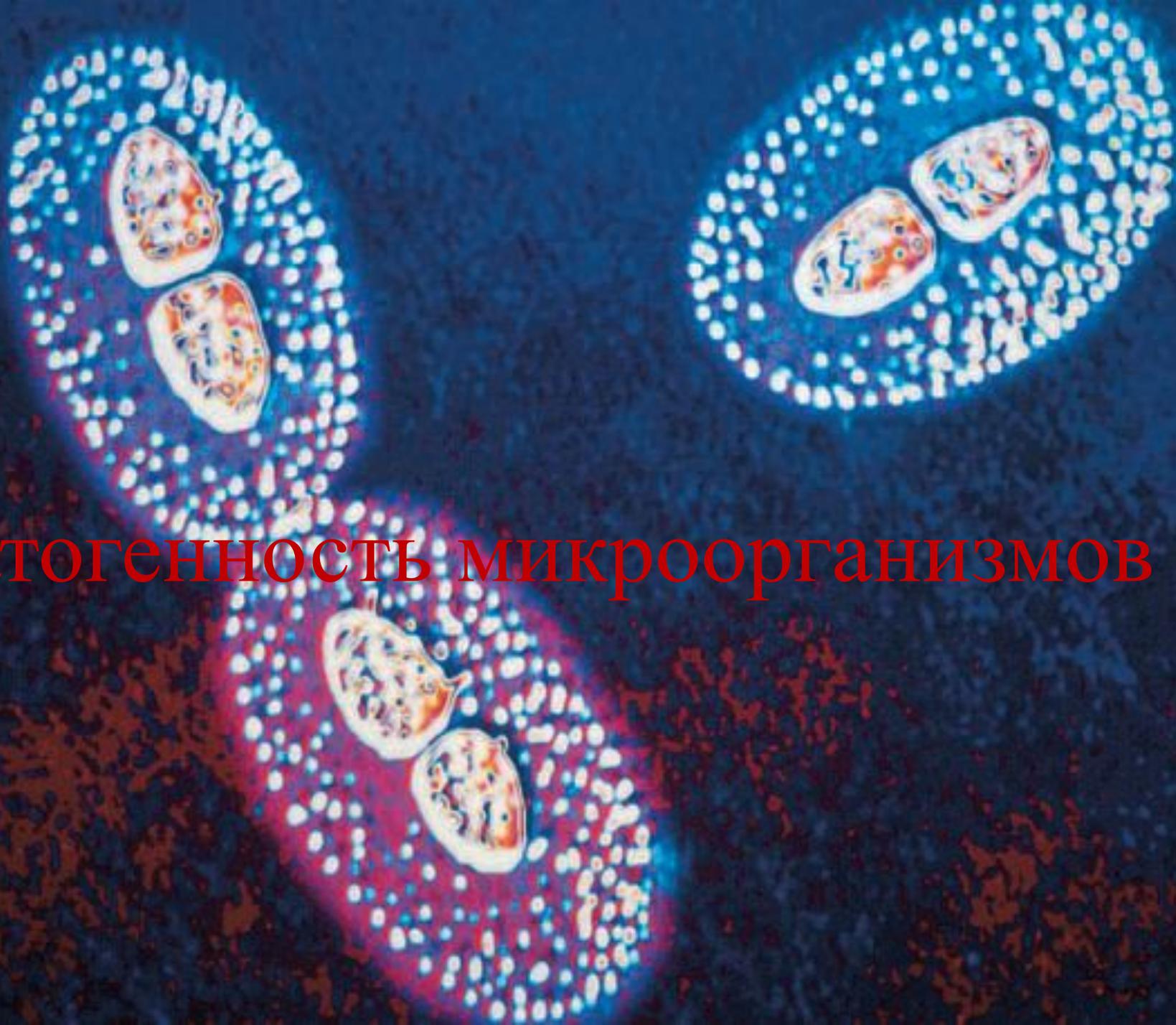


Патогенность микроорганизмов



Патогенность



Патоген – заболевание.

Вирусный инфекционный процесс.

Бактериальный инфекционный процесс.

Козволюция (регуляция вирулентности).

Участки генома бактерий, кодирующие антигены вирулентности – островки патогенности.

Инфекции и интоксикации.

Эндотоксины и экзотоксины.

Эволюция патогенов, направленная на защиту от иммунитета хозяина.

Взаимоотношения паразит-хозяин



Термин паразитизм включает простейших и гельминтов. Однако любой организм, вызывающий заболевание – паразит.

В микробиологии: болезнь – взаимоотношения паразит-хозяин.

Эктопаразиты, эндопаразиты.

(Сапрофиты в некоторых случаях могут быть патогенами).

Паразит-хозяин



- Жизненный цикл паразита:
основной хозяин, промежуточный хозяин (необходим для завершения жизненного цикла), дополнительные (не обязателен для жизненного цикла), резервуарные (носитель паразита).
- Инфекция – рост и размножение паразита внутри хозяина.
- Инфекционное заболевание – изменение в состоянии здоровья или неспособность тканей или органов выполнять свои нормальные функции, в результате присутствия паразитических организмов или их продуктов.
- Патогенность – способность вызывать заболевание.

Паразит-хозяин



Первичный (явный) и оппортунистический патоген (часть нормальной микробиоты).

Эффект паразит-хозяин взаимоотношений определяется:

Числом МО, инфицировавшим организм;

Степенью патогенности (вирулентности);

Защитой хозяина.

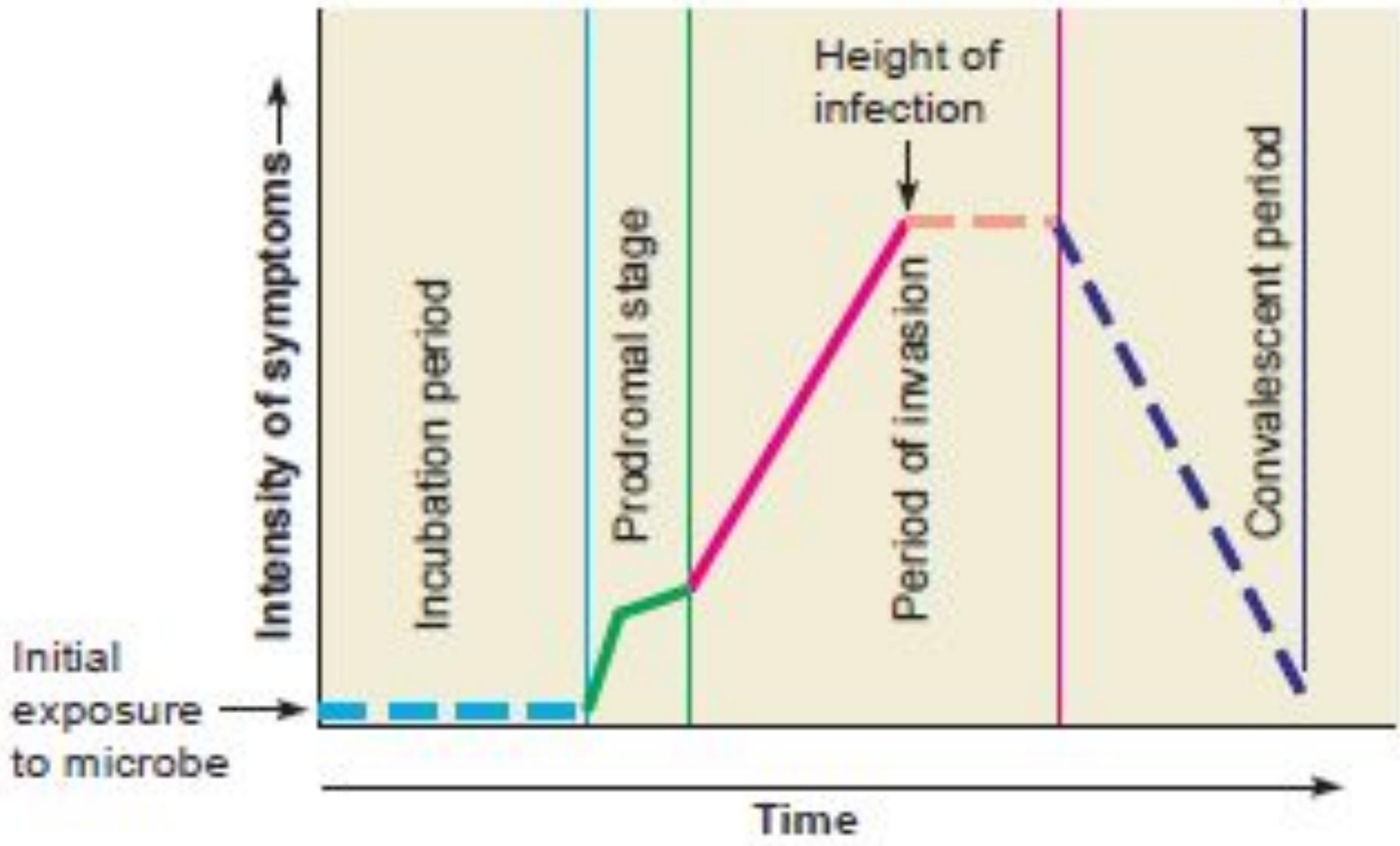
***Инфекционность = число патогенов * вирулентность
резистентность хозяина***

Вирулентность – интенсивность или степень патогенности. Определяется антигенами (факторы вирулентности - капсулы, пили, токсины).

Паразит-хозяин



- 3 критерия вирулентности: инвазивность (проникать), инфекционность (создавать очаг инфекции), патогенный потенциал (степень повреждения).
- Патогенный потенциал – токсигенность – способность продуцировать токсины.
- Вирулентность определяется летальной дозой 50 (LD^{50}) или инфекционной дозой 50 (ID^{50}).



Новые патогены



До изобретения антибиотиков наибольшую опасность представляли инфекционные болезни, «классические» патогенные бактерии, облигатные патогены.

К ним относят *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteric* серовар *Typhi* (возбудитель брюшного тифа), *Mycobacterium tuberculosis* (возбудитель туберкулеза).

В настоящее время большое значение приобрели факультативно патогенные бактерии (оппортунистические), присутствующие в окружающей среде или в составе нормальной микрофлоры человека. Примерами таких микроорганизмов являются бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, гриб *Candida albicans*.

Новые патогены



Наряду с 200 видами «классических» патогенных бактерий, в наше время описано несколько десятков новых патогенных прокариот, главным образом оппортунистических. Патогенность – ГПГ передача генов факторов вирулентности, локализованных в плаزمиде, транспозонах, бактериофагах, островках патогенности в составе бактериальных хромосом. Примером «нового» патогена является энтерогеморрагический вариант *E. coli* (EHEC), вызывающий геморрагический колит и гемолитический уретический синдром. Такой штамм, описанный в 1982 г., несет Stt-конвертирующий токсин (Shiga-like toxin), плазмиду, содержащую ген другого токсина (гемолизина), а также ген фактора адгезии.

