

Занятие 5

Понятие об инфекции. Патогенез инфекций, вызванных микроорганизмами (бактерии, грибы, простейшие, вирусы), и методы диагностики (микроскопический, культуральный, биологический, серологический, кожно-аллергический и молекулярно-генетический). Современные методы идентификации микроорганизмов

Инфекция , или инфекционный процесс

- ▶ *Инфекция, или инфекционный процесс* это совокупность всех патологических процессов, возникающих в макроорганизме в результате попадания и размножения патогенного микроорганизма .
- ▶ Сходный процесс вызванный простейшими, гельминтами и насекомыми носит название *инвазия* (от лат. *Invazio* - нашествие, вторжение)
- ▶ С клинической и патогенетической точки зрения, взаимодействие макро- и микроорганизма при инфекционном процессе, проявляет себя как *инфекционная болезнь*.

Условия возникновения инфекционного процесса

- ▶ Наличие патогенного микроорганизма
- ▶ Наличие чувствительного макроорганизма
- ▶ Условия окружающей среды

Роль микроорганизма в инфекционном процессе

- ▶ **Сапрофитные микроорганизмы** (от греч., *sapros* - гнилой, *phyton* - растение) - комменсалы, живущие в организме человека, животных и в окружающей среде, не вызывают заболевания.
- ▶ **Патогенные микроорганизмы** (от лат., *pathos* - страдание, *genos* - рождение) попадая в чувствительный макроорганизм вызывают инфекционный процесс.
- ▶ **Условно-патогенные (оппортунисты)** только при определенных условиях (состояние реактивности макроорганизма), оказывают болезнетворное действие.

Понятие о патогенности и вирулентности

- ▶ Способность микроорганизма вызвать патологический процесс или болезнь называется патогенностью
- ▶ Патогенность это генетическое свойство каждого вида микроорганизма и носит специфический характер , т.е. каждый патоген вызывает определенное заболевание
- ▶ Патогенные свойства могут отличаться даже среди микроорганизмов одного вида. Степень патогенности называется **вирулентностью** (от лат. *virulentus* - ядовитый)
- ▶ В вирусологии вместо термина «вирулентность» применяют «**инфекционность**»

Изменение вирулентности

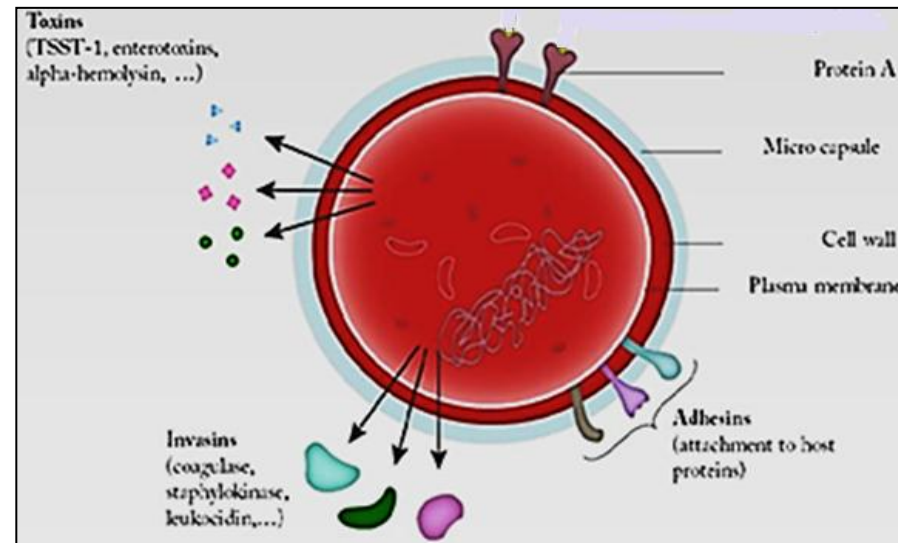
- ▶ Все штаммы определенного вида микроорганизма по вирулентности можно подразделить на **высоко-, слабо- и авирулентные**.
- ▶ Изменение вирулентности- ослабление или усиление, могут носить фенотипический или генотипический характер. Устранив действующий фактор, приводящий к фенотипическим изменениям можно восстановить вирулентность .
- ▶ Если изменение вирулентности носит генотипический характер, то оно будет передаваться из поколения в поколение.

Факторы, действующие на вирулентность

- ▶ Неблагоприятные условия, длительное культивирование в искусственных питательных средах, пассаж малочувствительным животным, воздействие различных физических и химических факторов могут способствовать снижению вирулентности микроорганизмов. Длительное воздействие этих факторов может привести к **стабильному снижению вирулентности - аттенуации**. Этот принцип лежит с основе получения вакцин.
- ▶ Можно **усилить вирулентность** микроорганизмов пассажем в организм чувствительных животных.
- ▶ Предположительно, что в данном случае в популяции микроорганизмов происходит селекция вирулентных особей.

Факторы патогенности микроорганизмов

- ▶ Патогенность микроорганизмов обеспечивается **факторами патогенности**. Наличие этих факторов отличает патогенные микроорганизмы от сапрофитов.
- ▶ Факторами патогенности являются **морфологические структуры**, **ферменты** и **токсины** микроорганизмов.
- ▶ Указанные факторы обеспечивают внедрение микроорганизма в организм, адгезию его на клетки и ткани, а также предохранение от защитных факторов организма

