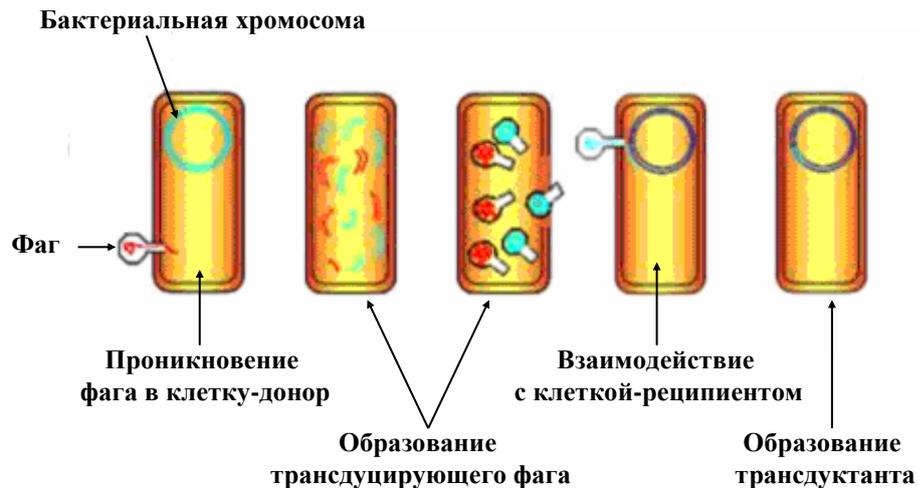


Рисунок 43 – Схема трандукции.

Введенная ДНК клетки-донора наделяет клетку-реципиент (трансдуктант) новыми признаками.

При **специфической трандукции** фаги переносят только определенные гены клетки-донора. Это связано с тем, что при специфической трандукции образование трансдуцирующего фага происходит в результате соединения его ДНК со строго определенными генами донора. При освобождении такой фаг захватывает только рядом расположенную строго определенную область хромосомы донора и передает ее реципиенту. В последующем наблюдается интеграция умеренного фага в определенный участок генома реципиента. При этом происходит не только лизогенизация, но и появление у реципиента нового признака (**лизогенная конверсия**). Например, умеренный фаг способен вызывать лизогенную конверсию дифтерийной палочки, превращая нетоксигенную культуру в токсигенную.

В некоторых случаях переносимый фрагмент ДНК не встраивается в геном реципиента, а сохраняется автономно в цитоплазме клетки. Это явление называется **абортивной трандукцией**. При делении бактерий фаговая ДНК передается только одной из двух дочерних клеток.

При трандукции возможен перенос генов, которые детерминируют питательные потребности бактерий, устойчивость клеток к лекарственным препаратам, ферментативную активность, подвижность, факторы патогенности и другие свойства.

Практическое применение бактериофагов

Способность бактериофагов лизировать клетки определенных видов бактерий позволяет использовать их для диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Бактериофаги применяют для установления источника инфекции, путей передачи возбудителя, для выявления определенных видов бактерий во внешней среде, при проведении генно-инженерных исследований.

Фагодиагностика. Бактериофаги используются при диагностике сибирской язвы, брюшного тифа, дизентерии и других инфекционных заболеваний. Высокая чувствительность бактерий к специфическому фагу позволяет отличить близкородственные виды, (возбудителя чумы от возбудителя псевдотуберкулеза, холерный вибрион от холероподобного). С помощью бактериофагов можно определить типы (варианты) внутри одного вида бактерий (измененные штаммы бруцелл и сибиреязвенного микроба).

При проведении фагодиагностики культивирование бактерий осуществляют на плотной или в жидкой питательных средах. Размножение фагов в бактериальных культурах на плотных питательных средах сопровождается лизисом бактерий и образованием зон просветления (стерильных пятен, бляшек или негативных колоний). Разные фаги формируют негативные колонии определенных размеров и формы. Размножение бактериофагов в жидких культурах сопровождается просветлением среды, бывшей перед заражением фагом мутной.