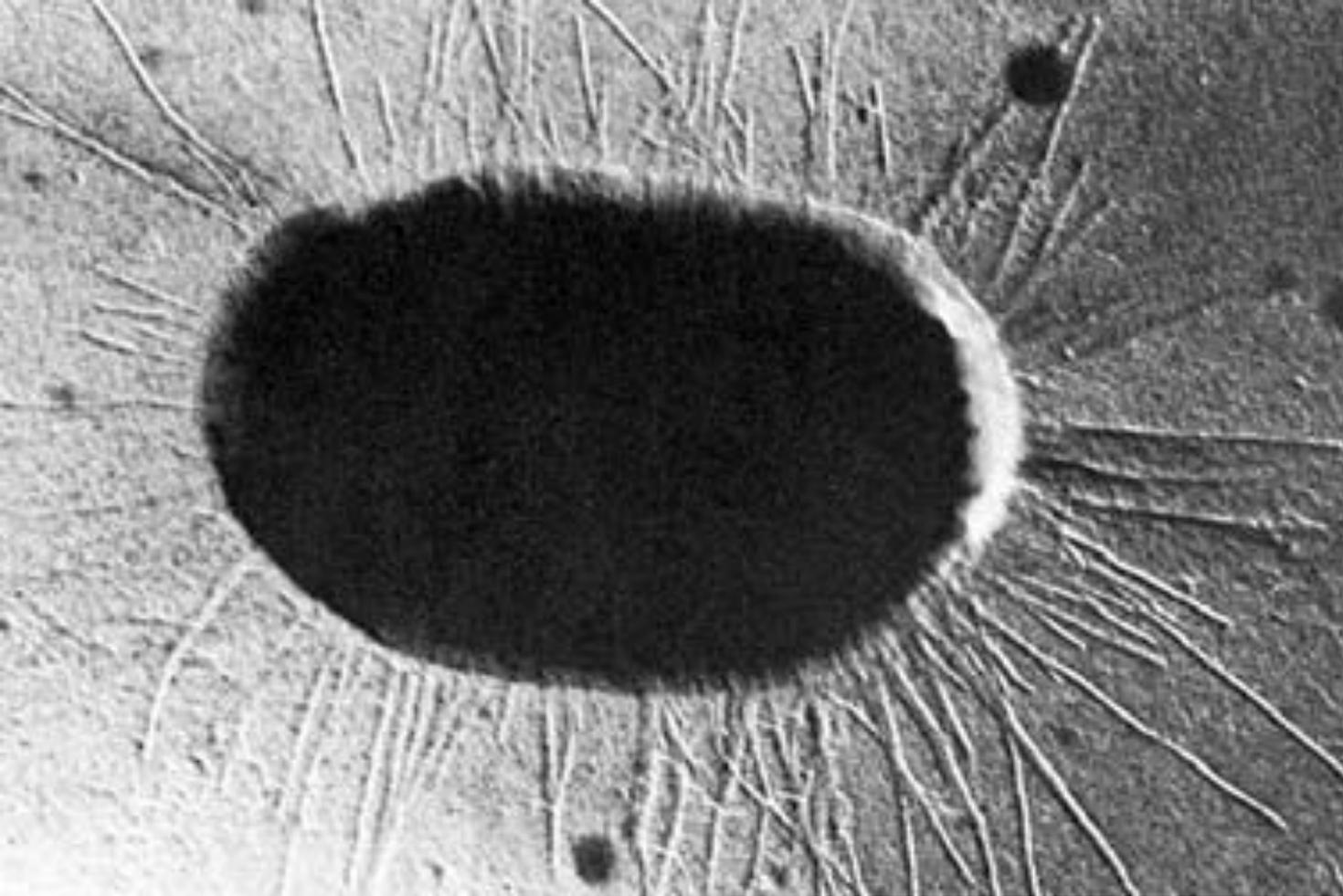
Новые патогены



Применение молекулярных методов клонирования генов, использования ДНК и РНК-зондов для гибридизации позволило описать ряд бактерий – внутриклеточных паразитов (*Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* и другие). Выявленные факторы патогенности используются как основной инструмент исследования данных заболеваний.

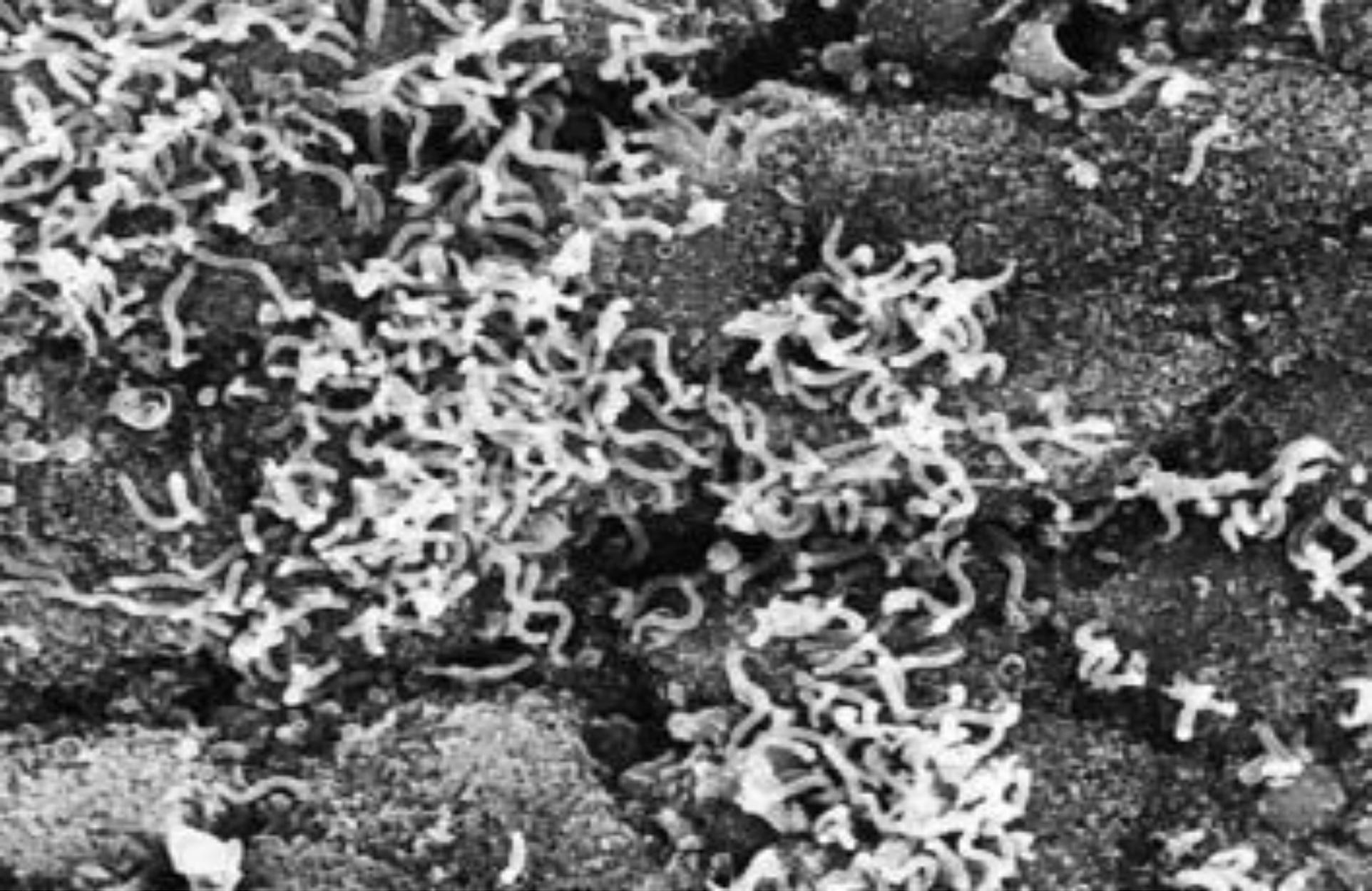
| Возбудитель | Ген | Соединение (свойство) | Механизм приобретения | Заболевание |
|--|--------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> (Энтерогеморрагический вариант ЕНЕС) | <i>slt</i> | Шигоподобные токсины | Перенос фага | Энтерогеморрагический колит |
| | <i>e-hly</i> | Гемолизин ЕНЕС | Перенос плазмиды | Синдром гемолитической уремии |
| <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>Enteritidis</i> фаготип 4 | <i>aer</i> | Аэробактин | Перенос плазмиды | Кишечная инфекция |
| <i>Vibrio cholerae</i> O139 | <i>rfb</i> | O-антиген O139 | Перенос хромосомных генов | Холера |

| | | | | |
|-----------------------------------|--------------|------------------------------|---|-------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>tss</i> | Токсины токсического шока | Перенос фага | Синдром токсического шока |
| | <i>mecA</i> | Устойчивость метициллину | Перенос хромосомных генов | Внутрибольничные инфекции |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | <i>speA</i> | Суперантиген | Перенос фага | Синдромы токсического шока |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | <i>rpoB</i> | Устойчивость рифампицину | Точковые мутации в гене РНК- полимеразы | Туберкулез |
| <i>Enterococcus pneumoniae</i> | <i>pbp2b</i> | Устойчивость пенициллину | Перенос хромосомных генов | Пневмония |

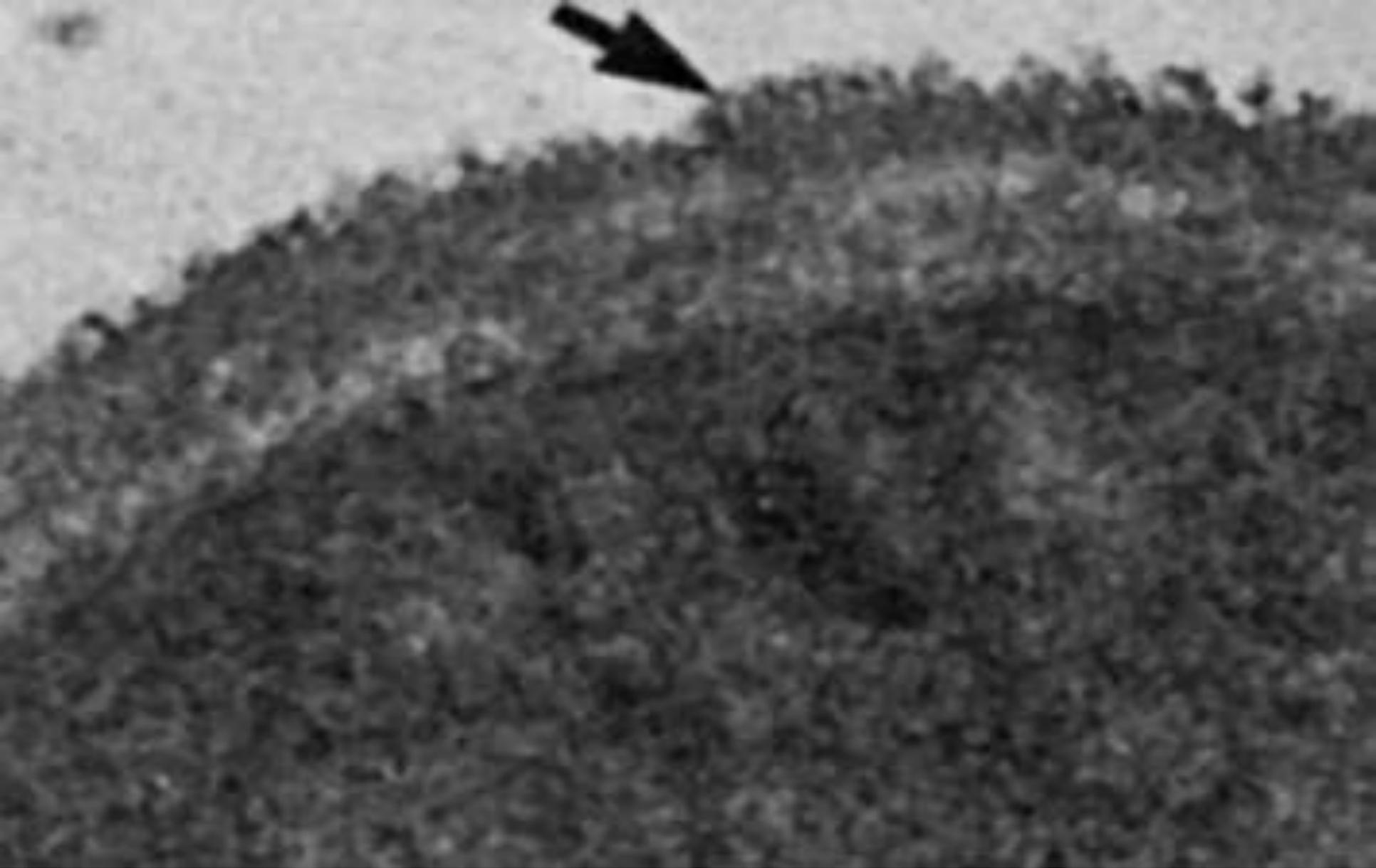


Transmission
electron
micrograph of
fimbriated
*Escherichia
coli* (x16,625)

Факторы адгезии: Фимбрии (на поверхности), Гликокаликс или капсула (ингибирует фагоцитоз, увеличивает адгезию), Пили (передача наследственного материала), Тейхоевые кислоты (грам+, увеличивают адгезию).