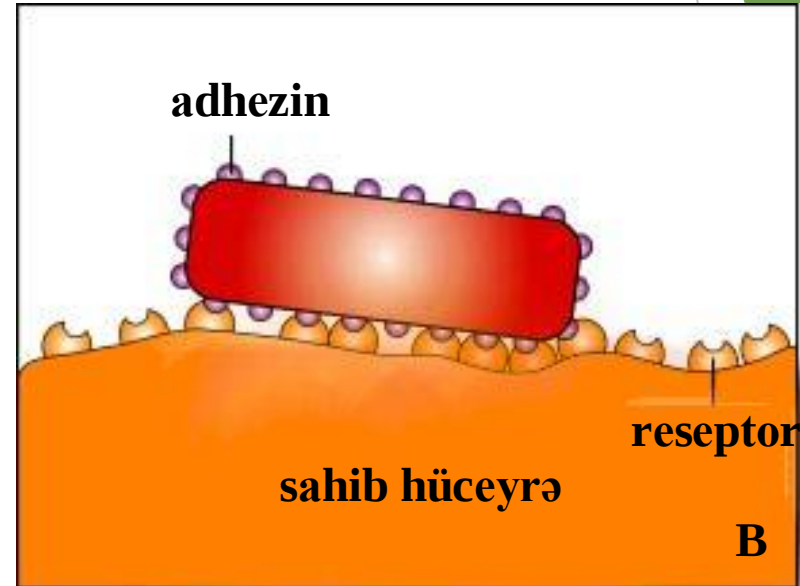
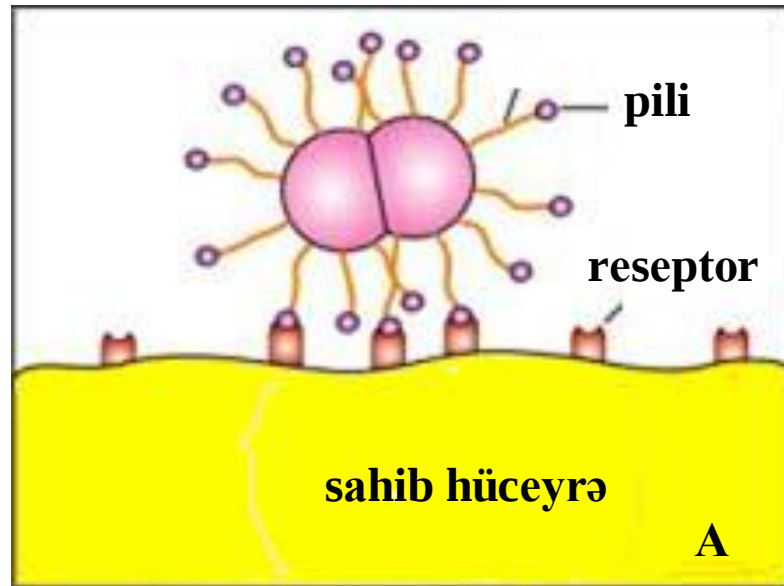


Факторы патогенности микроорганизмов

- ❖ **Адгезия** – специфическое соединение микроба с чувствительными клетками макроорганизма.
- ❖ **Колонизация** – размножение микроба на поверхности чувствительной клетки макроорганизма.
- ❖ **Пенетрация** – внедрение некоторых возбудителей внутрь клеток (эпителиальных, лейкоцитарных, лимфоцитарных и пр.).
- ❖ **Инвазия** – распространение через слизистые и соединительнотканые барьеры в ткани (нейраминидаза и гиалуронидаза).

Адгезия

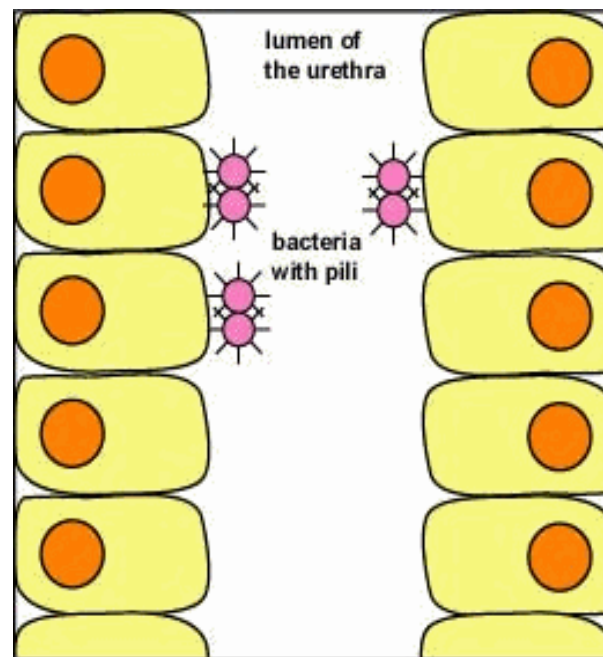
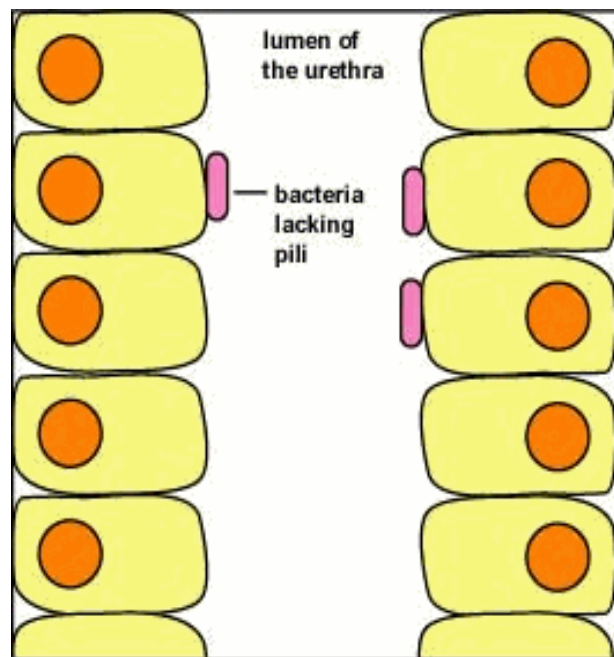
- ▶ Адгезия (от лат. *adhaesio* - притяжение, прилипание) - способность микроорганизмов к прикреплению на соответствующих клетках и тканях хозяина.
- ▶ С одной стороны этот процесс обеспечивается за счет пилей и других поверхностных структур микроорганизмов (адгезины или лиганды).
- ▶ С другой стороны - наличием на поверхности клеток макроорганизма специальных структур - **рецепторов**.
- ▶ Таким образом, адгезия микроорганизмов на клетках и тканях опосредуется **лиганд-рецепторным механизмом взаимодействия**.



Роль адгезии в патогенности: лиганд-рецепторный механизм взаимодействия.

