

## **Занятие 16**

**Инфекция. Заражение, вскрытие и исследование лабораторных животных.  
Определение патогенности и вирулентности.**

## Обсуждаемые вопросы:

- 1. Понятия об инфекции, инфекционном процессе, инфекционном заболевании.
- 2. Условия возникновения инфекционного процесса.
- 3. Роль микроорганизмов в развитии инфекционного процесса.
- 4. Факторы патогенности микроорганизмов (морфологические структуры, ферменты и токсины).
- 5. Понятия патогенность и вирулентность (инфекционная доза ID).
- 6. Определение вирулентности микроорганизмов: летальные дозы (D<sub>1m</sub>, LD<sub>50</sub>, D<sub>cl</sub>).
- 7. Роль макроорганизма в развитии инфекционного процесса (возраст, пол, наследственные факторы, нервная, эндокринная, иммунная системы, нормальная микрофлора).
- 8. Роль факторов окружающей среды в развитии инфекционного процесса (температура, облучение, социальные, антропогенные, экологические, ятрогенные факторы).
- 9. Виды инфекций (по происхождению, клиническим проявлениям и др.)
- 10. Особенности инфекционных заболеваний (триада Хенле-Коха, контагиозность, цикличность, развитие иммунитета).
- 11. Периоды и формы инфекционного заболевания, особенности распространения.
- 12. Источники инфекции и пути заражения.
- 13. Сущность биологического метода исследования.
- 14. Выбор, подготовка и методы заражения лабораторных животных.
- 15. Вскрытие и исследование зараженных животных.

## Цель занятия:

- дать студентам информацию об инфекционном процессе, условиях возникновения инфекционного процесса, инфекционном заболевании и его особенностях, периодах, формах особенностях распространения, источниках инфекции и путях инфицирования. Разъяснить студентам роль микроорганизмов в развитии инфекционного процесса, объяснить понятия патогенность и вирулентность, а также сущность биологического метода исследования и его значение в микробиологической диагностике

# 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.

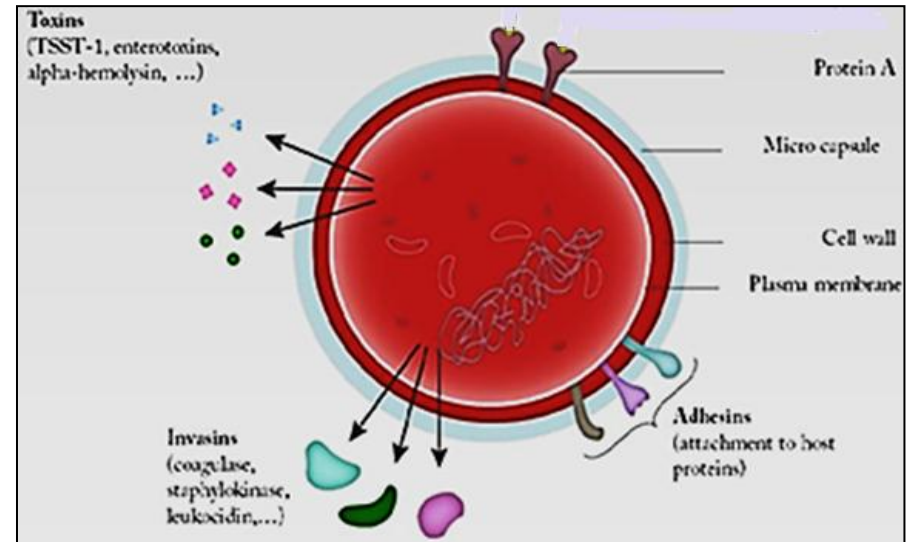
**В лабораторных условиях вирулентность микроорганизмов обычно оценивается на лабораторных животных, особенно на белых мышах. Для этого определяется летальная и инфекционная дозы.**

**Летальная доза**— это наименьшее количество живого возбудителя или его токсина , вызывающее в определенный срок гибель конкретного количества животных.

- **Безусловно смертельная доза** (DCL - *dosis certa letalis*) - наименьшее количество живого микроба или его токсина, вызывающее в течение определенного времени гибель 100% экспериментальных животных .
- **Минимальная смертельная доза** (DLM - *dosis letalis minima*) – наименьшее количество живого микроба или его токсина, вызывающее в течение определенного времени гибель 90% экспериментальных животных.
- **Средняя летальная доза** ( $LD_{50}$ ) – минимальное количество живых микробов, способное вызвать развитие инфекционного заболевания у 50% зараженных экспериментальных животных.
- **К инфицирующей дозе относятся**  $iD_{100}$  и  $iD_{50}$  .

# Факторы патогенности микроорганизмов

- Патогенность микроорганизмов обеспечивается **факторами патогенности**. Наличие этих факторов отличают 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

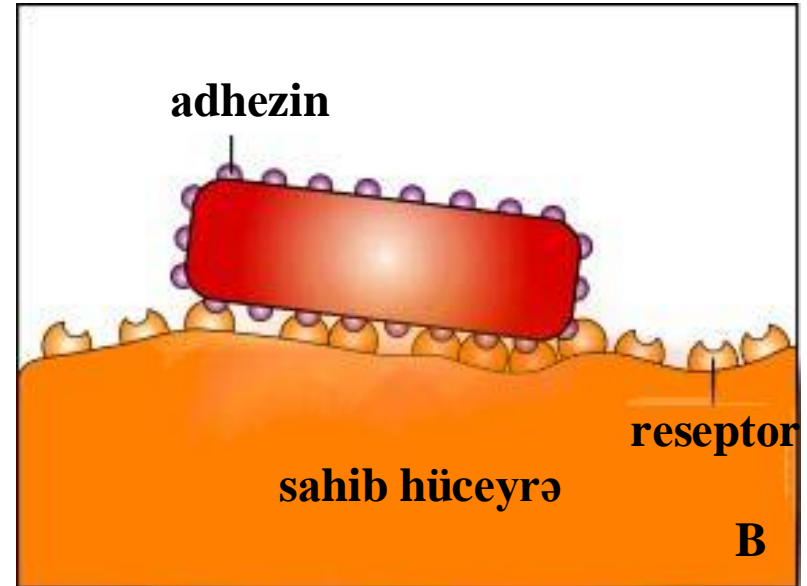
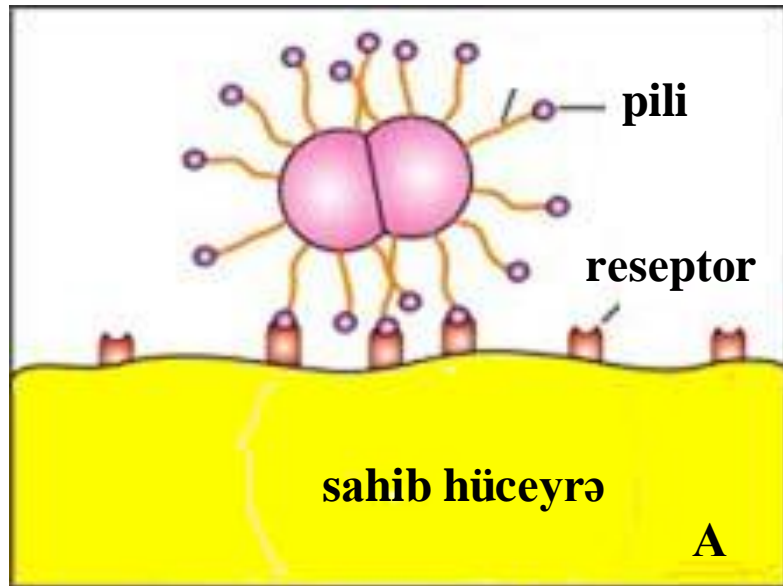