Scanning electron micrograph of epithelial cells with adhering vibrios (x1,200).



Candida albicans fimbriae (arrow) are used to attach the fungus to vaginal epithelial cells.

Рост бактериальных патогенов



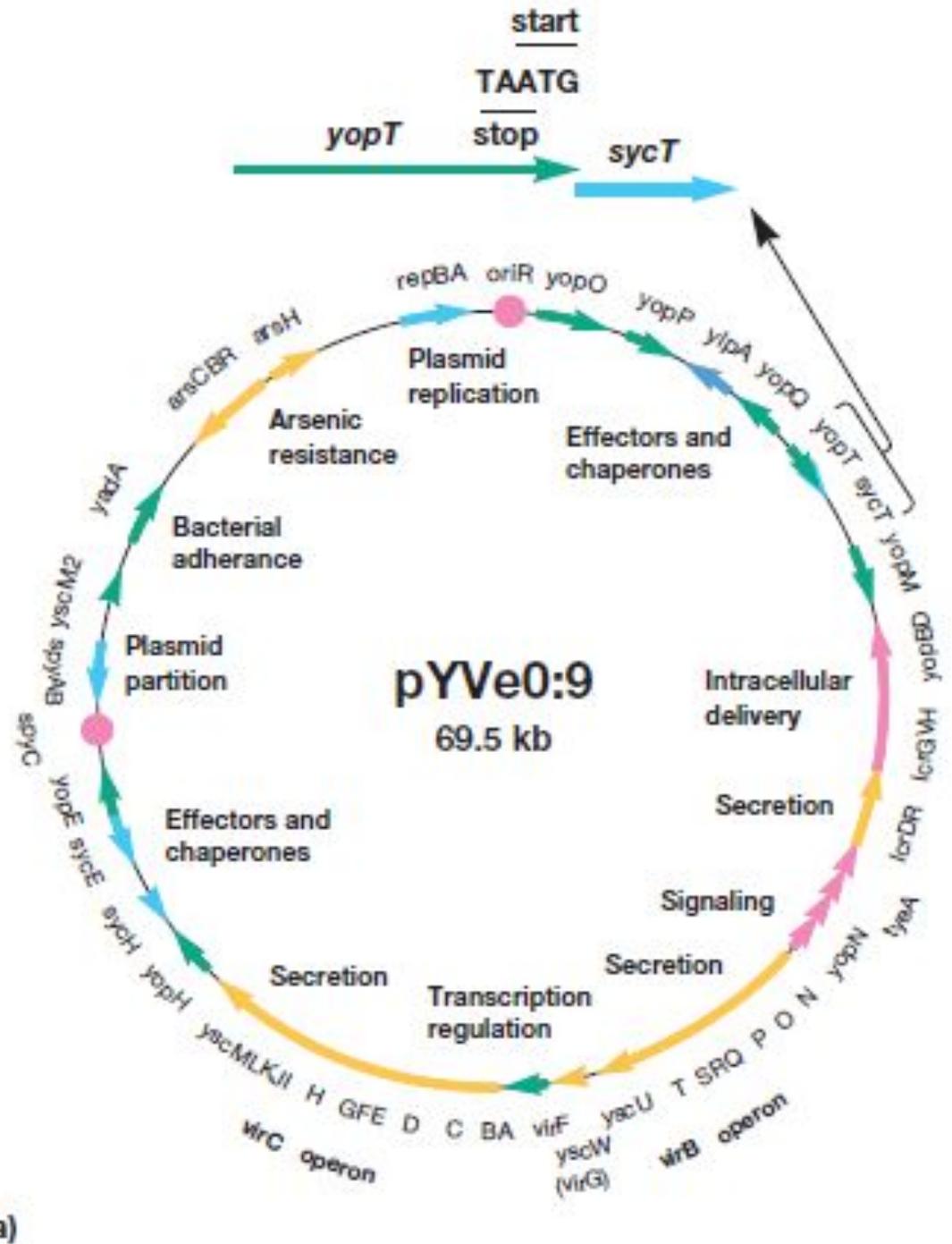
- Облигатные и факультативные внутриклеточные патогены).
- *Brucella abortus* - ФВП (внутри макрофагов, нейтрофилов и трофобластов), можно вырастить в чистой культуре.
- ОВП - (вирусы и рикеттсии) не возможно вырастить вне клетки хозяина.
- Регуляция вирулентности.
- *Дифтерийный токсин Corynebacterium diphtheriae* переносится умеренным фагом и его экспрессия регулируется содержанием железа. Токсин *Bordetella pertussis* (вызывает судорожный кашель) экспрессируется при 37С. Холерный токсин (*Vibrio cholerae*) переносится фагом.

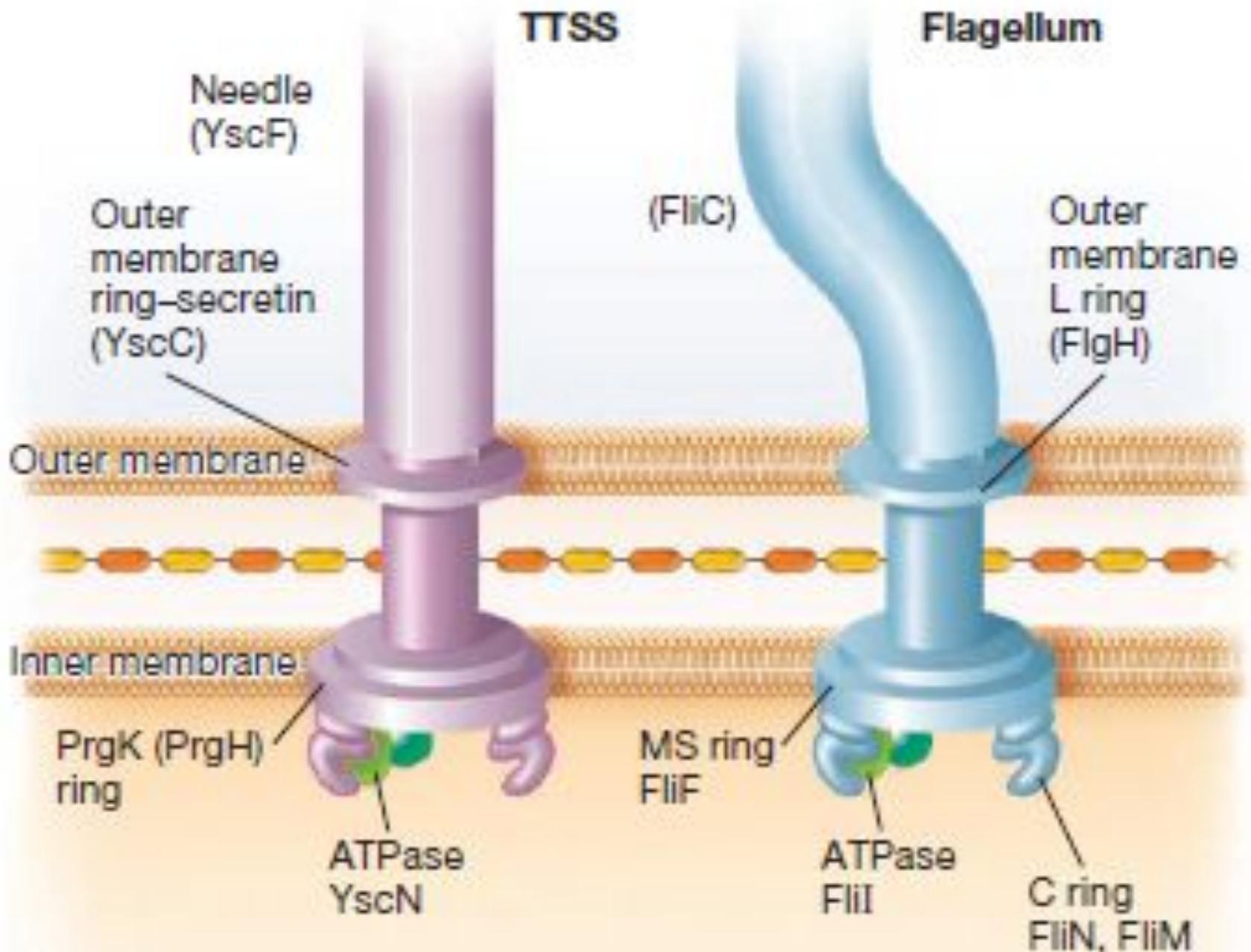
Островки патогенности



- Гены вирулентности часто организуются в «островки вирулентности».
- Пример – гены кодирующие синтез специфических белков *Yersinia pestis* (бубонная чума) и *Yersinia enterocolitica* (гастроэнтерит). У них кодируются белки инжектисомы и некоторые другие.
- Инжектисома состоит из базального тела (схожее со жгутиком, включает много схожих субъединиц) и иглы.

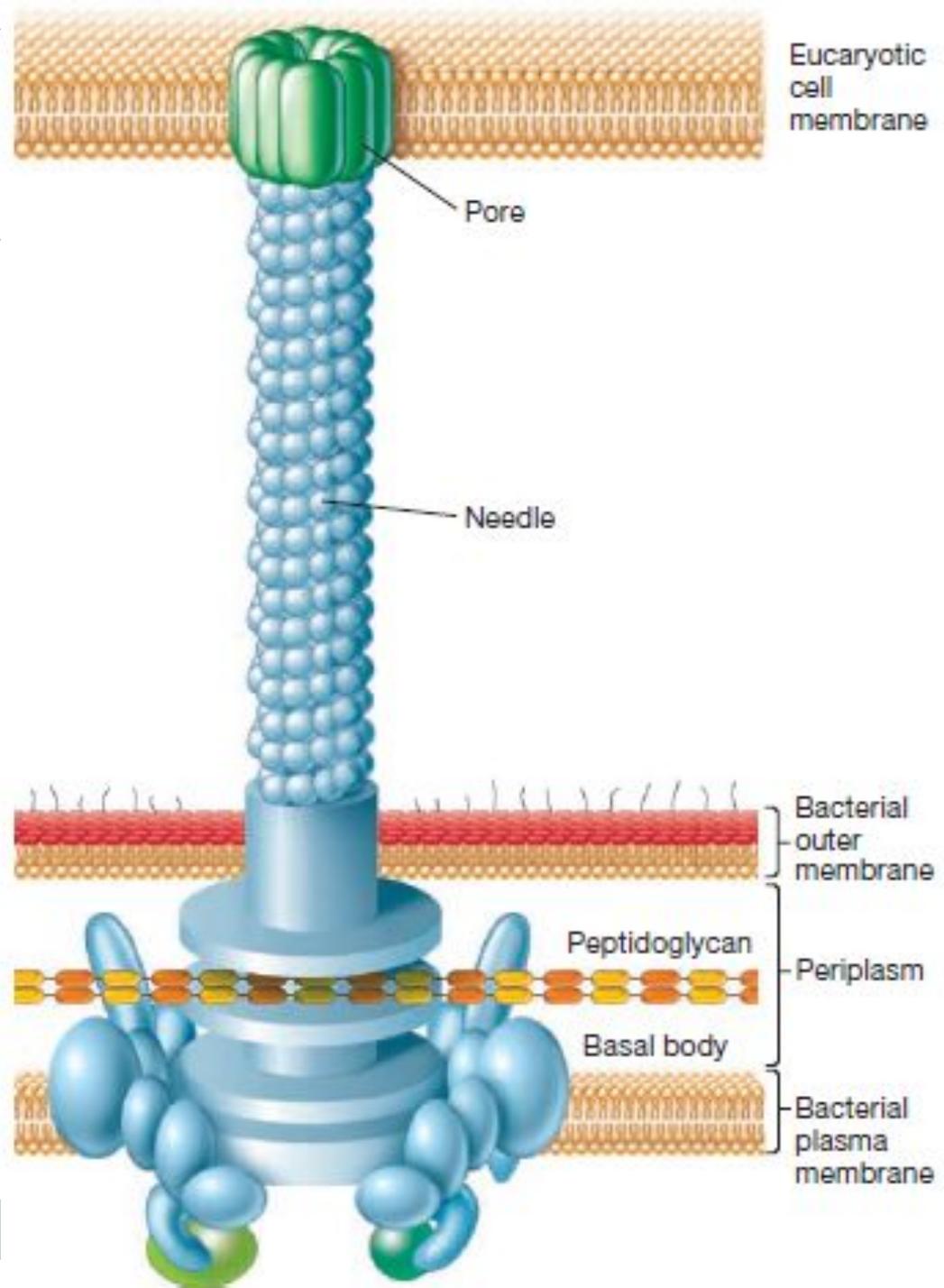
The type III secretion system (TTSS) and other virulence genes of *Yersinia* are encoded on the pYV plasmid. The TTSS genes encoding the *Yersinia* outer proteins (Yop) are homologous to many of the genes encoding flagellar proteins.