В лабораториях применяют несколько методов выявления специфического действия фагов:

1. **Метод Отто** (метод стекающей капли) используется для идентификации неизвестных бактерий с помощью известных диагностических фагов (фагоидентификация, фаготипирование). Для выполнения этого метода на чашку с МПА наносится капля суточной бульонной культуры и шпателем круговыми движениями распределяется по поверхности агара. Затем наносится капля суспензии известного бактериофага и наклоном чашки дают капле стечь по поверхности агара. Посевы инкубируют в термостате в течение суток, после чего учитывают результаты. При соответствии фага и бактерий в месте нанесения диагностического фага наблюдается отсутствие роста культуры (рисунок 44).

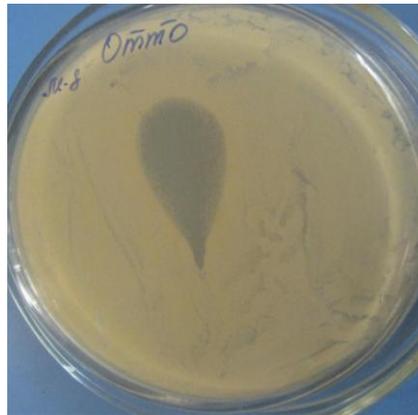


Рисунок 44 - Фагоидентификация бактерий по методу Отто.

2. **Метод Фишера** также используется для идентификации неизвестных бактерий с помощью известных фагов. Для выполнения этого метода каплю испытуемой суточной бульонной культуры наносят на МПА и шпателем распределяют по поверхности агара. Затем чашку условно делят на квадраты. В каждый квадрат наносят по капле суспензий разных фагов. После суточного культивирования в термостате учитывают результаты. При соответствии бактерий и фага обнаруживаются зоны лизиса (рисунок 45).

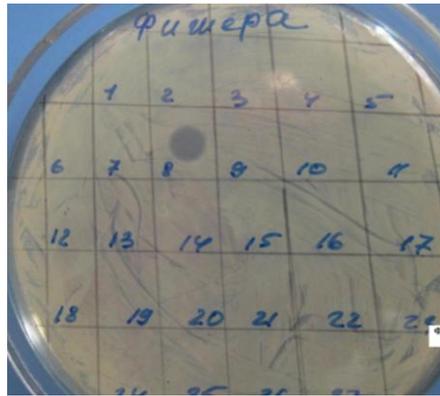


Рисунок 45 – Фаготипирование бактерий по методу Фишера.

3. **Метод Фюрта** также используется для типирования неизвестных бактерий с помощью известных фагов. При выполнении этого метода в расплавленный и остуженный до 45-50⁰С МПА добавляют суспензию известного бактериофага и тщательно перемешивают. Полученную смесь разливают в чашки Петри. Каждую чашку условно делят на несколько секторов, в которые высевают штрихом исследуемые культуры. Чашки инкубируют в термостате, после чего учитывают результаты. Рост культуры будет отсутствовать в том секторе, в котором бактерии и фаг соответствуют друг другу (рисунок 46).

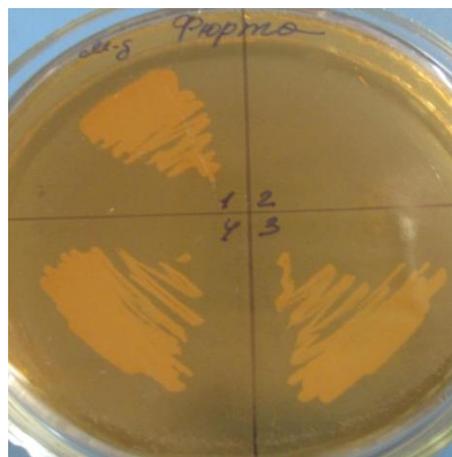


Рисунок 46 – Фагоидентификация бактерий по методу Фюрта.

Фаготипирование используют также для выявления источника и путей распространения инфекции (**эпидемиологическое маркирование**). При этом выделение бактерий одного фаговара от разных больных указывает на общий источник их заражения.

Санитарно-показательное значение бактериофагов. По содержанию некоторых бактериофагов во внешней среде можно судить о присутствии в них соответствующих бактерий. Например, наличие фагов кишечных бактерий свидетельствует о фекальном загрязнении объектов внешней среды. Поэтому бактериофаги кишечных бактерий используются в качестве санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ). Во внешней среде бактериофаги выжи-

вают в течение 8-9 месяцев, поэтому их обнаруживают как при свежем фекальном загрязнении, так и после отмирания бактерий кишечной группы. При этом одновременное обнаружение фага и кишечной палочки указывает на свежее фекальное загрязнение, а обнаружение одного фага - на давнее фекальное загрязнение.