А - адгезия посредством пилей ; В - адгезия посредством адгезинов

Адгезия как фактор патогенности



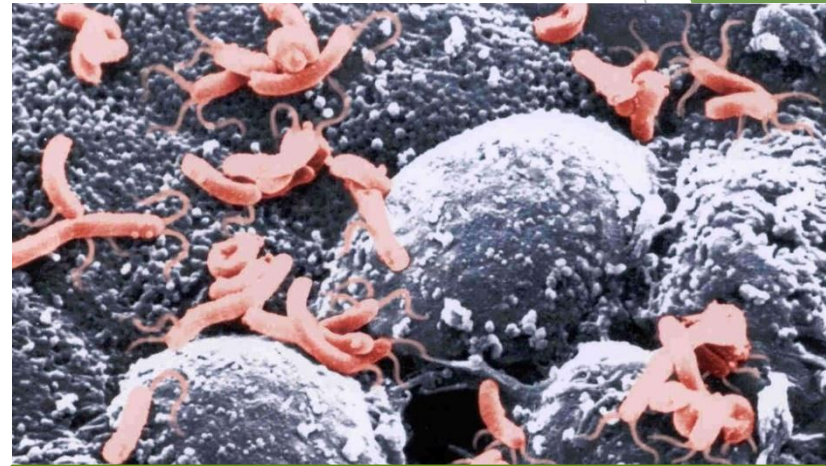
Колонизация

- ▶ После адгезии начинается процесс колонизации микроорганизмов - заселение и размножение.
- ▶ Первоначально микроорганизмы колонизируют поверхность кожи и слизистых. Они могут находиться как на поверхности так и внутри клеток .
- ▶ Например, возбудитель холеры размножается на поверхности эпителия тонкого кишечника, а возбудитель дизентерии - внутри клеток эпителия толстого кишечника.