# Факторы патогенности микроорганизмов

- ❖ **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

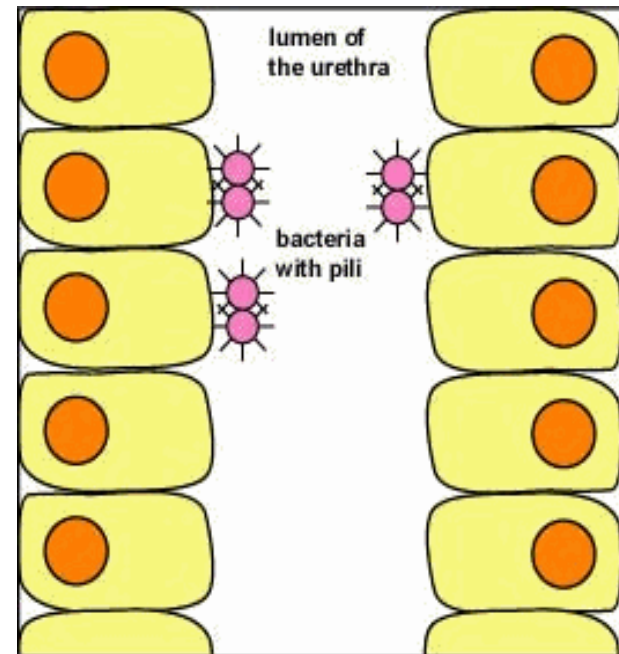
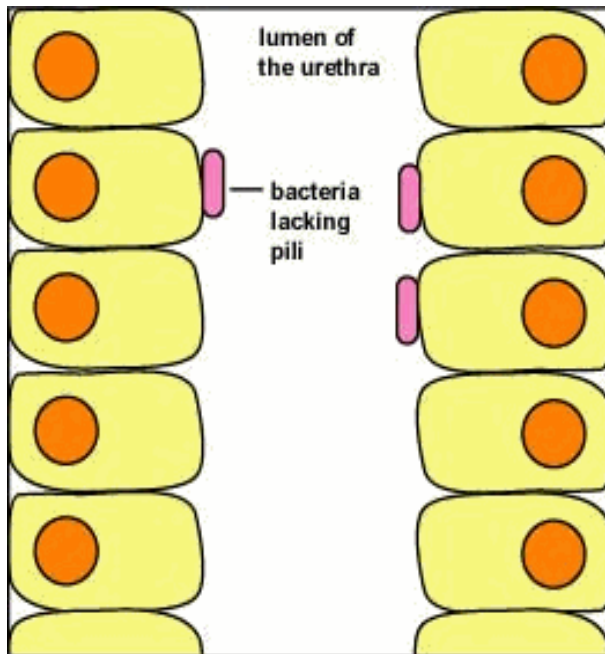
- **Адгезия** (от лат. *adhaesio* – притяжение, прилипание) – способность микроорганизмов к прикреплению на соответствующих клетках и тканях хозяина.
- С одной стороны этот процесс обеспечивается за счет пилей и других поверхностных структур микроорганизмов (**адгезины или лиганды**).
- С другой стороны - 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

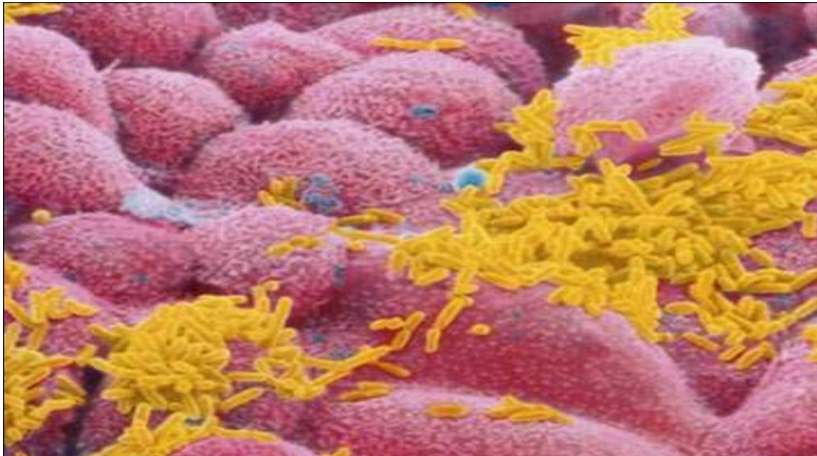


# Колонизация

- 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.