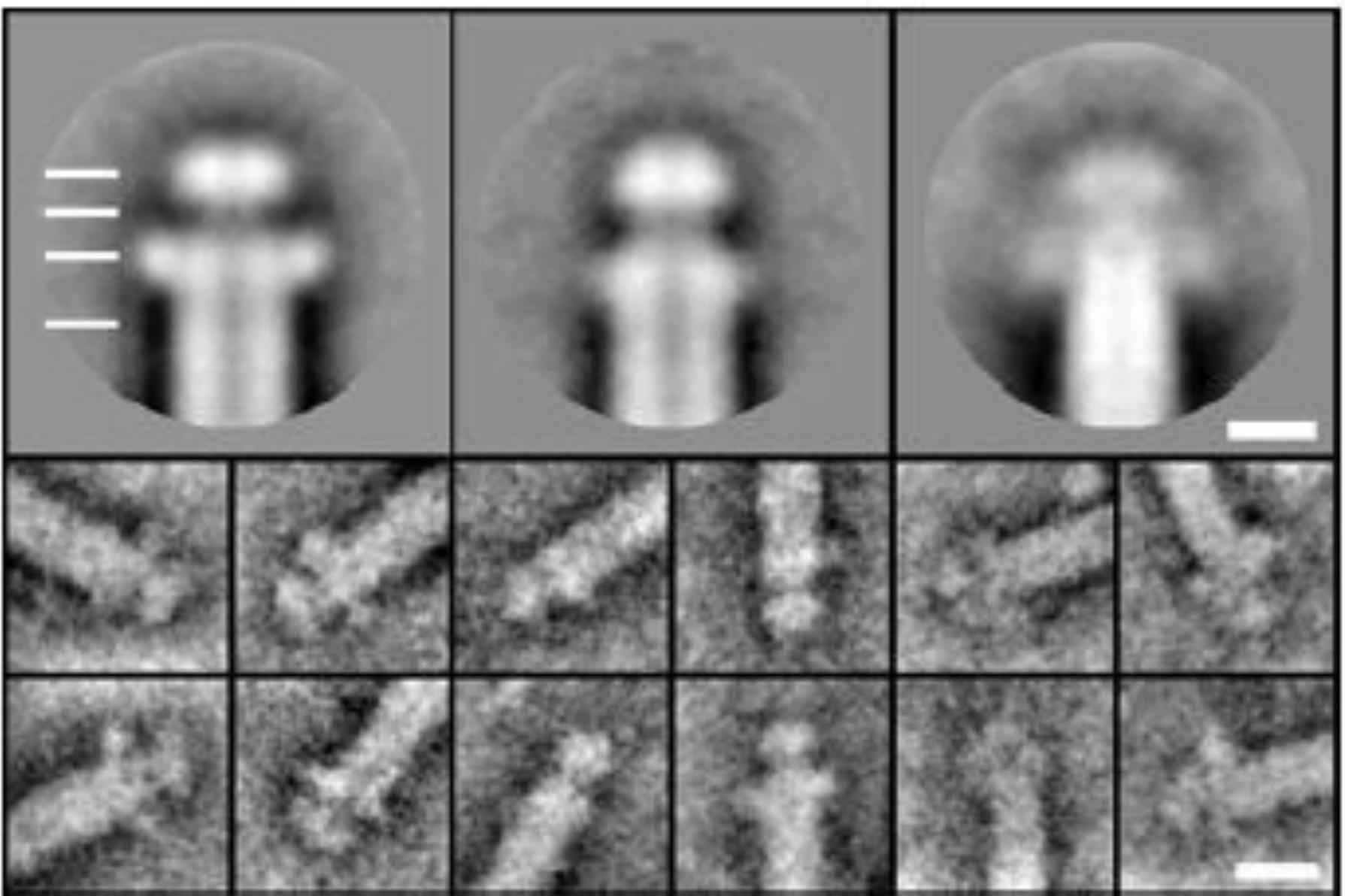




Both the TTSS injectisome and the flagella are anchored in the plasma membrane by similar basal body structures.

X-ray fiber diffraction
resolves the
injectisome as a
helical structure





Scanning tunneling electron microscopy reveals the injectisome tip, indicating how it may lock into the translocator pore on the target cell

Островки патогенности



- Инжектисома работает как АТФаза, перенося белки патогена через пору.
- «Островки патогенности» усиливают вирулентность и отсутствуют у непатогенных видов, у энтеропатогенных *E. coli* присутствуют гены, которых нет у комменсалистической формы.
- Патоген: инфекции (рост патогена и патологические изменения тканей) и интоксикации.

Токсичность

Токсины: Экзотоксины, АВ-токсины, специфические экзотоксины, мембран-разрушающие токсины, суперантигены, Эндотоксины.

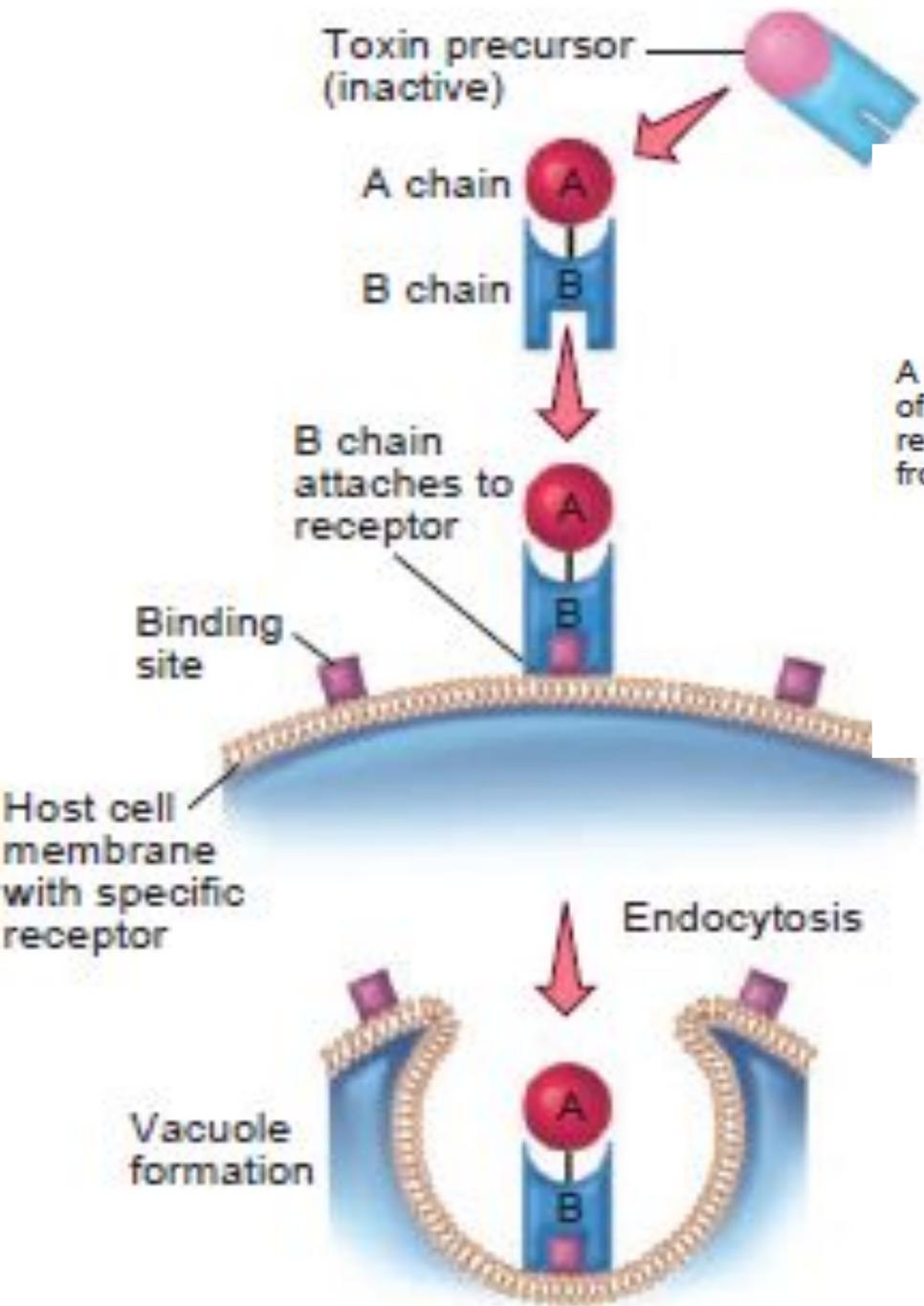


| Characteristic | Exotoxins | Endotoxins |
|----------------------|---|--|
| Chemical composition | Protein, often with two components (A and B) | Lipopolysaccharide complex on outer membrane; lipid A portion is toxic |
| Disease examples | Botulism, diphtheria, tetanus | Gram-negative infections, meningococemia |
| Effect on host | Highly variable between different toxins | Similar for all endotoxins |
| Fever | Usually do not produce fever | Produce fever by induction of interleukin-1 and TNF |
| Genetics | Frequently carried by extrachromosomal genes such as plasmids | Synthesized directly by chromosomal genes |
| Heat stability | Most are heat sensitive and inactivated at 60-80°C | Heat stable to 250°C |
| Immune response | Antitoxins provide host immunity; highly antigenic | Weakly immunogenic; immunogenicity associated with polysaccharide |
| Location | Usually excreted outside the living cell | Part of outer membrane of gram-negative bacteria |
| Production | Produced by both gram-positive and gram-negative bacteria | Found only in gram-negative bacteria; Released on bacterial death and some liberated during growth |
| Toxicity | Highly toxic and fatal in nanogram quantities | Less potent and less specific than exotoxin; causes septic shock |
| Toxoid production | Converted to antigenic, nontoxic toxoids; toxoids are used to immunize (e.g., tetanus toxoid) | Toxoids cannot be made |