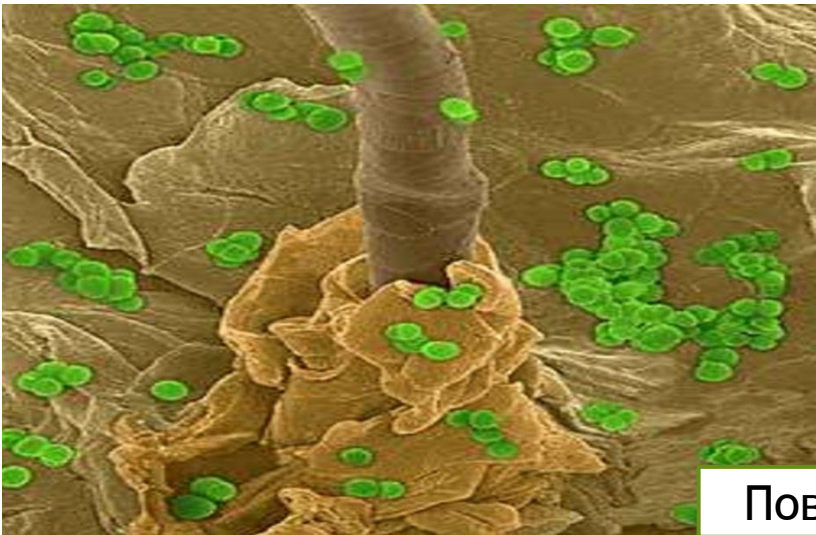
Колонизация



Слизистая полости рта



Слизистая желудка



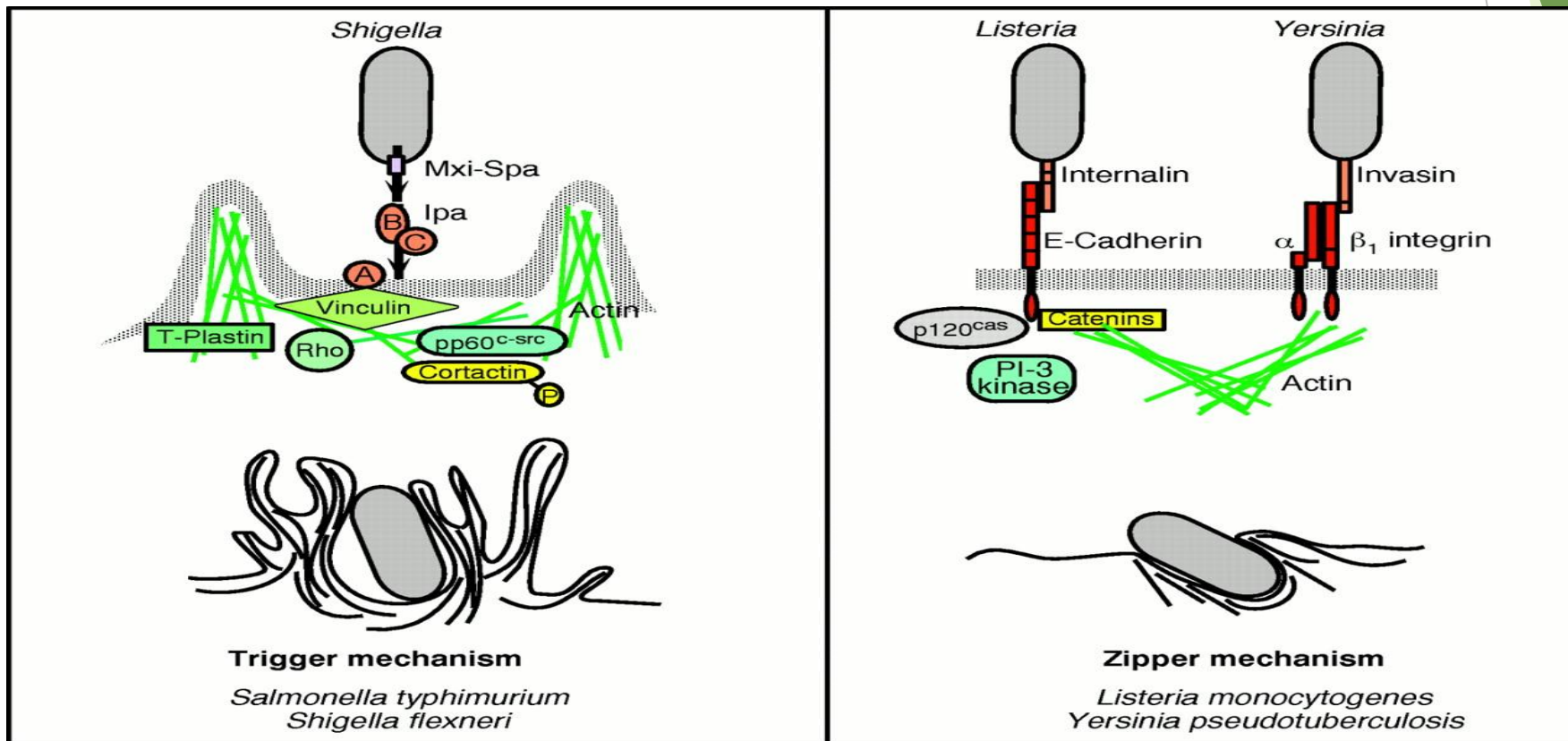
Поверхность кожи



Пенетрация и инвазивность

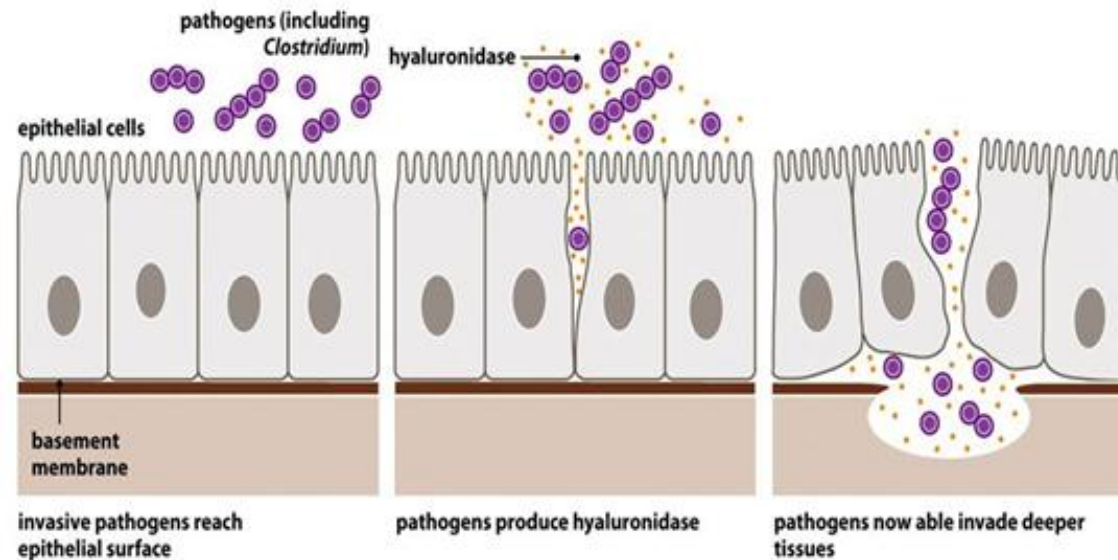
- ▶ Внедрение - **пенетрация**, микроорганизмов во внутрь клетки-хозяина обусловлена инвазивностью.
- ▶ **Инвазивность** - это способность микроорганизмов проникать в клетки ткани .
- ▶ Колонизация микроорганизмов не всегда ограничивается поверхностью кожи и слизистых. Патогенность некоторых микроорганизмов (шигеллы, иерсинии и др.) обусловлена их пенетрацией в эпителиальные клетки.
- ▶ Пенетрация обеспечивается наличием специфических факторов: среди них наиболее хорошо изучены **инвазины** - белки наружной мембраны. Взаимодействие инвазинов с **интегринами** - специфическими рецепторами на поверхности клетки-хозяина, обеспечивает эндоцитоз - «проглатывание» бактерий.

Особенности инвазии у различных микроорганизмов



Ферменты агрессии

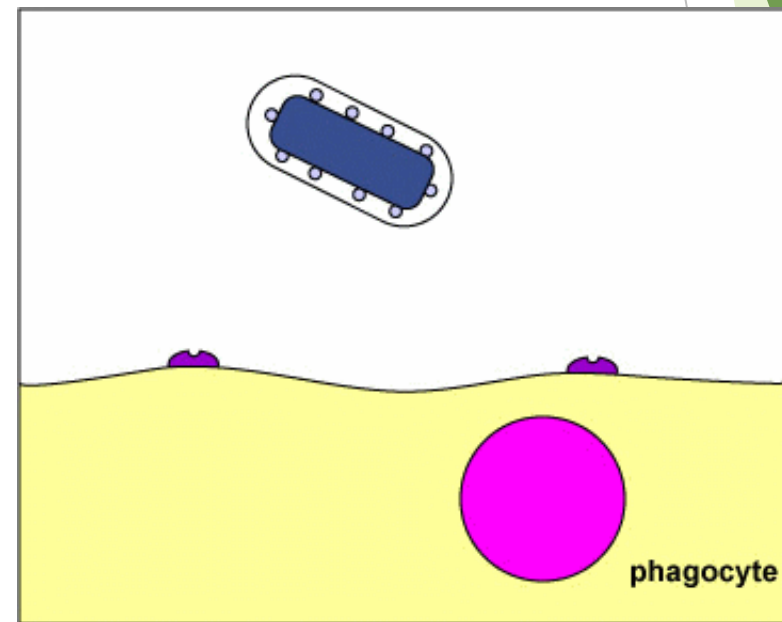
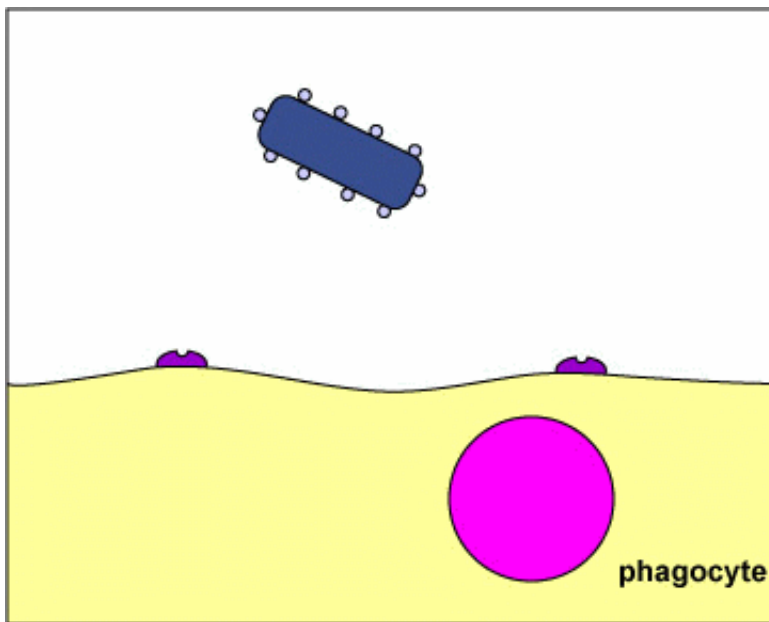
- ▶ Инвазивность микроорганизмов тесно связана со способностью синтезировать некоторые ферменты - **ферменты агрессии**. Механизм действия их заключается в разрушении мембран и межклеточного вещества, увеличении проницаемости клеточной стенки, что способствует распространению микроорганизмов в тканях.
- ▶ *Гиалуронидаза*
- ▶ *Лецитиназа* (фосфолипаза)
- ▶ *Нейраминидаза*
- ▶ *Коллагеназа*
- ▶ *Плазмокоагулаза*
- ▶ *Фибринолизин*
- ▶ *Цитолизины (гемолизины), лейкоцидин, IgA1-протеаза*