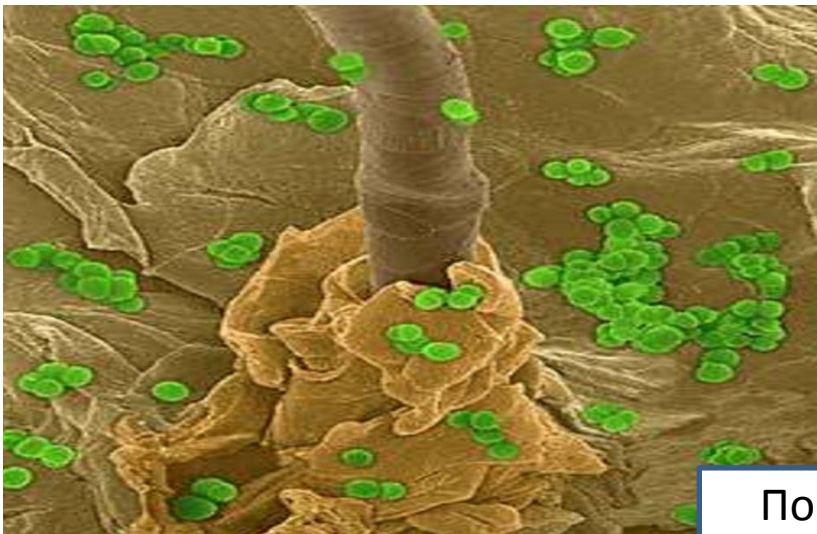
# Колонизация



Слизистая полости рта



Слизистая желудка



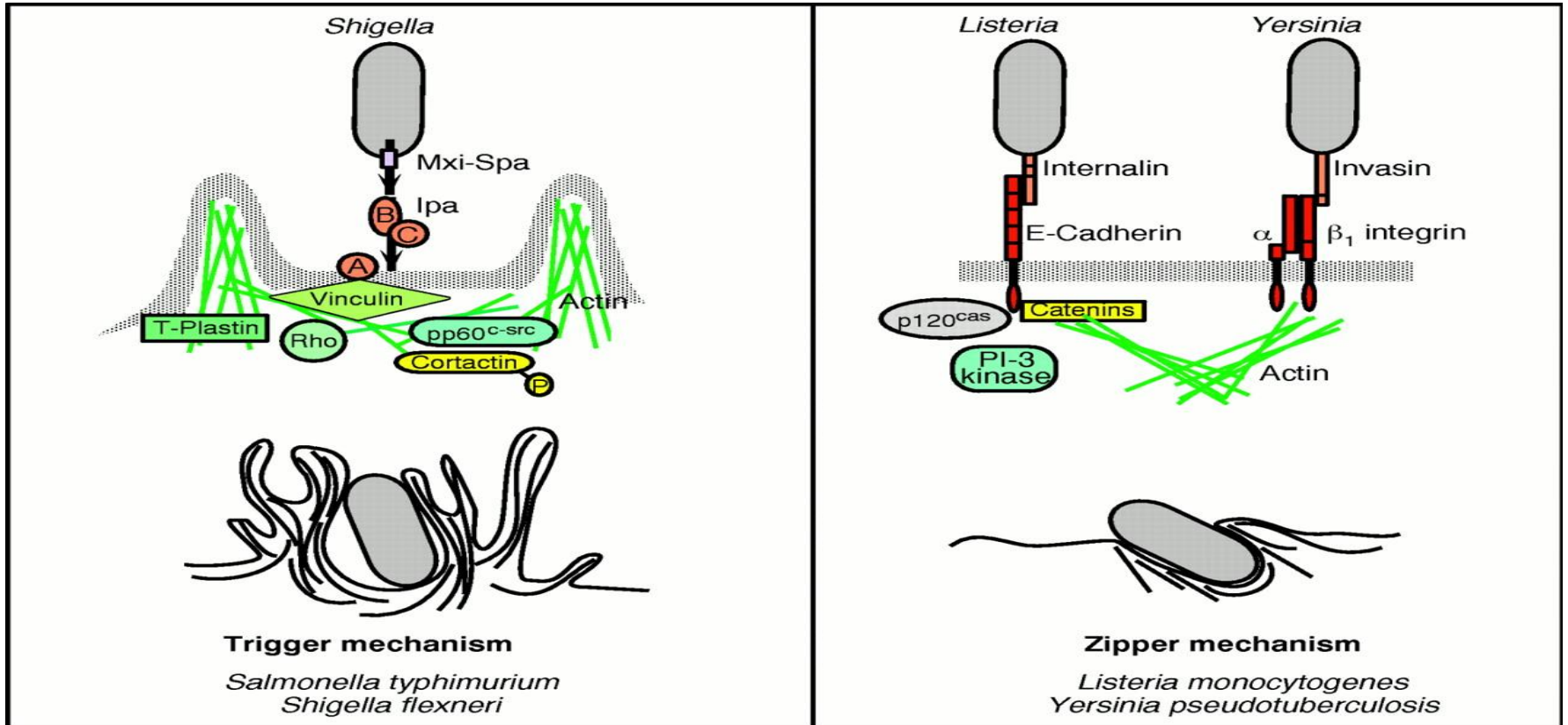
Поверхность кожи



# 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.

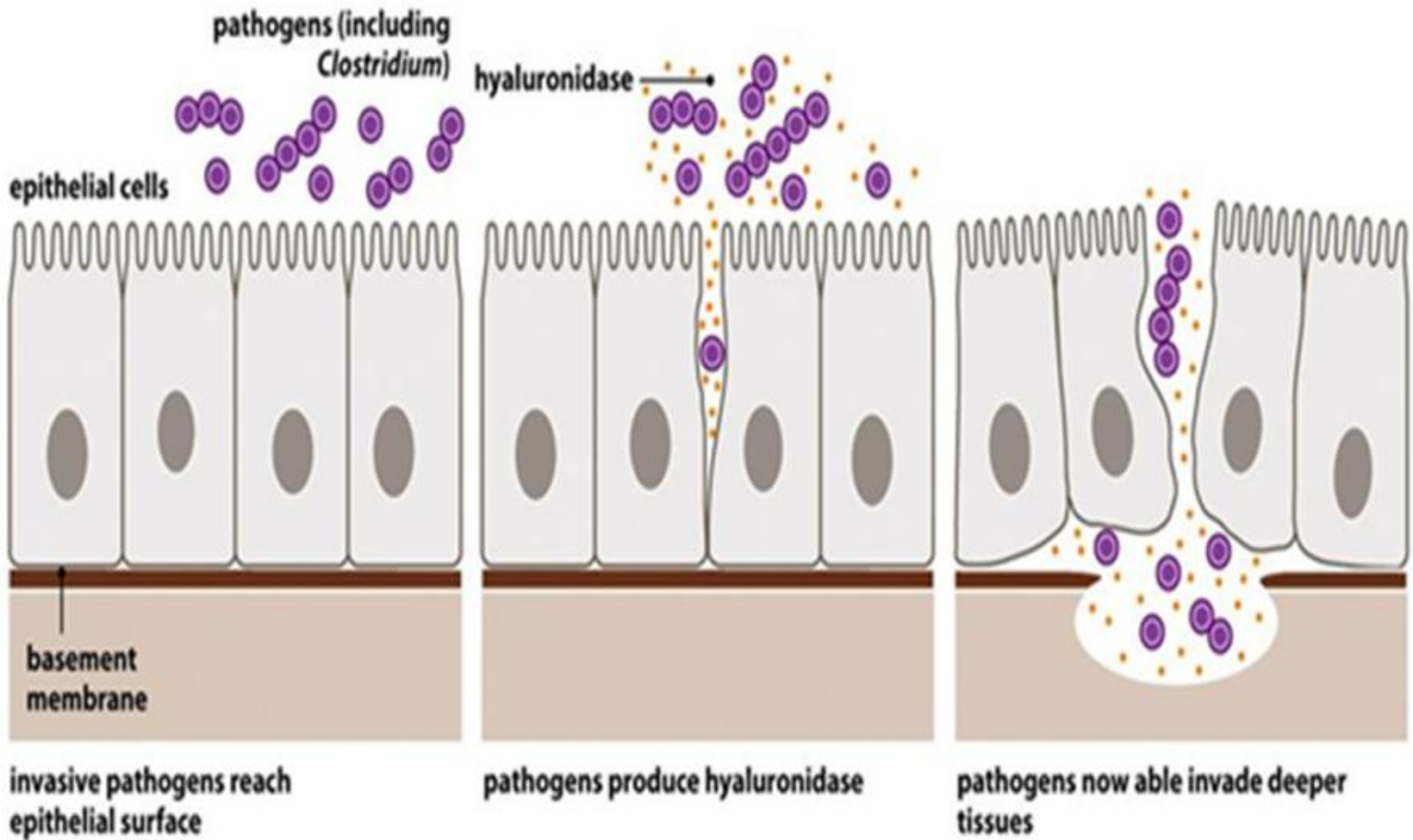
