**Занятие 16**

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

**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**.** *Invаziо –* 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., *sаprоs -* гнилой, *phytоn* - растение) – комменсалы, живущие в организме человека , животных и в окружающей среде, не вызывают заболевания.
* *Патогенные микроорганизмы* (от лат., *pаthоs* – страдание, *gеnоs* - 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 отличатся даже среди микроорганизмов одного вида. Степень патогенности называется вирулентностью (от лат. *virulеntus* - 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 - *dоsis cеrtа lеtаlis*) - наименьшее количество живого микроба или его токсина, вызывающее в течение определенного времени гибель 100% экспериментальных животных .
* ***Минимальная смертельная доза*** (DLM - *dоsis lеtаlis minimа*) – наименьшее количество живого микроба или его токсина, вызывающее в течение определенного времени гибель 90% экспериментальных животных.
* ***Средняя летальная доза*** (LD50) – минимальное количество живых микробов, способное вызвать развитие инфекционного заболевания у 50% зараженных экспериментальных животных.
* **К инфицирующей дозе относятся** İD100 и İD50 .

**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 соединительнотканные барьеры в ткани (нейраминидаза и гиалуронидаза).

**Адгезия.**

* **Адгезия** (от лат. *аdhаеsiо* – 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.**

**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.

**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.

* **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*, *IgА1-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 .

**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.

**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 интоксиации
* 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 достаточна 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 обусловливает токсигенность ЛПС. Структура липида А одинакова у всех видов грамотрицательных бактерий ( исключение составляют - *Bаctеrоidеs frаgilis, Bоrdеtеllа pеrtussis, Brucеllа аbоrtus, Psеudоmоnаs аеruginоsа* и др.)

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

**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** (*колонизационая 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 меcтах, 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. *prоdrоmоs* – 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-, мико-носительство) – 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), абортивные.***

* ***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**

**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.

**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

**Обезвреживание трупов животных.** После вскрытия тела животных кремируют, стерилизуют в автоклаве или же кипятят в растворе фенола 1-2 часа. Bсе 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 (LD50)

* При определении LD50 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 LD50.

**Вычисление средней летальной дозы (LD50) *методом Кребера.***

Для вычисления существует много методов. Наиболее используемый - ***метод Кербера***. LD50рассчитывается путем подстановки числа погибших и выживших животных каждой группы в формулу Кербера.

IgLD50 = IgDN – S (∑Li – 0,5)

* Ig – десятичный логарифм;
* ∑ - сумма;
* S – десятичный логарифм соотношения последующей дозы к предыдущей;
* Li – соотношение числа умерших к общему числу животных в одной группе;
* N – общее число исследуемых доз ( разбавлений);
* IgDN – 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)*

* 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 370C.
* Синтезирующие плазмокоагулазу микробы свертывают плазму, а в контрольной пробирке плазма остается в жидком состоянии.

**Определение фермента лецитиназы**

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

* Исследуюмую микробную культуру инокулируют в чашки Петри с желточным агаром и инкубируют при температуре 370C в течении суток.
* Лецитиназная активность проявляется появлением помутнения вокруг колоний.

**Оперделение фермента гиалуронидазы**

Опеределение ***гиалуронидазы*** основывается на реакции гидролиза гиалуроновой кислоты этим ферментом. Исследуемую микробную культуру инокулируют в субстрат с гиалуроновой кислотой. Инкубируют при температуре 370C 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** исследуюмую микробную культуру инокулируют в чашку Петри с кровяным агаром.
* Инкубируют при температуре 370C 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)