При исследовании питьевой воды определяют присутствие и количество колифагов – фагов, лизирующих кишечные палочки рода *Escherichia*. Колифаги являются индикаторами загрязнения воды патогенными энтеровирусами и очистки питьевой воды от энтеровирусов. Для определения количества колифагов определенное количество питьевой воды смешивают с расплавленным питательным агаром и культурой кишечной палочки. Смесь разливают в чашки Петри и инкубируют в термостате. Через 72 часа учитывают зоны лизиса, образовавшиеся на сплошном газоне *E. coli*. Результаты выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 100 см³ воды.

Индикация бактерий с помощью реакции нарастания титра фага. Присутствие каких-либо микроорганизмов в исследуемой пробе (вода, пищевые продукты) можно установить с помощью бактериофагов. Этот прием основан на специфичности действия бактериофагов: бактериофаг *E. coli* лизирует только кишечную палочку, холерный бактериофаг вызывает лизис только холерного вибриона и т. д. Для установления присутствия определенных бактерий в исследуемую пробу добавляют известное количество специфического фага. При наличии гомологичных бактерий фаг размножается, в результате чего нарастает его титр (количество). Следовательно, реакция нарастания титра фага основана на увеличении количества фага при его контакте с возбудителем непосредственно в исследуемом материале.

Реакцию нарастания титра фага используют при диагностике дизентерии и брюшного тифа, для выявления бактерионосительства при брюшном тифе, для обнаружения брюшнотифозных и дизентерийных бактерий в воде и молоке, для обнаружения дизентерийных микробов на предметах внешней среды, для выявления чумного микроба и холерного вибриона в воде.

Фагопрофилактика – это предупреждение бактериальных инфекций путем применения бактериофагов. В профилактических целях бактериофаг используется в тех случаях, когда возбудитель известен. Фагопрофилактика проводится в комплексе с другими методами. В настоящее время по эпидемическим показаниям фагопрофилактику проводят только при дизентерии и брюшном тифе. Фагопрофилактика имеет ряд преимуществ: возможность использования в больших количествах, быстрота действия, легкость введения, полная безвредность.

Фаготерапия – это способ лечения некоторых бактериальных инфекций (брюшного тифа, дизентерии, холеры и др.) специфическими бактериофагами. При использовании бактериофагов в лечебных целях предварительно определяют чувствительность возбудителей к данному бактериофагу. В настоящее время применение фагов с лечебной целью проводится редко. Это связано с широким применением антибиотиков и возрастанием количества фагоустойчивых бактерий.

При лечении часто используют смесь из разных фагов: против протей, кишечной палочки и энтерококка; против синегнойной палочки и других гноеродных микробов. Поливалентные препараты могут включать бактериофаги

против различных вариантов бактерий одного вида (например, против пяти серологических групп сальмонелл).

Для профилактического и терапевтического применения бактериофаги выпускаются в виде таблеток, жидких форм и др. (рисунок 47).



Рисунок 47 – Готовые лекарственные формы препаратов бактериофагов.

В последние годы фаги находят широкое применение в косметологии в виде гелей (рисунок 48).



Рисунок 48 – Гели с бактериофагами.

Генная инженерия. Трансдуцирующие фаги широко используются в генной инженерии. В частности, феномен неспецифической трансдукции применяется для картирования генома бактерий.

Выделение и производство бактериофагов

Выделение бактериофагов. Бактериофаги выделяют из субстратов, контаминированных бактериями, или из лизогенных бактерий, содержащих профаг. В качестве субстрата используют отделяемое гнойных ран, испражнения, сточные воды, старые бактериальные культуры. Для индукции профага на бактериальную культуру воздействуют химическими веществами или физическими факторами

(митомицином С, УФЛ, ионизирующим излучением и др.). Индуцированный профаг обуславливает синтез фаговых частиц и вызывает лизис бактериальных клеток. После этого суспензию субстратов (или лизат бактериальной культуры) фильтруют через мелкопористые фильтры или центрифугируют. Полученный фильтрат (центрифугат) исследуют на способность лизировать чувствительные бактерии. С этой целью фильтрат наносят на плотную или вносят в жидкую питательную среду, засеянную бактериями, в которых способен размножиться фаг. О присутствии фага судят по лизису бактериальной культуры. На плотных питательных средах фаги обнаруживаются либо с помощью спот-теста (анг. *spot* – пятно), либо методом агаровых слоев по А. Грациа (рисунок 49).