# Особенности инвазии у различных микроорганизмов



# 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*

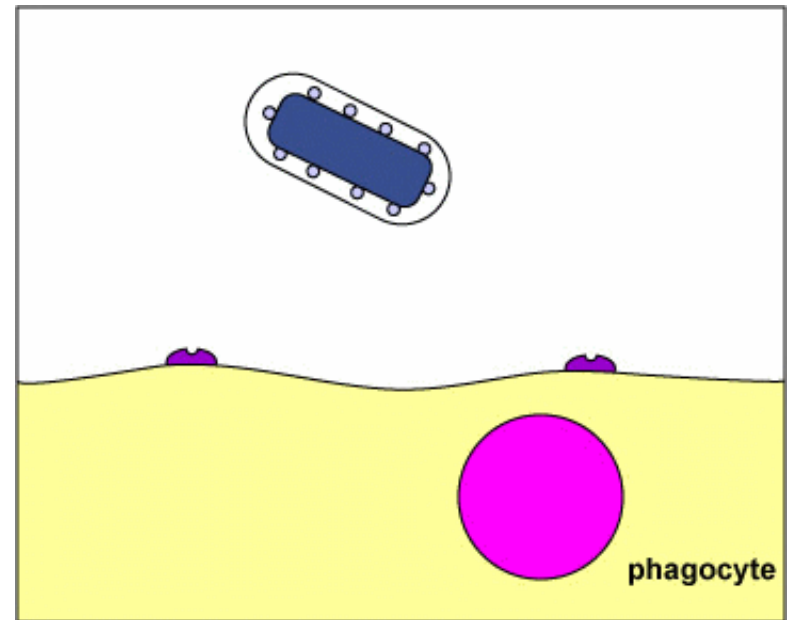
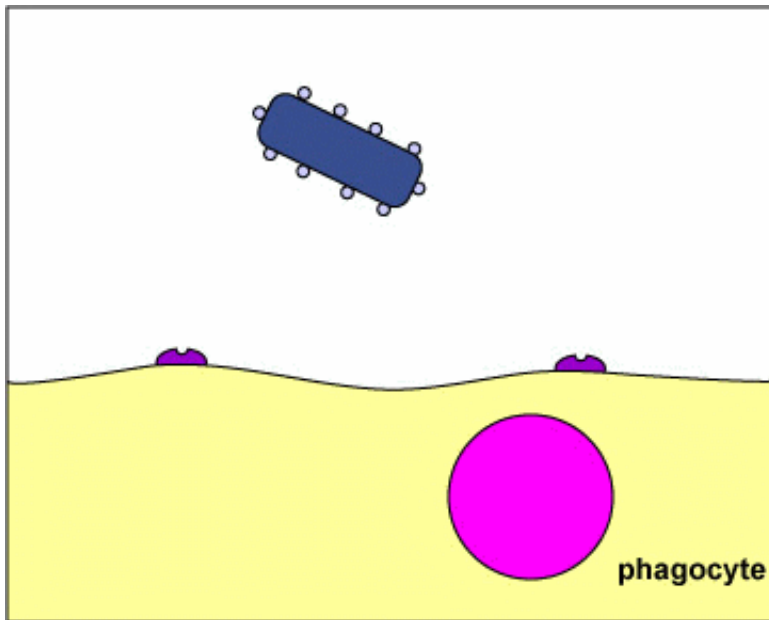
# Ферменты агрессии