Факторы, препятствующие фагоцитозу

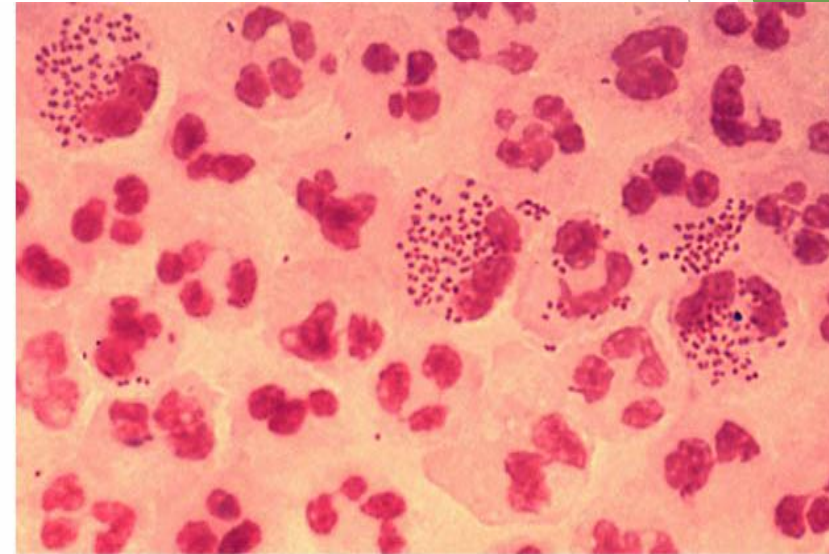
- ▶ Многие микроорганизмы, в частности бактерии, обладают такими факторами как микрокапсула, капсула, слизистая оболочка препятствующими фагоцитоз.
- ▶ Некоторые микробы синтезируют вещества подавляющие хемотаксис или расщепляющие хемоаттрактанты.
- ▶ Микроорганизмы также обладают факторами, защищающими их от внутриклеточного киллинга при фагоцитозе:
 - ❑ вещества препятствующие слиянию фагосомы с лизосомой
 - ❑ защита от окислительных факторов , образующихся внутри фагоцитов
 - ❑ резистентность против лизосомальных ферментов фагоцитов
 - ❑ вещества способствующие лизису фагосомы (например, листериолизин)
 - ❑ некоторые микроорганизмы, например трипаносомы, покидая фаголизисому переходят в цитоплазму клетки, защищаясь фагоцитоза .

Капсула защищает от фагоцитоза



Незавершенный фагоцитоз

- ▶ Перечисленные факторы обеспечивают микроорганизмам способность выживать внутри фагоцита.
- ▶ Эта способность позволяет не только выживать внутри фагоцита, но и способствует распространению их через кровь и лимфу (диссеминация).



Токсины бактерий

- ▶ Токсины являются одним из важных факторов патогенности многих микроорганизмов.
- ▶ Токсины бактерий делятся на две основные группы экзо- и эндотоксины.

Экзотоксины

- ▶ *Экзотоксины* - вещества белковой природы (ферменты) , вызывающие в малых дозах гибель клеток макроорганизма.
- ▶ Экзотоксины секретируются клеткой в окружающую среду или находятся в связанном состоянии с клеткой, освобождаясь после ее автолиза.
- ▶ Таким образом, выделение экзотоксинов из клетки не является обязательным условием. По этой причине в последнее время вместо термина «экзотоксин» используют термин «**белковые токсины**»

Характеристика экзотоксинов

- ▶ Вещества белковой природы (ферменты)
- ▶ Не связаны с микробной клеткой
- ▶ Обладают высокой токсичностью
- ▶ Относительно термолабильны
- ▶ Избирательно действуют на органы и ткани
- ▶ Под воздействием формалина, кислот, нагревания могут превращаться в анатоксин (токсоид)
- ▶ Синтезируются как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями.

Экзотоксины делятся на несколько групп, в зависимости от специфического взаимодействия с рецепторами клеток мишеней:



Эндотоксины

- ▶ Эндотоксины отличаются от экзотоксинов по многим свойствам.
- ▶ Эндотоксины являются липополисахаридами (ЛПС) наружной мембраны грамотрицательных бактерий.

Характеристика эндотоксинов

- ▶ Представлены липополисахаридным комплексом
- ▶ Связаны с микробной клеткой
- ▶ Относительно малотоксичны
- ▶ Термостабильны
- ▶ Вызывают симптомы общей интоксикации
- ▶ Не превращаются в анатоксин (токсоид)
- ▶ В основном образуются грамотрицательными бактериями

Липополисахарид (полисахаридный комплекс)

ЛПС по химическому составу состоит из комплекса полисахарида и липида.

- ▶ Полисахаридный комплекс состоит из О-антигена и базисной части и обеспечивает антигенность ЛПС. О-антиген обладает значительной изменчивостью и может отличаться даже у представителей одного вида.
- ▶ Поэтому в пределах одного вида бактерий по различию антигенной структуры выделяют О-серовары.
- ▶ Базисная часть достаточно стабильна и остается постоянной у микроорганизмов одного рода и даже семейства. Этим объясняется наличие перекрестно реагирующих антигенов у многих микроорганизмов .

Липополисахарид (липидный комплекс)

- ▶ Липидный комплекс состоит из липида А, который обуславливает токсигенность ЛПС.
- ▶ Структура липида А одинакова у всех видов грамотрицательных бактерий (исключение составляют - *Bacteroides fragilis*, *Bordetella pertussis*, *Brucella abortus*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.)

Экзотоксины	Эндотоксины
<i>Вырабатывается живыми микробными клетками, достигают высокой концентрации в жидкой питательной среде.</i>	<i>Являясь составной частью клеточной стенки грамотрицательных бактерий, высвобождается после их гибели.</i>
<i>Вырабатывается как грамположительными так и грамотрицательными бактериями .</i>	<i>Образуется только грамотрицательными бактериями</i>
<i>Белки с молекулярной массой 10000-900000 Да .</i>	<i>Липополисахаридный комплекс. Токсигенность обусловлена липидом А</i>
<i>Относительно термолабильны, быстро разрушаются при температуре выше 60 С .</i>	<i>Относительно термостабильны, при температуре 60 С сохраняет токсичность в течении часа.</i>
<i>Обладают высокой антигенностью.</i>	<i>Обладает низкой антигенностью</i>
<i>Под воздействием некоторых факторов превращаются в анатоксин, используемый в качестве вакцины</i>	<i>Не превращаются в анатоксин(токсоид).</i>
<i>Обладает высокой токсичностью.</i>	<i>Обладает слабой токсичностью.</i>
<i>Не обладают пирогенным эффектом</i>	<i>Обладают пирогенным эффектом</i>
<i>Синтез детерминируется внехромосомными генами .</i>	<i>Синтез детерминируется только хромосомными генами.</i>
<i>Обладает избирательным действием на органы и ткани.</i>	<i>Не обладает избирательным действием.</i>

Факторы патогенности бактерий (ФПБ)

ФПБ

Структурные компоненты клеток

- Капсула
- Пили
- Жгутики
- Антигены (белки
клеточной стенки)

Ферменты

- Плазмокоагулаза
- Фибринолизин
- Гиалуронидаза
- Лецитиназа
- Нейраминидаза и
др.