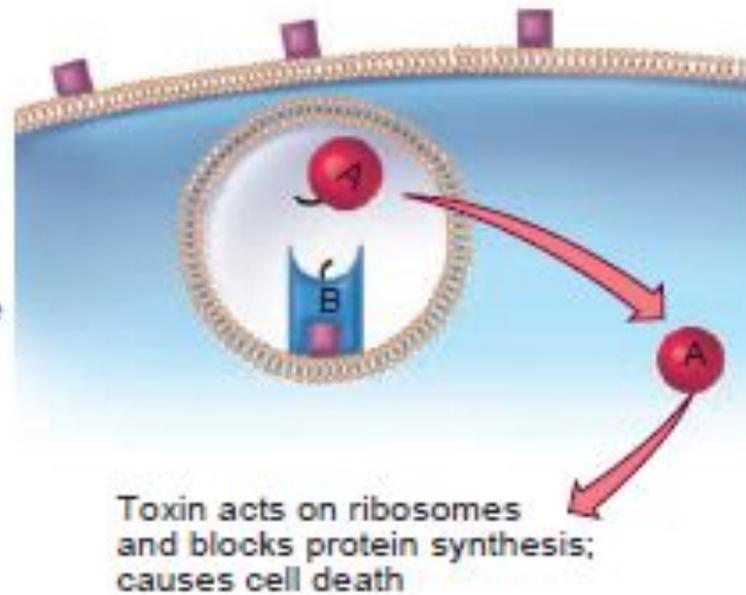
ЭКЗОТОКСИНЫ

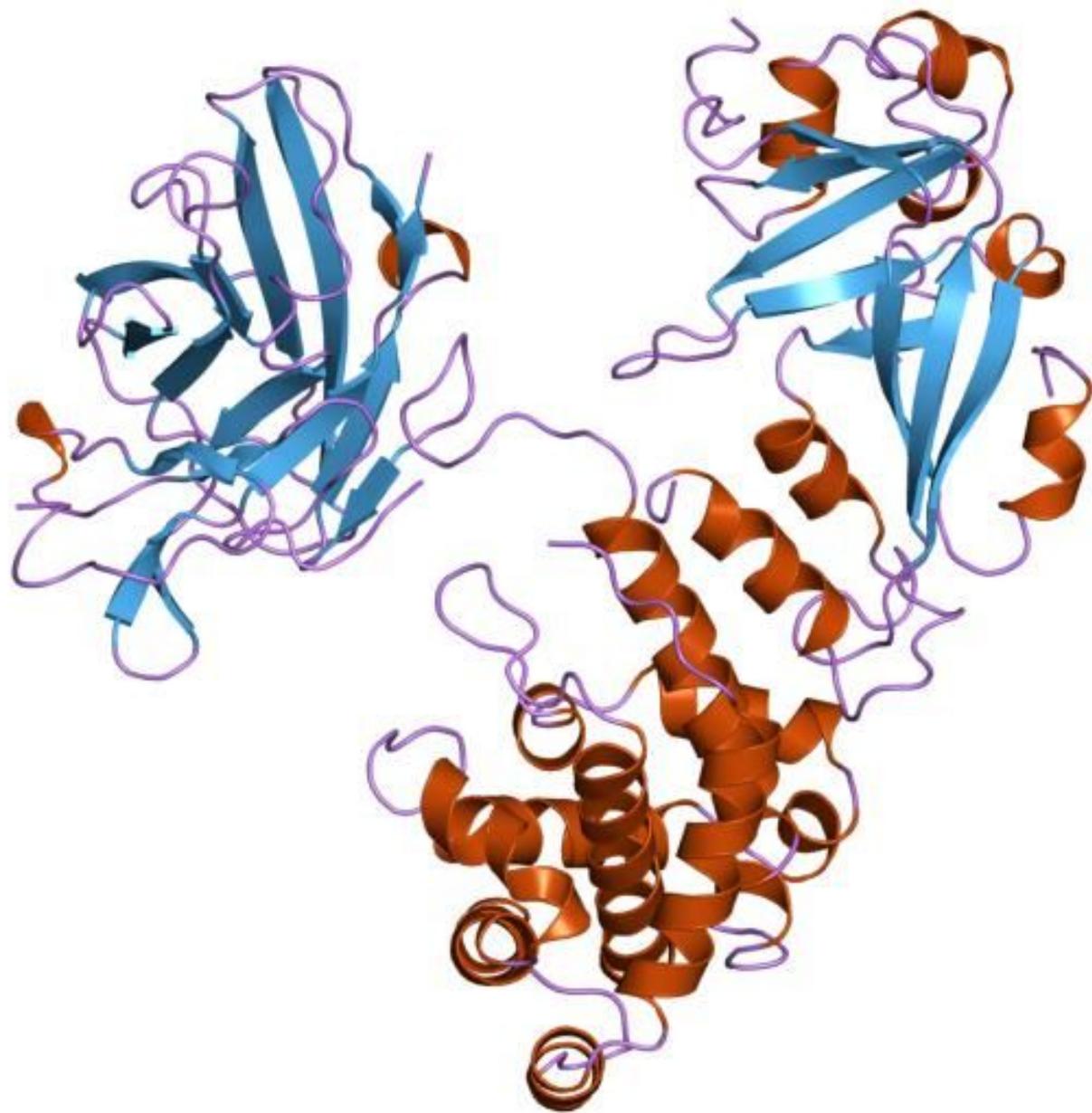


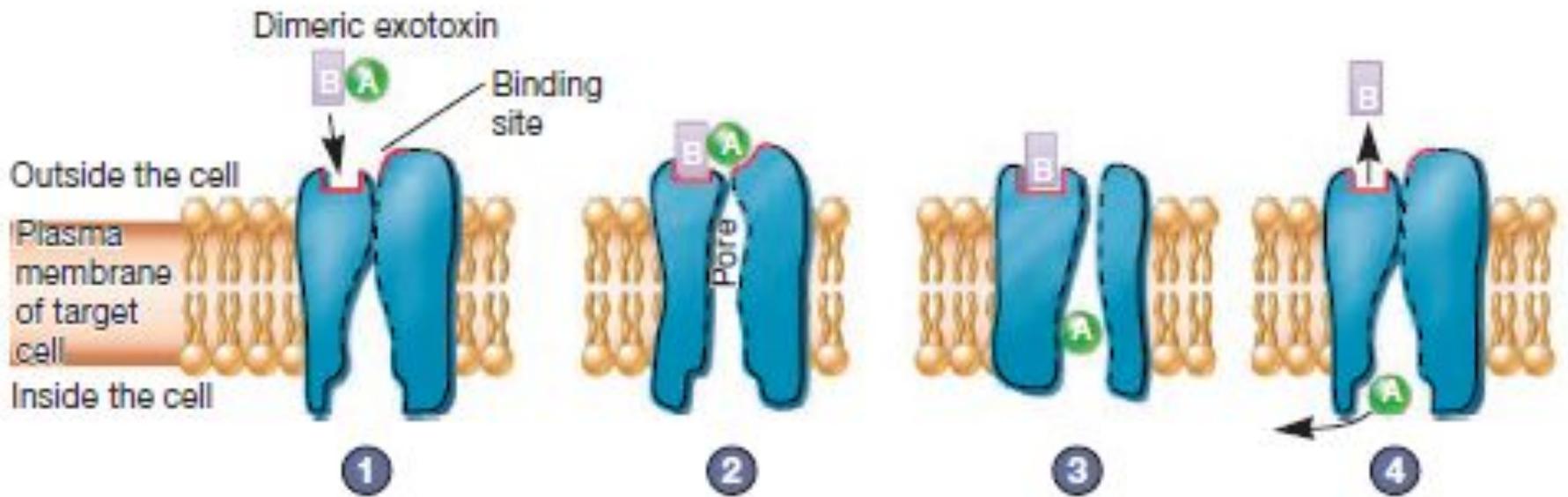
- Экзотоксины. Растворимые, термолабильные белки, чаще грамположительных бактерий. Наиболее опасные вещества.
- АВ-токсины. 2 компонента: ферментная субъединица А и транспортная В. Один из механизмов проникновения А в клетку – В создает пору через которую проникает А.
- *Пример дифтерийный токсин: В связывается с клеточным рецептором, образуя пузырек, А входит в пузырек, А и В разъединяются и токсин попадает в клетку. Перенос АДФ-рибозы на EF2фактор транскрипции, что ведет к прекращению синтеза белка.*