# Факторы, препятствующие фагоцитозу

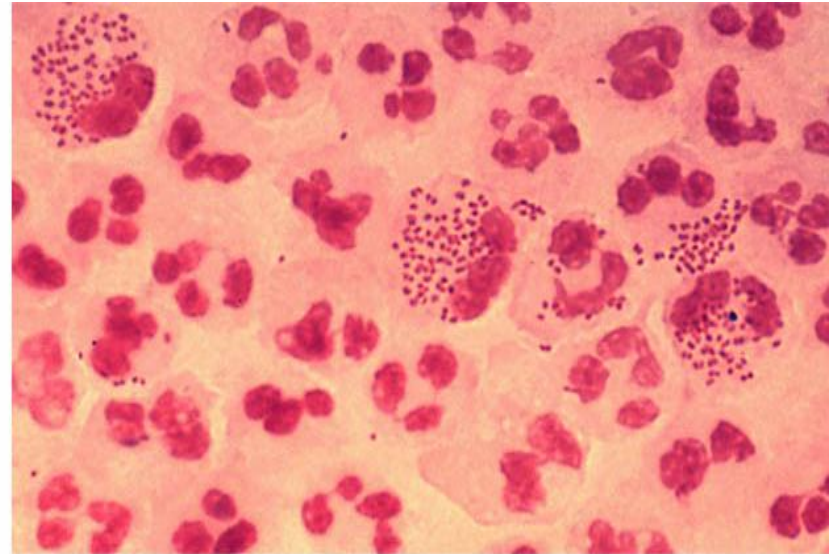
- Многие микроорганизмы, в частности бактерии, обладают такими факторами как **микрокапсула, капсула, слизистая оболочка** препятствующими фагоцитоз.
- Некоторые микробы синтезируют вещества **подавляющие хемотаксис** или **расщепляющие хемоаттрактанты**.
- Микроорганизмы также обладают факторами, защищающими 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 термолabileны
- 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:**

**Экзотоксины**

Энтеротоксины

Нейротоксины

Дермонекротоксины

Лейкоцидины

Цитотоксины

Гемолизины

# 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.

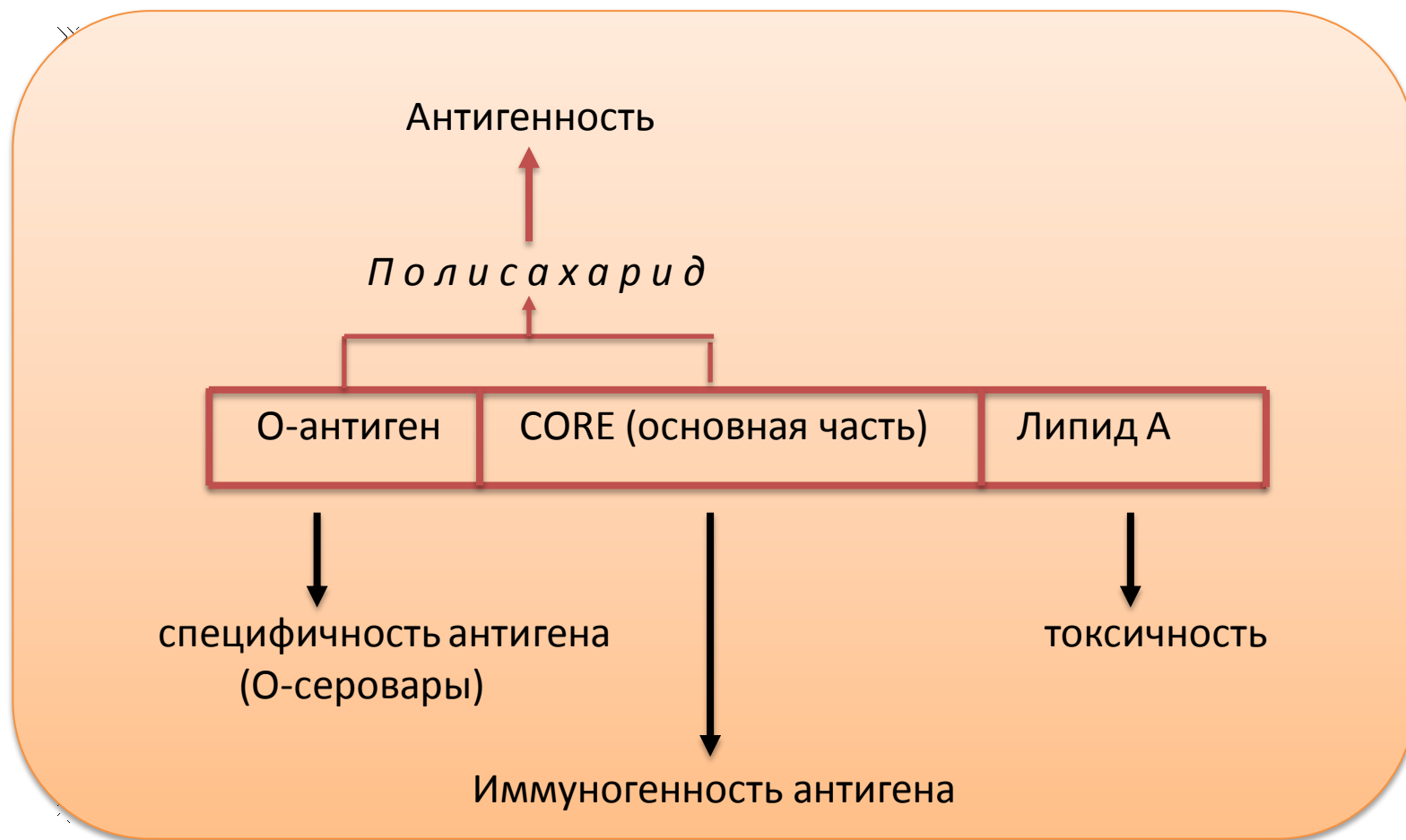
- **Полисахаридный комплекс** состоит из О-антигена и базисной части и обеспечивает антигенность ЛПС. О-антиген обладает значительной изменчивостью и может отличаться даже у представителей одного вида.
- Поэтому в пределах одного вида бактерий по различию антигенной структуры выделяют О-серовары.
- Базисная 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.)



# Схема строения липополисахаридного комплекса.



<b>Экзотоксины</b>	<b>Эндотоксины</b>
<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 **определённым возбудителем (этиологический фактор)** , другими словами каждый патогенный микроорганизм вызывает только определённую 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 **приобретённый 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.