Токсины

- Экзотоксины
- Эндотоксины

ФПБ обеспечивает

Инвазивность (внедрение)

Адгезивность
Подвижность
Колонизация
Пенетрация
Ферменты
(гиалуронидаза,
нейраминидаза,
фибринолизин и др.)

Агрессивность

Капсула

Антигены клеточной
стенки
Ферменты
(лецитовителаза,
коагулаза, ДНК-аза и
др.)
Агрессины

Токсичность

Нейротоксины
Гистотоксины
Энтеротоксины
Лейкоцидины
Протеазы
Продукты расщепления
тканей

Роль макроорганизма в развитии инфекционного процесса

- ▶ Возраст (*«детские инфекции»*)
- ▶ Состояние нервной системы
- ▶ Состояние эндокринной системы
- ▶ Роль питания
- ▶ Пол
- ▶ Наследственные факторы
- ▶ Состояние иммунной системы
- ▶ Роль нормальной микрофлоры (*колонизационная резистентность*)

Роль окружающей среды в развитии инфекционного процесса

- ▶ Воздействие температуры («простудные» заболевания)
- ▶ Действие облучения
- ▶ Действие общественных факторов («общественные заболевания»)
- ▶ Действие антропогенных и экологических факторов (природные бедствия)
- ▶ Действие ятрогенных факторов

Особенности инфекционных заболеваний

- ▶ Каждая инфекционная болезнь вызывается **определенным возбудителем (этиологический фактор)** , другими словами каждый патогенный микроорганизм вызывает только определенную болезнь (или болезни).
 - Бактериальные и вирусные инфекции, микозы
 - Протозоозы, гельминтозы, инфестации
- ▶ Инфекционные заболевания характеризуются **контагиозностью**
 - ***Индекс контагиозности*** - показывает отношение числа заболевших после контакта с источником инфекции к общему числу контактировавших с этим источником.
- ▶ Инфекционным заболеваниям свойственна **цикличность течения**
- ▶ После инфекционного заболевания формируется **приобретенный иммунитет**

Источники инфекции

- ▶ **Антропонозы**- источник инфекции только человек
- ▶ **Зоонозы**- источник инфекции больные животные
- ▶ **Сапронозы** - источник инфекции объекты окружающей среды

Механизмы заражения

- ▶ **Воздушно-капельный механизм** - возбудитель в основном локализован в верхних дыхательных путях , при разговоре, кашле и чихании попадает в окружающую среду воздушно-капельным или воздушно-пылевым путем . Данным механизмом передаются возбудители инфекций дыхательных путей
- ▶ **Фекально-оральный механизм** - возбудитель в основном локализован в кишечнике, в окружающую среду выделяется с испражнениями и передается алиментарным путем (пищевой и водный пути). Данный механизм передачи присущ для кишечных инфекций.
- ▶ **Контактный механизм** - возбудители могут локализоваться в разных местах, и разными путями попадают в окружающую среду.
 - заражение возможно прямым или опосредованным контактом
- ▶ **Трансмиссивный механизм**- возбудитель находится в крови больного человека или животного и передается кровососущими насекомыми (малярия , сыпной тиф и др.)
 - парентеральный путь заражения также относится к трансмиссивному механизму

Периоды инфекционных болезней

- ▶ **Инкубационный** , или **скрытый период** охватывает период от попадания патогенного микроба в организм до появления первых симптомов. У большинства заболеваний этот период длится 1-2 недели.
- ▶ **Продромальный** (от греч. *prodromos* - предвестник), или **период предвестников** наступает после инкубационного и характеризуется неспецифическими симптомами (повышение температуры, головные боли, слабость, вялость)
- ▶ **Период клинических проявлений** , начинается после продромального периода и характеризуется специфическими для каждой инфекции симптомами .
 - *общие признаки, характерные симптомы, патогномоничные симптомы.*
- ▶ **Выздоровление (реконвалесценция)** - период угасания симптомов и восстановления функций организма.
 - *Выздоровление, микробоносительство, переход в хроническую форму, летальный исход.*

Формы инфекционного заболевания

- ▶ В зависимости от происхождения:
 - *экзогенная, эндогенная инфекция или аутоинфекция*
- ▶ В зависимости от локализации возбудителя в организме
 - *очаговая, генерализованная инфекция*
- ▶ В зависимости от распространения возбудителя и его токсина в организме
 - *бактериемия (сепсис), вирусемия, токсинемия*
- ▶ В зависимости от количества возбудителя
 - *моноинфекция, микст-инфекция*
- ▶ **Суперинфекция** - повторное заражение тем же возбудителем до выздоровления
- ▶ **Реинфекция** - повторное заражение тем же возбудителем после полного выздоровления.
Рецидив - возврат симптомов заболевания без повторного заражения.

Особенности распространения инфекционных заболеваний

- ▶ **Эпидемия** - прогрессирующее во времени и пространстве массовое распространение инфекционного заболевания среди населения.
- ▶ Распространяясь инфекционное заболевание может охватывать несколько стран, даже континенты - **пандемия**.
- ▶ Иногда инфекция встречается в единичных - **спорадических** случаях.
- ▶ Если инфекционная болезнь распространена только в определенной местности то это называется **эндемией**.
Эндемии - это чаще всего *природно-очаговые* заболевания с определённым источником инфекции и переносчиками.