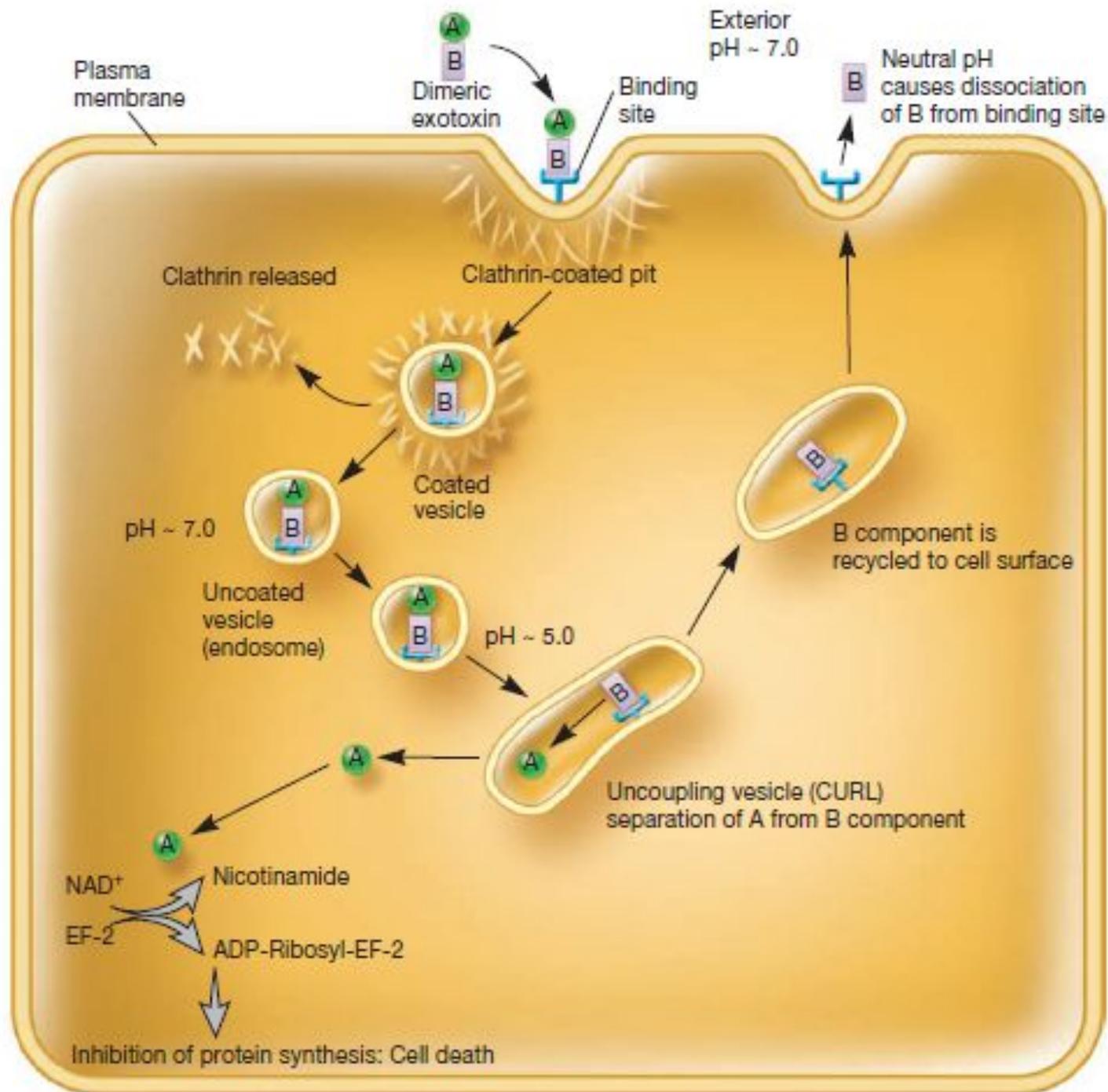


A portion of toxin is released from vacuole









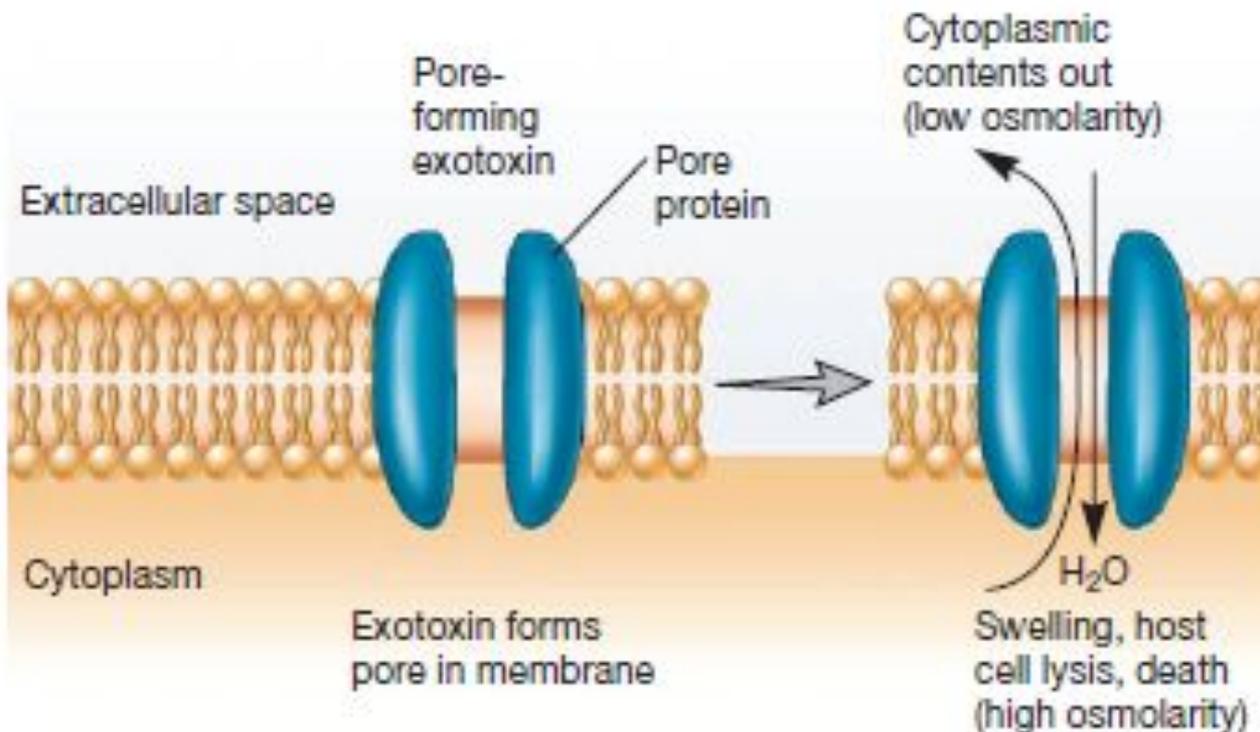
Экзотоксины



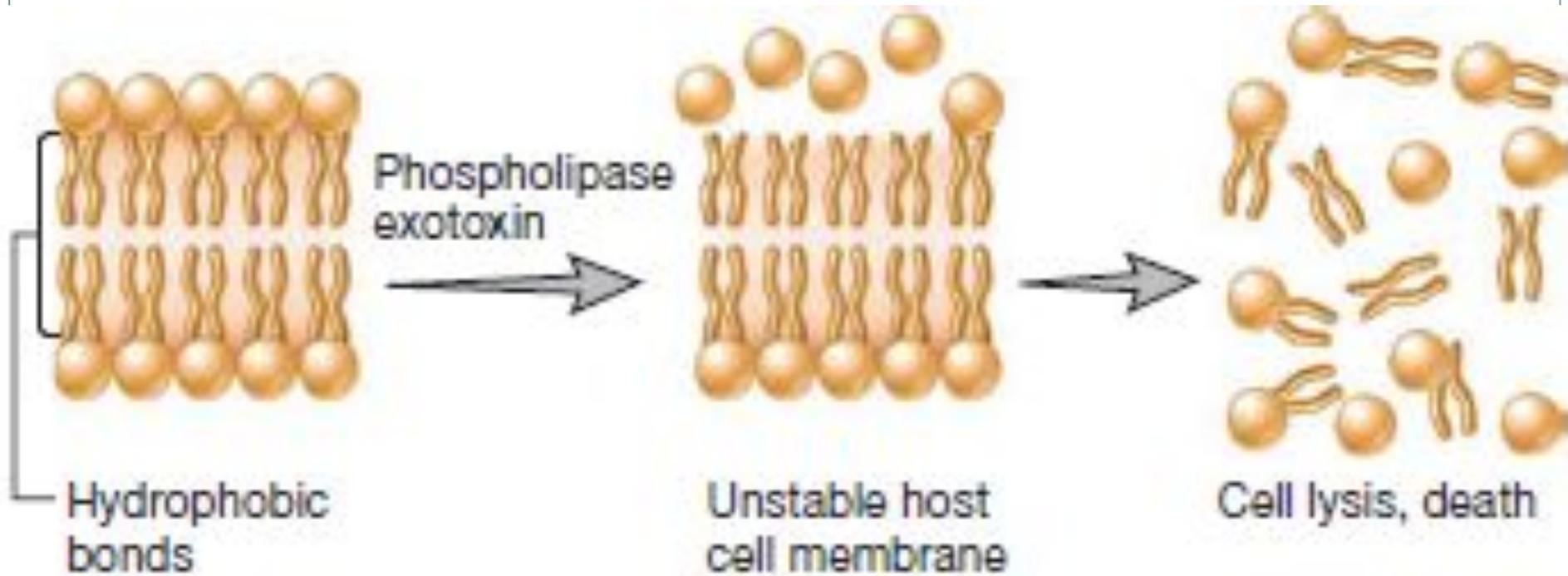
Специфические экзотоксины.

Нейротоксины (ботулотоксин, *Bacillus cereus*),
энтеротоксины (холерный токсин), цитотоксины.

Мембрана-разрушающие экзотоксины.



A channel-forming type of exotoxin inserts itself into the normal host cell membrane and makes an open channel. Formation of multiple pores causes cytoplasmic contents to leave the cell and water to move in, leading to cellular lysis and death of the host cell.



A phospholipid-hydrolyzing phospholipase exotoxin destroys membrane integrity. The exotoxin removes the charged polar head groups from the phospholipid part of the host cell membrane. This destabilizes the membrane and causes the host cell to lyse.

ЭКЗОТОКСИНЫ



- Суперантигены. Бактериальные и вирусные белки, провоцирующие выброс цитокинов у части Т-клеток.
- Выброс цитокинов провоцирует повреждение эндотелия, шок и нарушение работы внутренних органов.
- *Пример: Стафилококковый энтеротоксин В проявляет активность в нанограммах.*

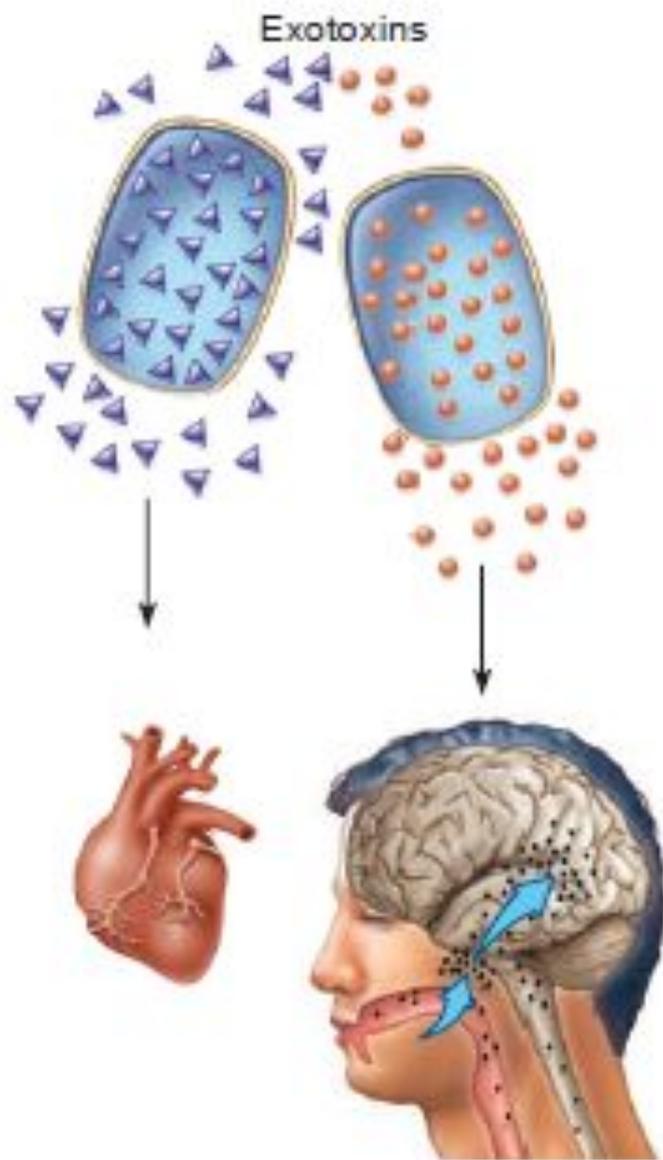
| Toxin | Organism | Gene Location | Subunit Structure | Target Cell Receptor | Enzymatic Activity | Biologic Effects |
|---|------------------------------------|---------------|---|---|--|--|
| Anthrax toxins | <i>Bacillus anthracis</i> | Plasmid | Three separate proteins (EF, LF, PA) ^a | Capillary morphogenesis protein 2 (CMP-2) and tumor endothelium marker 8 (TEM8) | EF is a calmodulin-dependent adenylate cyclase; LF is a zinc-dependent protease that cleaves a host signal transduction molecule (MAPKK) | EF + PA: increase in target cell cAMP level, localized edema; LF + PA: altered cell signaling; death of target cells |
| <i>Bordetella</i> adenylate cyclase toxin | <i>Bordetella</i> spp. | Chromosomal | A-B ^b | CR3 integrin (CD11-CD18) | Calmodulin-activated adenylate cyclase | Increase in target cell cAMP level; decrease ATP production; modified cell function or cell death |
| Botulinum toxin | <i>Clostridium botulinum</i> | Phage | A-B ^c | Synaptic vesicle 2 (SV2) | Zinc-dependent endoprotease cleavage of presynaptic protein (SNARE) | Decrease in peripheral, presynaptic acetylcholine release; flaccid paralysis |
| Cholera toxin | <i>Vibrio cholera</i> | Phage | A-5B ^d | Ganglioside (GM ₁) | ADP ribosylation of adenylate cyclase regulatory protein, G _s | Activation of adenylate cyclase, increase in cAMP level; secretory diarrhea |
| Diphtheria toxin | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | Phage | A-B ^e | Heparin-binding, EGF-like growth factor precursor | ADP ribosylation of elongation factor 2 | Inhibition of protein synthesis; cell death |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|---|-------------|---------------------------------------|--|--|---|
| Heat-labile enterotoxins ^f | <i>E. coli</i> | Plasmid | Similar or Identical to Cholera Toxin | | | |
| Pertussis toxin | <i>Bordetella pertussis</i> | Chromosomal | A-5B ^g | Asparagine-linked oligosaccharide and lactosylceramide sequences | ADP ribosylation of signal-transducing G proteins | Block of signal transduction mediated by target G proteins |
| <i>Pseudomonas</i> exotoxin A | <i>P. aeruginosa</i> | Chromosomal | A-B | α_2 -Macroglobulin/LDL receptor | — Similar or Identical to Diphtheria Toxin — | |
| Shiga toxin | <i>Shigella dysenteriae</i> | Chromosomal | A-5B ^h | Globotriaosylceramide (Gb ₃) | RNA <i>N</i> -glycosidase | Inhibition of protein synthesis, cell death |
| Shiga-like toxin 1 | <i>Shigella</i> spp., <i>E. coli</i> | Phage | Similar or Identical to Shiga Toxin | | | |
| Tetanus toxin | <i>C. tetani</i> | Plasmid | A-B ^c | Ganglioside (GT ₁ and/or GD _{1b}) | Zinc-dependent endopeptidase cleavage of synaptobrevin | Decrease in neurotransmitter release from inhibitory neurons; spastic paralysis |