# Формы инфекционного заболевания

- **В зависимости от продолжительности пребывания возбудителя в организме различают:**
  - **Острые инфекции** – относительно непродолжительные, длятся от одной недели до одного месяца (грипп, корь, чума и др.).
  - **Хронические инфекции** - характеризуются длительным (6 месяцев и более) течением (туберкулез, лепра, бруцеллез, сифилис и др.). При хронических инфекциях наблюдают длительную **персистенцию** возбудителя в организме.
  - **Микробоносительство** (бактерио-, паразито-, вирусо-, микробоносительство) – возбудитель персистирует в организме определенное время, иногда может оставаться на всю жизнь. Микробоносительство может протекать **латентно, скрыто** или же как **дремлющая** инфекция.
- **В зависимости от клинического проявления различают:**
  - *Типичные, атипичные, инаппарантные (латентные, скрытые, субклинические, бессимптомные), стертые, молниеносные (фульминантные), abortивные.*

# 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

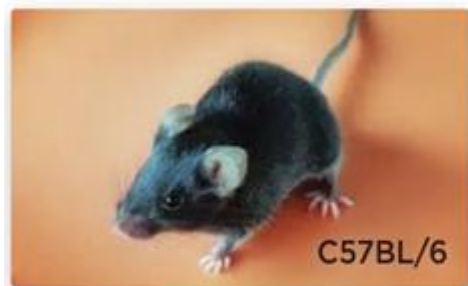
Наблюдение за животным

Вскрытие животного , взятие и  
исследование материала

Результат



# Лабораторные животные



# Подготовка лабораторных животных к эксперименту.

- Выбор животных по весу, полу и возрасту
  - при выборе лабораторных животных учитывается степень их чувствительности к исследуемому возбудителю (например, морские свинки чувствительны к туберкулезу, дифтерии, чуме, сибирской язве; белые мыши – туляремии, ботулизму, столбняку и др.) .
- Маркировка животных



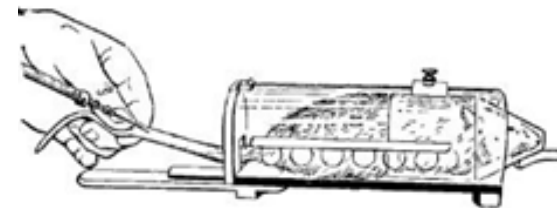
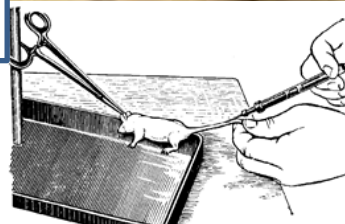
# Подготовка инструментов и материалов

- Все инструменты используемые при манипуляции должны быть стерильными.
- Материал, вводимый животному, разбавляют в стерильном физиологическом растворе. Раствор набирают в шприц. Пузырьки воздуха со шприца, также лишний материал выводится в стерильную вату замоченную в 5%-ом хлорамине, 5%-ой карболовой кислоте или же в спирте.
- Все инструменты используемые в заражении животных должны быть простерилизованы.

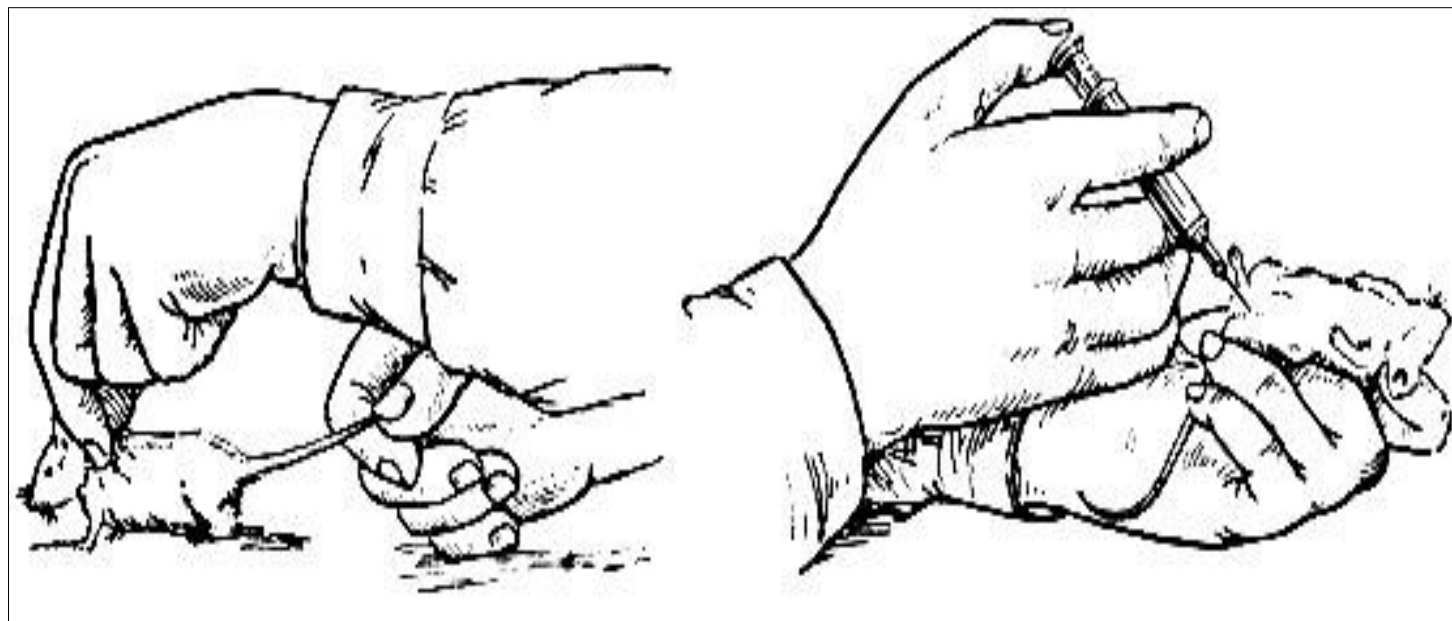
## **Методы заражения лабораторных животных**