Биологический метод

Заражение лабораторных животных проводят с целью:

- ▶ изучения патогенности и вирулентности микробов,
- ▶ выделения чистой культуры из патологического материала,
- ▶ создания экспериментальных инфекций

Биологический метод

Моделирование инфекции на животных

Исследуемый материал
(обогащение или инактивирование сопутствующей
микрофлоры)

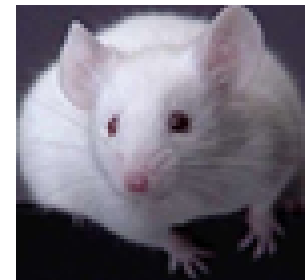
Выбор животного

Выбор метода заражения

Наблюдение за животным

Вскрытие животного , взятие и
исследование материала

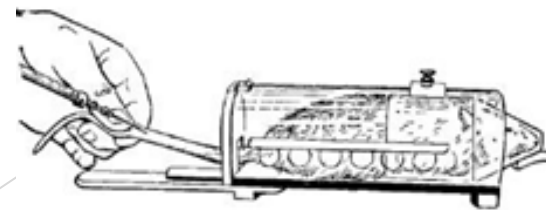
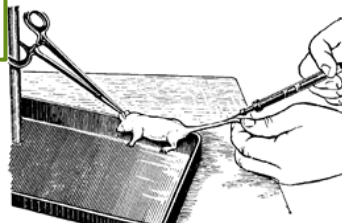
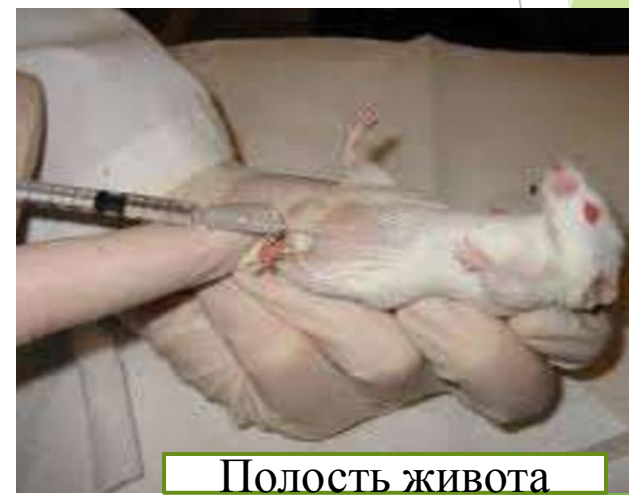
Результат



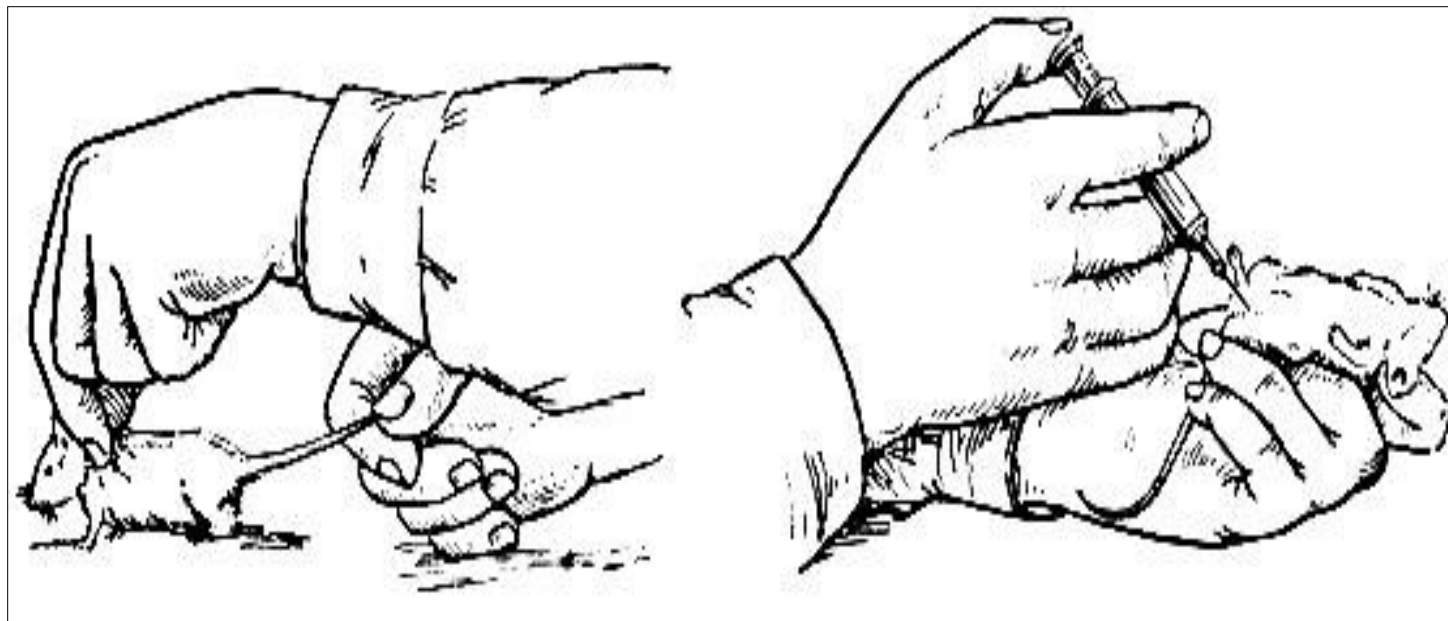
Методы заражения лабораторных ЖИВОТНЫХ

Заражение лабораторных животных (морские свинки, белые мыши, крысы, кролики) проводят разными путями - на поверхность кожи, внутрикожно, подкожно, внутримышечно, внутривенно, в полость живота, интраназально, перорально, интратрахеально, интрацеребрально.

Методы заражения лабораторных ЖИВОТНЫХ



Перитонеальное заражение белых мышей



Вскрытие и бактериологическое исследование трупа лабораторного животного (белые мыши)

- ▶ Целью бактериологического исследования трупа животного является выделение возбудителя, вызвавшего смерть животного, установление места локализации и получения чистой культуры возбудителя.
- ▶ Для предотвращения загрязнения, вскрытие трупа и взятие материала для посева проводится сразу после гибели животного в асептических условиях.
- ▶ В случае необходимости животное умерщвляют согласно принципам биоэтики. Согласно этим принципам манипуляцию проводят в условиях полного обезболивания лабораторных животных.

Бактериологическое исследование лабораторных животных.