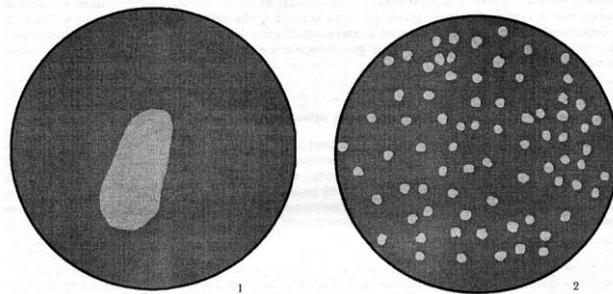


Рисунок 49 - Обнаружение бактериофагов в исследуемом материале:
1 – спот-тест; 2 – титрование по Грациа.

При проведении **спот-теста** (капельного теста) на поверхность агара в чашке Петри высевают бактериальную культуру, а затем на нее наносят каплю суспензии бактериофага. В месте нанесения фага бактериальная культура лизируется и образуется стерильное пятно. Иногда каплю суспензии бактериофага наносят ближе к краю чашки, а затем чашку наклоняют, позволяя фаговой суспензии стечь по поверхности агара. В этом случае роста бактериальной культуры не будет в виде “**фаговой дорожки**”.

Метод агаровых слоев по Грациа (A. Gratia, 1936) используется как для выделения фага, так и для определения его титра. При выполнении этого метода в чашку Петри наливают слой МПА. После застывания на этот слой наливают 2 мл расплавленного и охлажденного до 45⁰С полужидкого (0,7%) агара, в который предварительно добавляют каплю бактериальной суспензии и определенный объем суспензии фага. После застывания верхнего слоя агара чашку инкубируют в термостате при температуре 37⁰С в течение 18-24 часов (рисунок 50).

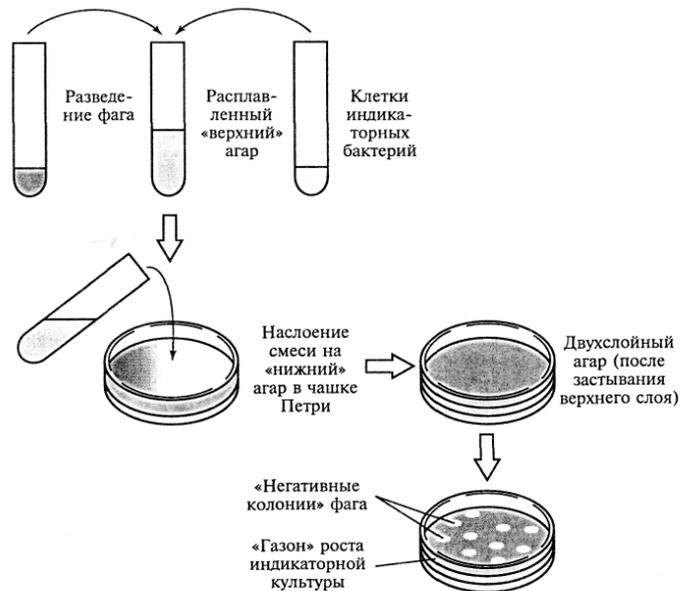


Рисунок 50 – Определение количества фаговых частиц методом агаровых слоев по Грациа.

Бактерии размножаются внутри верхнего слоя агара, образуя сплошной непрозрачный фон, на котором хорошо видны негативные колонии фага в виде стерильных пятен. Считается, что каждая негативная колония образуется за счет размножения одной фаговой частицы. Метод Грациа позволяет рассчитывать концентрацию (титр) фага в исходной суспензии (рисунок 51).



Рисунок 51 – Негативные колонии бактериофага в агаре.

Количества фаговых частиц выражают в **бляшкообразующих единицах** (БОЕ/мл). Титр фага в исходной суспензии рассчитывают по формуле:

$$N = y/vx,$$

где: N - титр фага;

y - количество негативных колоний;

v - объем использованного фильтрата фага;

x - разведение суспензии фага.