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



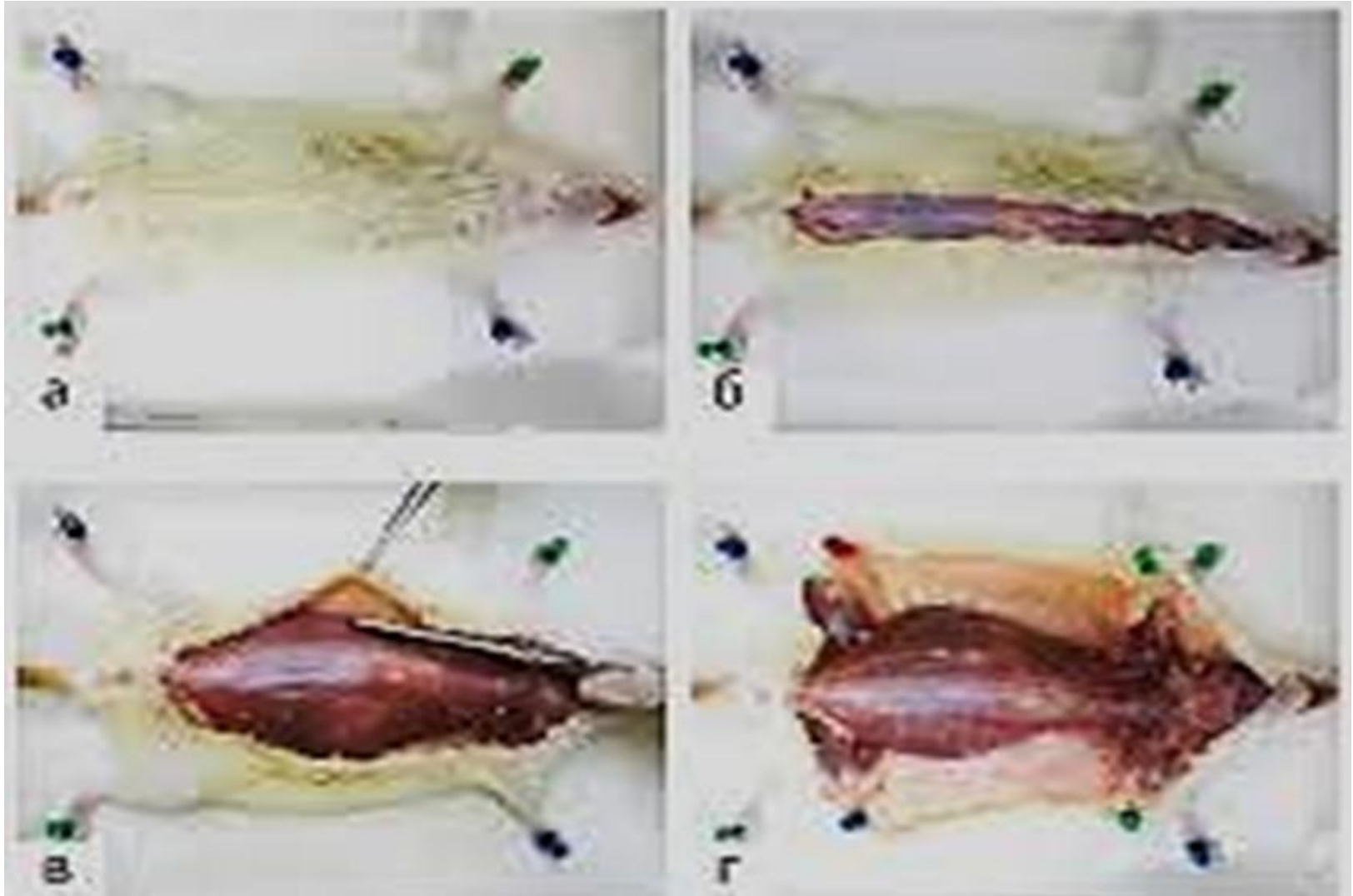
# Содержание зараженных животных в вивариумах



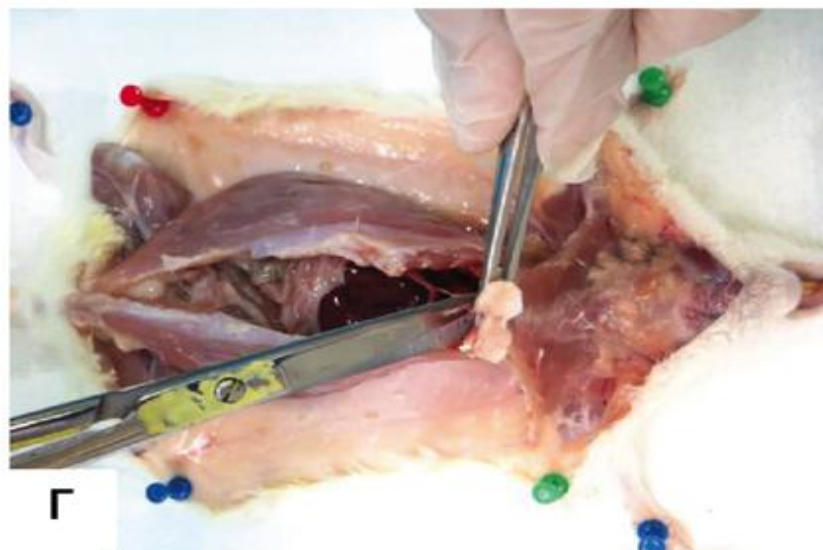
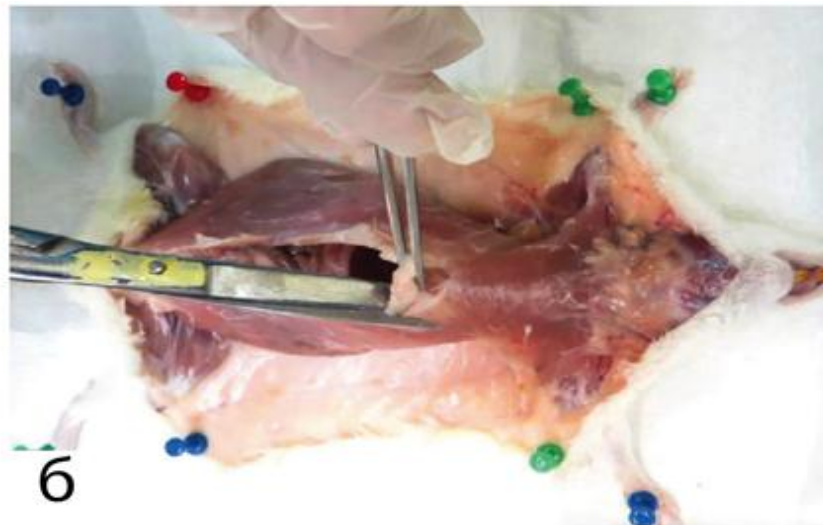
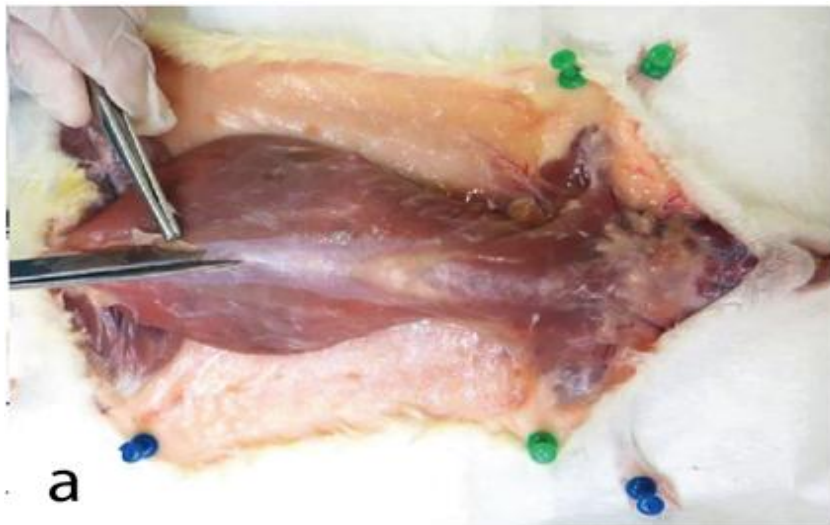
## Вскрытие и бактериологическое исследование трупа лабораторного животного (белые мыши)