Живое животное:

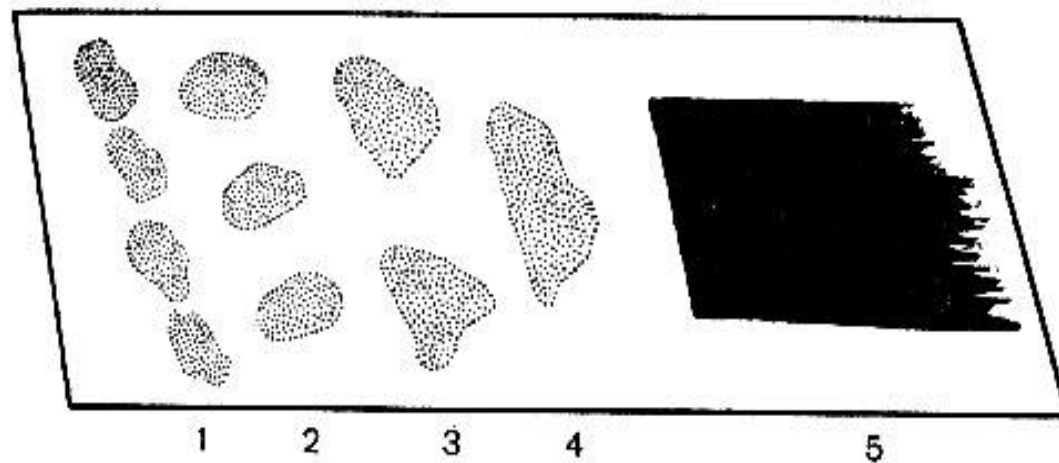
- ▶ Кровь
- ▶ Экссудат из полости живота и др.

Погибшее животное:

- ▶ Кровь
- ▶ Кусочки различных органов
- ▶ Спинномозговая жидкость
- ▶ Жидкости с различных полостей и др.

Бактериологическое исследование трупов лабораторных животных

- ▶ После вскрытия исследуют внутренние органы, готовят мазок-отпечаток с органов и делают инокуляцию в кровяной агар (поверхностью среза органа касаются питательной среды)
- ▶ Параллельно готовятся мазки-отпечатки с печени, селезенки, почек. Мазки-отпечатки фиксируют раствором Никифорова (равные концентрации спирта и эфира) и красят метиленовым синим или методом Романовского-Гимзы, микроскопируют.
- ▶ Инокулированные питательные среды инкубируют 24-48 часов при температуре 37°C .
- ▶ Полученные в результате культивации патологического материала микроорганизмы, идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим и др. свойствам



Приготовление мазков-отпечатков (1-4) и тонкого мазка крови (5) на одном предмете стекла.

Обезвреживание трупов животных

- ▶ После вскрытия тела животных кремируют, стерилизуют в автоклаве или же кипятят в растворе фенола 1-2 часа .
- ▶ Все инструменты, кювет и доска для фиксации обрабатываются дезинфицирующим раствором или стерилизуются в автоклаве.

Определение патогенности и вирулентности (определение летальной дозы)

С этой целью определяют среднюю летальную дозу (LD_{50})

- ▶ При определении LD_{50} микробного штамма в обязательном порядке стандартизируют вид, пол, вес, условия содержания лабораторных животных (в основном белых мышей).
- ▶ Разведенную в несколько десятков раз (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} и т.д.) культуру микроба, вводят в несколько групп, включающих как минимум по 4-6 особей.
- ▶ Через определенное время проводят подсчет умерших и живых особей в каждой группе для определения LD_{50} .

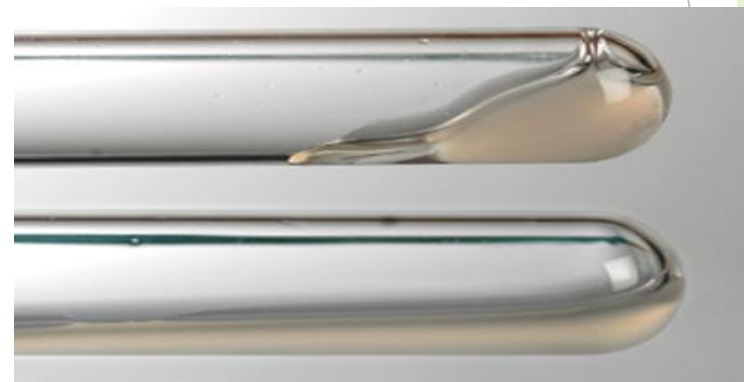
Определение патогенности и вирулентности

(ферменты патогенности)

- ▶ Прямым показателем патогенности микроорганизмов является определение ферментов патогенности.
- ▶ На практике их определяют для идентификации микроорганизмов и с целью дифференциации сапрофитных видов от патогенных .

Определение фермента плазмокоагулазы

- ▶ Исследуемую микробную культуру инокулируют в стерильную цитратную плазму крови. Инкубируют 2-5 часов при температуре 37°C.
- ▶ Синтезирующие плазмокоагулазу микробы свертывают плазму, а в контрольной пробирке плазма остается в жидком состоянии.



Плазмакоагулазная
проба: положительная
(вверху) и
отрицательная(внизу)

Определение фермента лецитиназы

Выявление фермента *лецитиназы*, основывается на расщеплении субстрата содержащего лецитин.

- ▶ Исследуемую микробную культуру инокулируют в чашки Петри с желточным агаром и инкубируют при температуре 37⁰С в течении суток.
- ▶ Лецитиназная активность проявляется появлением помутнения вокруг колоний.



Определение фермента гиалуронидазы

Определение *гиалуронидазы* основывается на реакции гидролиза гиалуроновой кислоты этим ферментом.

- ▶ Исследуемую микробную культуру инокулируют в субстрат с гиалуроновой кислотой. Инкубируют при температуре 37°C в течении 15 минут, потом добавляют 2-3 капли концентрированной уксусной кислоты.
- ▶ При наличии гиалуроновой кислоты в пробирках образуются сгустки слизи.

Определение гемолитической активности

- ▶ Для определения гемолитической активности исследуемую микробную культуру инокулируют в чашку Петри с кровяным агаром.
- ▶ Инкубируют при температуре 37°C в течение суток.
- ▶ При наличии гемолитической активности вокруг колоний наблюдают зоны гемолиза.



Определение экзотоксинов

- ▶ Основным показателем патогенности микробов является синтез экзотоксинов. В классических исследованиях это свойство изучали в опытах на лабораторных животных.
- ▶ В настоящее время изучение способности синтезировать экзотоксины проводится на культурах клеток, куриных эмбрионах, культурах простейших.
- ▶ Также определяются генетические детерминанты токсинов микроорганизмов, например гены токсигенности, с помощью ПЦР.
- ▶ Для определения экзотоксина возбудителя дифтерии применяют серологический метод- реакцию преципитации (тест Элека)

Реакция нейтрализации токсина антитоксином *in vivo*