Например, если 0,1 мл фильтрата фага в разведении 10^{-5} образует 250 негативных колоний, то титр равен $250:0,1 \times 10^{-5} = 2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл.

При использовании жидкой питательной среды проводят **титрование по методу Аппельмана**. В этом случае готовят серию десятикратных разведений фильтрата бактериофага и определенное количество разведений вносят в свежезасеянный бульон. Максимальное разведение фильтрата, вызывающее полный лизис бульонной культуры чувствительных бактерий, принимается за титр бактериофага.

Получение фаговой суспензии с высоким титром производится путем инфицирования концентрированной жидкой бактериальной культуры или путем высева смеси фага и бактерий на питательный агар. В последующем фаги освобождают от остатков питательной среды и бактериальных клеток центрифугированием или фильтрованием через бумажные фильтры. Получаемая при этом суспензия фага может содержать до 10^{11} - 10^{12} фаговых частиц в 1 мл.

Большие количества фага получают путем добавления в аппараты с бульонными культурами бактерий суспензии специального производственного фага, выдерживают при температуре 37°C одни сутки, затем фильтруют. Полученный фильтрат проверяют на чистоту, стерильность, безвредность и активность.

Вопросы для контроля усвоения материала

1. Открытие явления бактериофагии и бактериофагов.
2. Классификация бактериофагов на семейства.
3. Распределение фагов на морфологические типы.
4. Распределение фагов на группы по спектру литического действия.
5. Умеренные и вирулентные бактериофаги.
6. Строение бактериофагов.
7. Резистентность фагов.
8. Продуктивный тип взаимодействия фага с клеткой (жизненный цикл вирулентных фагов).
9. Интегративный тип взаимодействия фага с клеткой (жизненный цикл умеренных фагов).
10. Неспецифическая трансдукция.
11. Специфическая трансдукция
12. Abortивная трансдукция.
13. Использование фагов в диагностике инфекционных заболеваний.
14. Применение фагов для профилактики и лечения инфекций.
15. Фаги как объект генной инженерии.
16. Схема выделения и приготовления препаратов фагов.

Тренировочные тесты

1. Явление бактериофагии впервые описал:
- А. Левенгук

- Р. Кох
- Н.Ф. Гамалея*
- И.И. Мечников
- Ф. д' Эрелль

2. Стекловидное перерождение стафилококков описал:

- Ф. Туорт*
- Р. Кох
- Л. Пастер
- И.И. Мечников
- Ф. д' Эрелль

3. Понятия “бактериофагия” и “бактериофаг” предложены:

- Ф. Туортом
- Р. Кохом
- Л. Пастером
- И.И. Мечниковым
- Ф. д' Эреллем*

4. Первую электронную фотографию бактериофага сделал:

- Ф. Туорт
- Н.Ф. Гамалея
- Л. Пастер
- Г. Руска*
- Ф. д' Эрелль

5. Бактериофаги можно обнаружить в:

- сточных водах*
- консервированных продуктах
- кишечнике человека*
- стерильных материалах
- почве *

6. Бактериофаги:

- проходят через бактериальные фильтры*
- растут на питательных средах
- размножаются внутри клеток*
- содержат оформленное ядро
- имеют аппарат Гольджи

7. Типичные бактериофаги содержат:

- головку*
- капсулу
- эндоспоры
- базальную пластинку*
- отростки*

8. Большинство фагов имеют форму:

- сперматозоидную*
- кубовидную
- овоидную
- цилиндрическую
- бобовидную

9. Геном большинства фагов представлен:

- РНК
- ДНК*
- ДНК-азой
- протеазой
- лизоцимом

10. У ДНК-содержащих фагов молекула ДНК имеет форму:

- линейной нити
- кольца с разрывом
- фрагментированной нити
- отдельных сегментов
- кольца*

11. Фаги состоят из:

- нуклеиновой кислоты*
- липополисахарида
- пептидогликана
- липидов*
- белка*

12. Проникновению генома фага в клетку способствует наличие на базальной пластинке:

- цитокина
- фибринолизина
- гиалуронидазы
- лизоцима*
- перфорины

13. Последовательность стадий взаимодействия вирулентного фага с бактериальной клеткой:

- выход фаговых частиц из клетки, биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты и белков капсида, адсорбция фага на клеточной стенке, проникновение в клетку, сборка фаговых частиц

- биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты и белков капсида, выход фаговых частиц из клетки, адсорбция фага на клеточной стенке, сборка фаговых частиц, проникновение в клетку

- адсорбция фага на клеточной стенке, проникновение в клетку, сборка фаговых частиц, выход фаговых частиц из клетки, биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты и белков капсида

- адсорбция фага на клеточной стенке, проникновение в бактерию, биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты и белков капсида, сборка фаговых частиц, выход фаговых частиц из бактериальной клетки*

- выход фаговых частиц из клетки, сборка фаговых частиц, биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты и белков капсида, проникновение в клетку, адсорбция фага на клеточной стенке

14. По характеру взаимодействия с бактериальными клетками выделяют:

- нейтральные фаги
- умеренные фаги*
- абортивные фаги
- вирулентные фаги*
- условно-патогенные фаги

15. Типы взаимодействия фага с бактериальной клеткой:

- умеренный
- продуктивный*
- абортивный
- интегративный*
- нейтральный

16. Профаг представляет собой:

- ассоциированный с бактериальной хромосомой геном фага*
- отросток фага
- капсид фага
- головку фага
- базальную пластинку фага

17. Неспецифическую трансдукцию впервые описали:

- Ф. Туорт
- Г. Руска
- Д. Ледерберг и Э. Татум*
- Н.Ф. Гамалея
- Ф. д'Эрелль

18. Бактериальные клетки, содержащие профаг, называются:

- лизогенными*
- ауксотрофными
- прототрофными
- термофильными
- фототрофными

19. Лизогенизация обуславливает:

- фаговую конверсию*
- трансформацию
- трансдукцию
- конъюгацию
- депротеинизацию

20. В результате фаговой конверсии наблюдается:

- переход неvirulentных бактерий в virulentные*
- изменение окраски по Граму
- приобретение способности к продукции экзотоксина*
- превращение аэробов в анаэробы
- превращение анаэробов в микроаэрофилы

21. Лизогенная конверсия - это:

- один из этапов размножения бактериофагов
- изменчивость фагов под действием мутагена
- изменение свойств бактерий при включении в их геном профага*
- результат конъюгации
- результат трансформации

22. Способ размножения бактериофагов:

- половой
- поперечное деление
- внутриклеточная репродукция*
- с помощью спор
- почкование

23. Количество фаговых частиц определяют титрованием по методу:

- Р. Коха
- А. Грациа*
- Н.Ф. Гамалея
- Ф. д'Эрелля
- Ф. Туорта

24. Бактериофаги применяются для:

- терапии вирусных инфекций
- фаготипирования бактерий*
- профилактики вирусных инфекций
- лечения бактериальных инфекций*
- генно-инженерных исследований*

25. Активность фага определяют путем определения:

- размеров
- массы
- титра*
- формы

- подвижности

26. При фагодиагностике применяют методы:

- Грациа
- Отто*
- Фишера*
- Аппельмана
- Фюрта*

Примечание: знаком * отмечены правильные ответы.

Литература

1. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.: ил.
2. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: М: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2002. – 736 с.
3. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – 2-е изд., стер. – М.: Издательский центр “Академия”, 2006. – 464 с.
4. Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбаков А.М. Микробиология: Учебник. – 2-е изд., перераб. И доп. – М.: Медицина, 1998. – 336 с.: ил.
5. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для мед. вузов. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: МпецЛит, 2002. – 591 с.: ил.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2006. – 704 с.; ил., табл.
7. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 768 с.
8. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред В.И. Покровского. – 3-е изд., стереотип. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 768 с.: ил.
9. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / Колл. Авторы // Под редакцией Лабинской А.С., Волиной Е.Г. – М.: Издательство БИНОМ, 2008. – 1080 с.: ил.
10. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Под ред. Л.Б. Борисова. – 2-е изд., перераб. И доп. – М.: Медицина, 1984. – 256 с.
11. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии и лабораторной диагностике инфекционных болезней / Под ред. Ю.С. Кривошеина. – К.: Виша школа, Головное издательство, 1986. – 376 с.
12. Информационные ресурсы (WEB-ресурсы) по медицинской микробиологии и иммунологии (Интернет – сайты):
 - <http://www.microbiology.ru>
 - <http://ru.wikipedia.org>

- <http://www.virology.net>
- <http://www.molbiol.ru>