- 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.

# Вскрытие трупа лабораторного животного (белые мыши)



# Вскрытие трупа лабораторного животного (белые мыши)





# **Бактериологическое исследование лабораторных животных.**

## **Живое животное:**

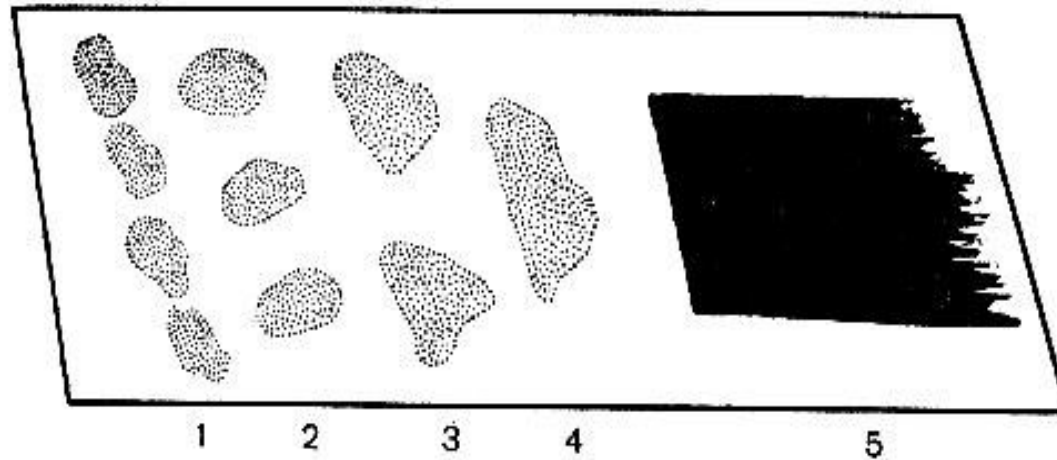
- Кровь
- Экссудат из полости живота и др.

## **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 стекле.

# 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  $LD_{50}$ .

# Вычисление средней летальной дозы (LD<sub>50</sub>) методом Крелера

Для вычисления существует много методов. Наиболее используемый - **метод Крелера**. LD<sub>50</sub> рассчитывается путем подстановки числа погибших и выживших животных каждой группы в формулу Крелера.

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - S (\sum Li - 0,5)$$

- $\lg$  – десятичный логарифм;
- $\sum$  - сумма;
- $S$  – десятичный логарифм отношения последующей дозы к предыдущей;
- $Li$  – отношение числа умерших к общему числу животных в одной группе;
- $N$  – общее число исследуемых доз ( разбавлений);
- $\lg D_N$  – максимальная доза среди исследуемых доз.

# Определение патогенности и вирулентности

- В нынешнее время согласно **принципам биоэтики** использование лабораторных животных с целью изучения патогенности и вирулентности ограничено.
- Наибольшее применение получили другие методы- заражение культуры клеток, куриных эмбрионов, культуры простейших.
- Также определяют отдельные факторы патогенности микроорганизмов или же их генетические детерминанты.

# Определение патогенности и вирулентности

(изучение адгезивности, инвазивности и цитотоксичности микробов)

- Для изучения адгезивности, инвазивности и цитотоксичности микробов проводят заражение стандартных однослойных клеточных культур (HeLa, Hep-2 и др.). Спустя определенное время культивирования в оптимальных условиях, сливают культуральную жидкость, проводят смыв для удаления не прикрепившихся клеток, фиксируют и микроскопируют
- Под микроскопом подсчитывают 200-300 клеток с цитопатическими изменениями. Также подсчитывается внутриклеточно и внеклеточно расположенные микроорганизмы.
- Определяют число микроорганизмов расположенных внутри и вне одной клетки (**индексы адгезии и инвазии**), определяют процентное содержание клеток, подвергшихся цитопатическому действию (**индекс цитотоксичности**)

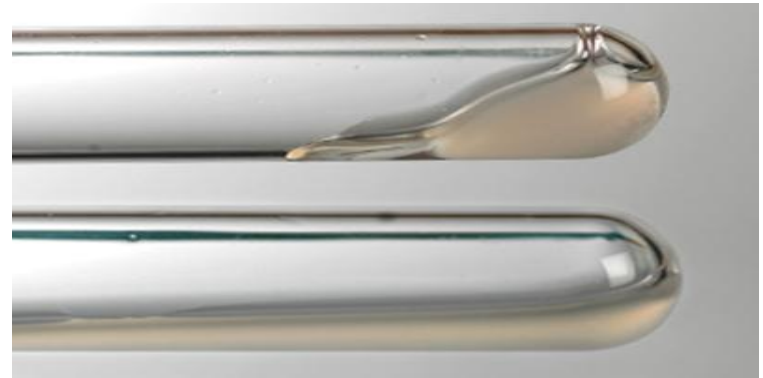


# Определение патогенности и вирулентности (ферменты патогенности)

- 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 37<sup>0</sup>С 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<sup>0</sup>С 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<sup>0</sup>С 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*