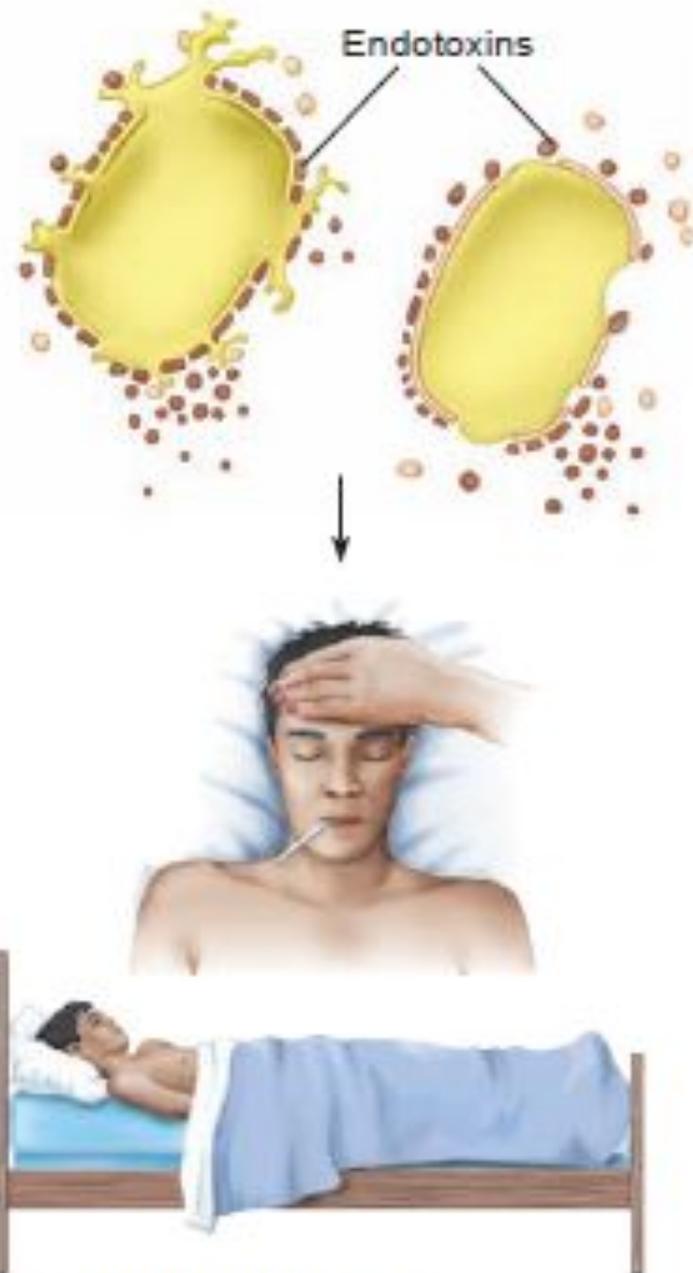
ЭНДОТОКСИНЫ



- Грам- бактерии в составе внешней мембраны имеют липополисахариды, которые могут быть токсичными для хозяина.
- Свойства: Термостабильность, Токсичность (нанограммы), слабая иммуногенность, общие эффекты (жар, шок, свертывание крови, воспаление, гемморагия, фибринолиз).



(a) Target organs are damaged; heart, muscles, blood cells, intestinal tract show dysfunctions.



(b) General physiological effects—fever, malaise, aches, shock

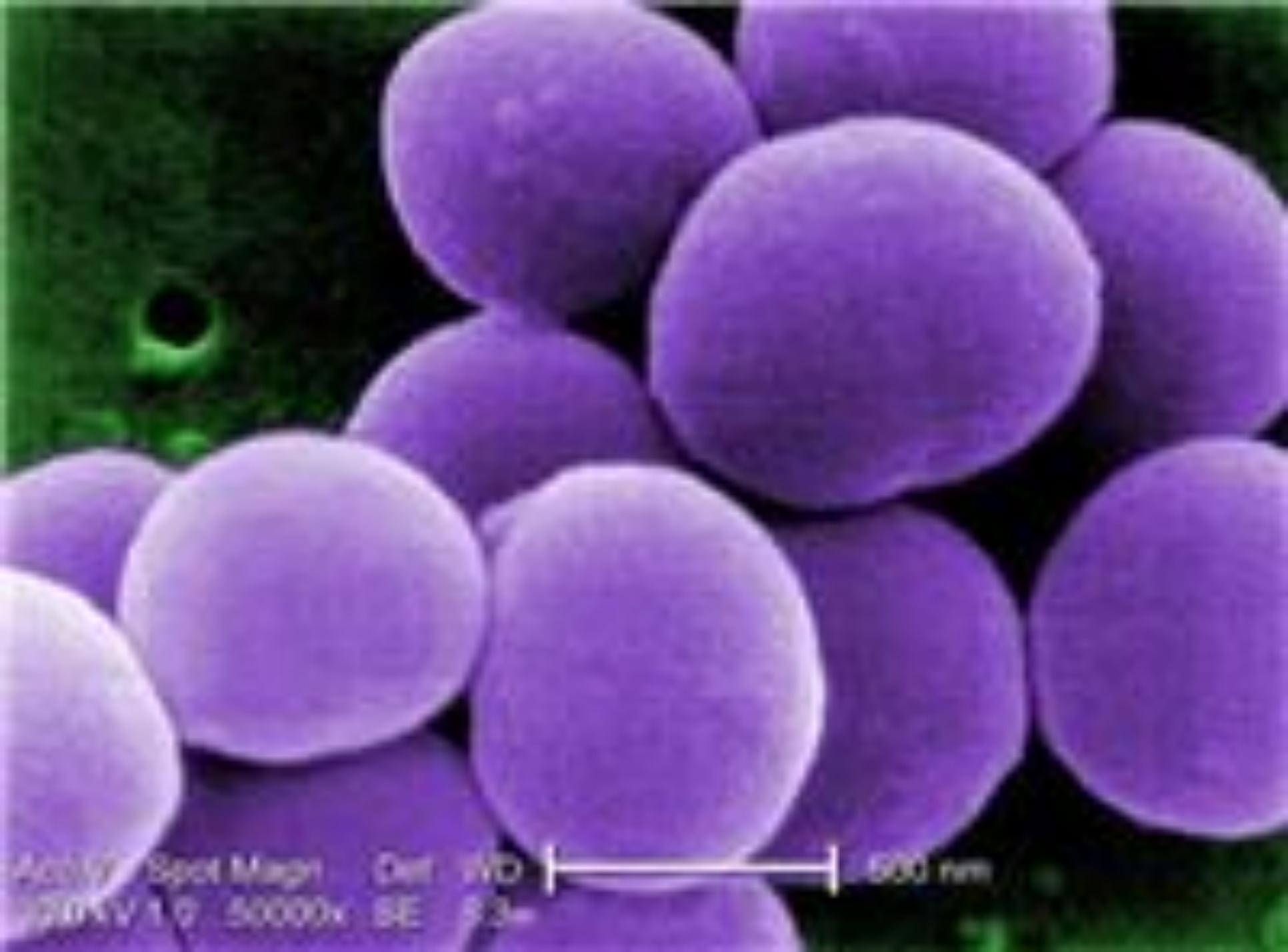
| Характеристика | Экзотоксины | Эндотоксины |
|---------------------|--|---|
| Химический состав | Белки, часто двухкомпонентные (А+В) | Липополисахаридные комплексы внешней мембраны |
| Примеры заболеваний | Ботулизм, столбняк, дифтерия, | Грамм-отрицательные инфекции, менингококкцемия. |
| Эффекты | Очень разнообразны | Общие для всех эндотоксинов |
| Лихорадка | Обычно нет | Есть, причина – индукция интерлейкина-1 и ФНО. |
| Генетика | Часто переносятся внехромосомными факторами, например плазмидами | Синтезируются генами бактерий |
| Термостабильность | Чувствительны к нагреванию, инактивируются при 60-80 °С | Стабильны при нагревании до 250 °С |

| | | |
|--------------------|--|---|
| Иммунный ответ | Иммунитет обеспечивается антитоксинами, высокоантигенны | Слабоантигенны |
| Локализация | Экскретируются из живых клеток | Часть мембран грам-бактерий |
| Продукция | Продуцируются грам+ и грам- бактериями | Обнаружены только в грам- бактериях, выделяются при гибели клеток |
| Токсичность | Высокотоксичны, смертельны в количестве нанограм | Менее токсичны и менее специфичны, могут вызывать септический шок |
| Получение токсидов | Изменением структуры, сохранение антигенных свойств с утратой токсичности, можно использовать для иммунизации (противостолбнячная сыворотка) | Невозможно получить токсиды |

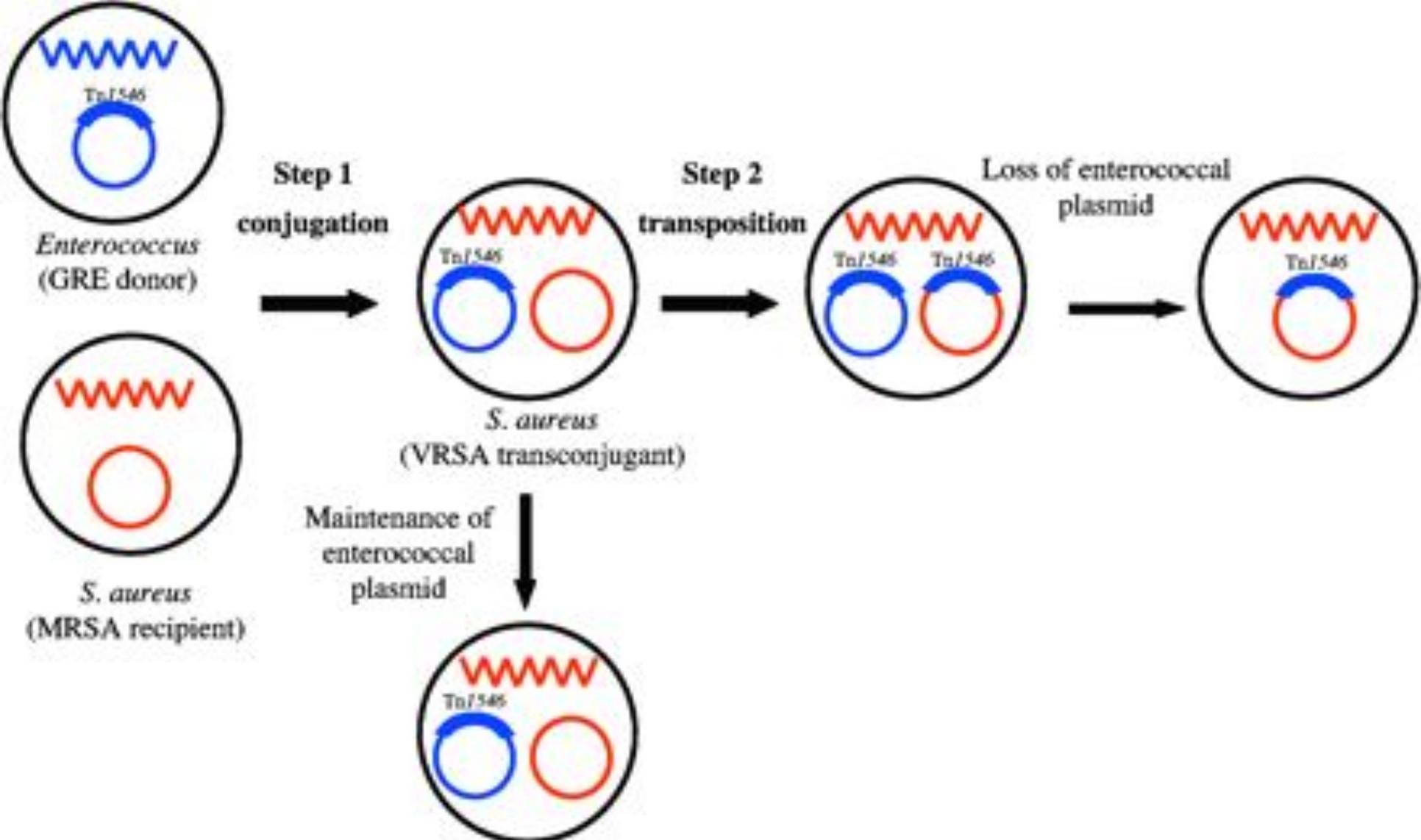
Устойчивость к антибиотикам.



- В 2002 в США отмечено появление *Staphylococcus aureus* устойчивого к метициллину (MRSA) и ванкомицину (VRSA), нечувствительного также к ципрофлоксацину, метициллину, пенициллину.
- Энтерококки в результате конъюгации передали ген устойчивости стрептококку.



4000V Spot Magn Det W/D
10.0kV 1.0 50000x SE 5.3 500 nm



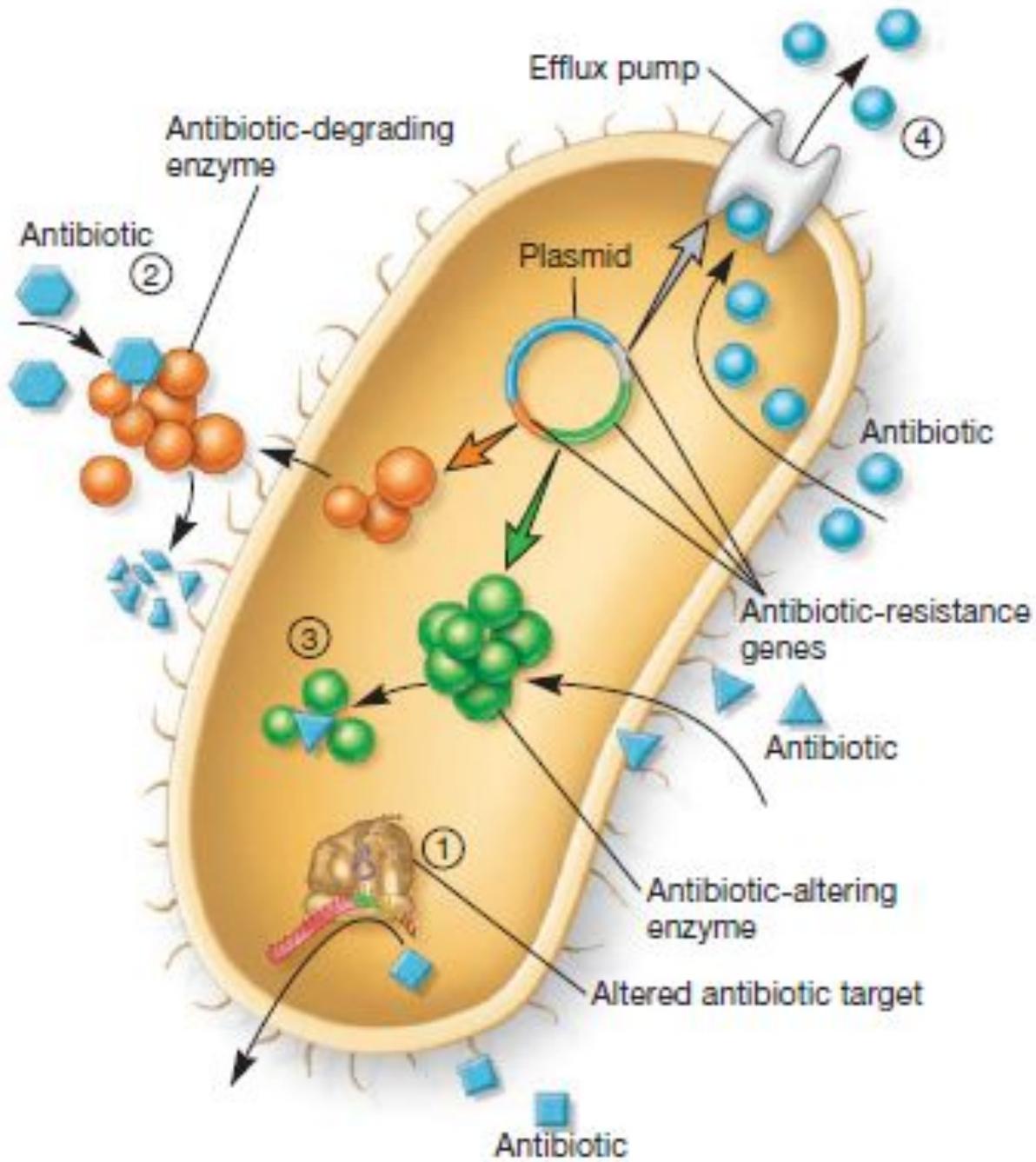
Устойчивость к антибиотикам



3. Химическая модификация. Пример – разрезание пенициллиназой бета-лактамного кольца.
4. Изменение чувствительности мишени антибиотика. Пример – изменение 23S субъединицы РНК, фермент метаболизма парабензойной кислоты с низкой аффинностью к сульфаниламидам.
5. Изменение метаболических путей.

Защита патогенов

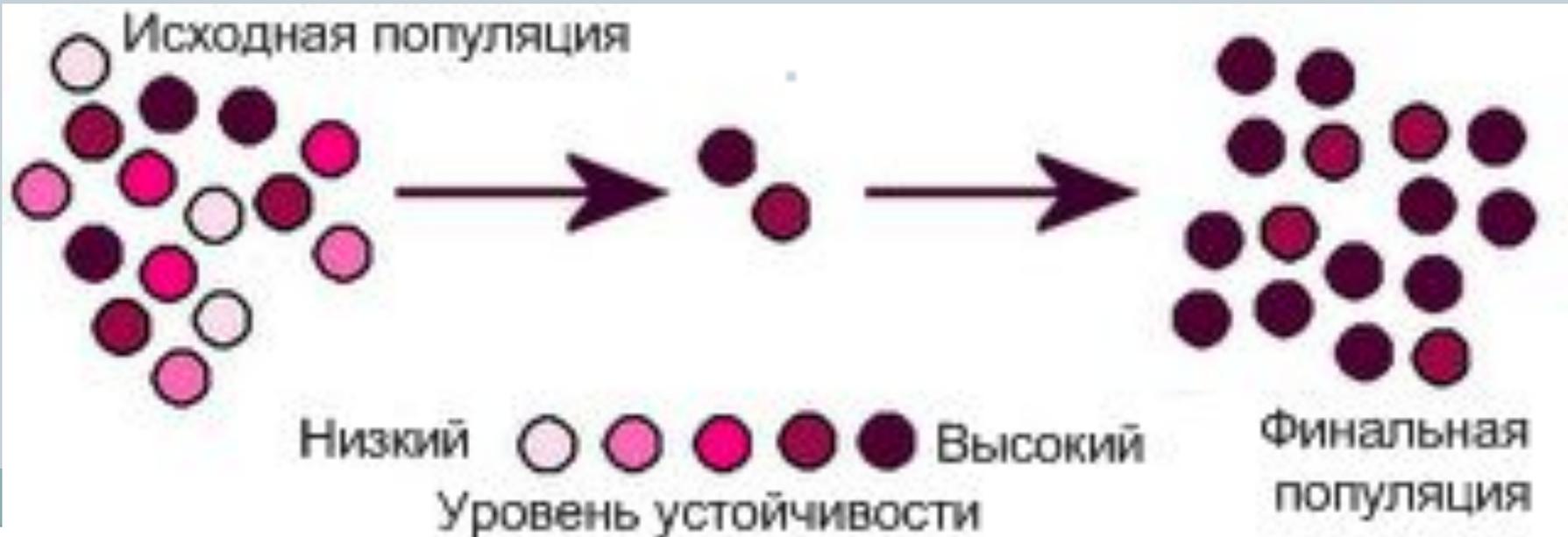
- 1. Предотвращение доступа.
- 2. Разрушение антибиотика.
- 3. Модификация антибиотика.
- 4. Выделение антибиотика.

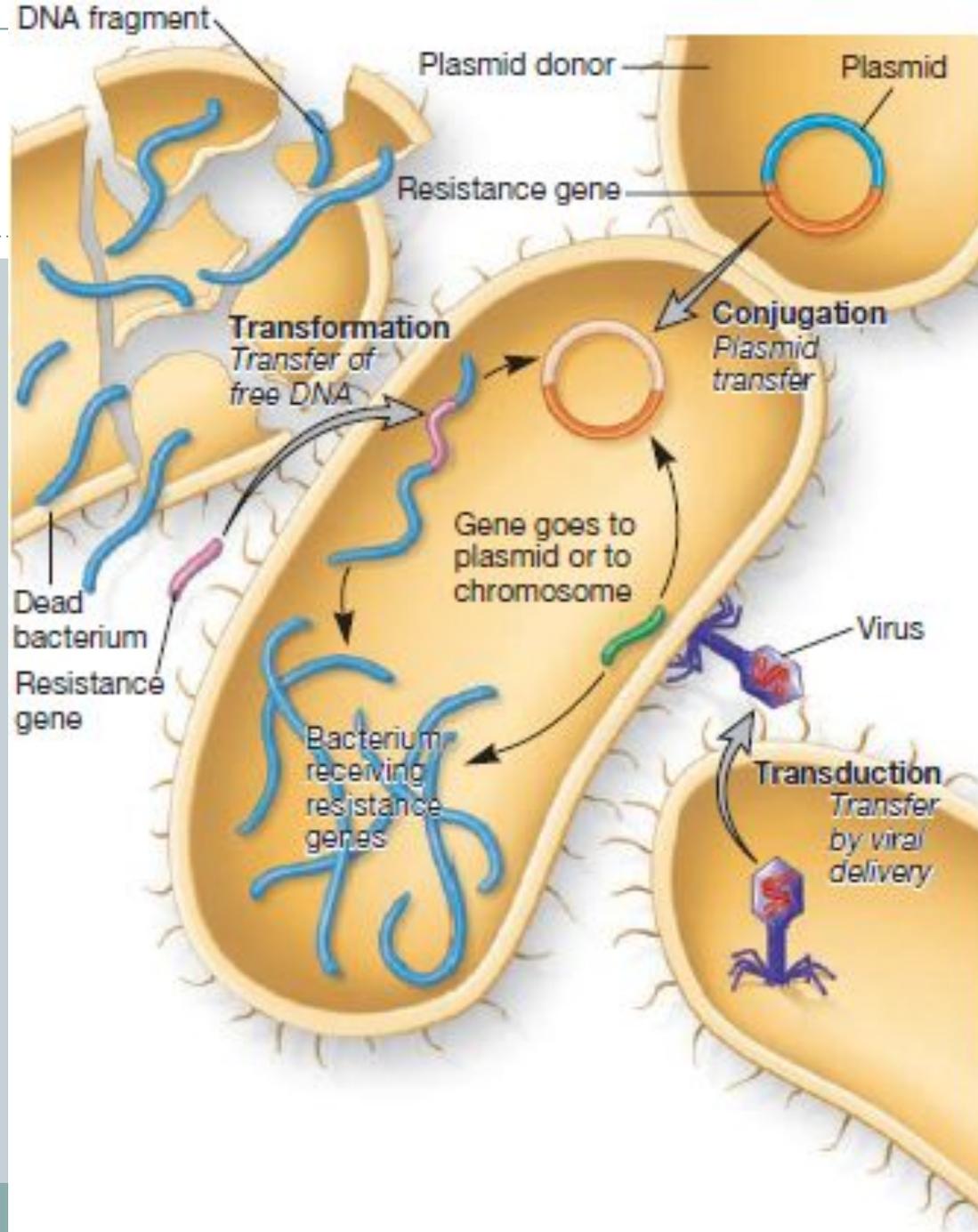


Происхождение и перенос устойчивости



Основной источник – спонтанные мутации в бактериальной хромосоме. Перенос R-плазмидами, возможен перенос нескольких генов одновременно. Гены устойчивости могут быть локализованы в других элементах. Многие транспозоны переносят такие гены, часто ассоциированные группы генов. Интегрон: интегральный ген + группа генов чувствительности.





Устойчивость к антибиотикам



Повсеместное использование антибиотиков и перенос генов, способствует развитию устойчивых форм патогенов.

Противодействие:

-использование больших доз для уничтожения чувствительных бактерий и большинства спонтанных мутантов;

-использование 2-3 средств;

-использование антибиотиков широкого спектра только при крайней необходимости.

Устойчивость к антибиотикам

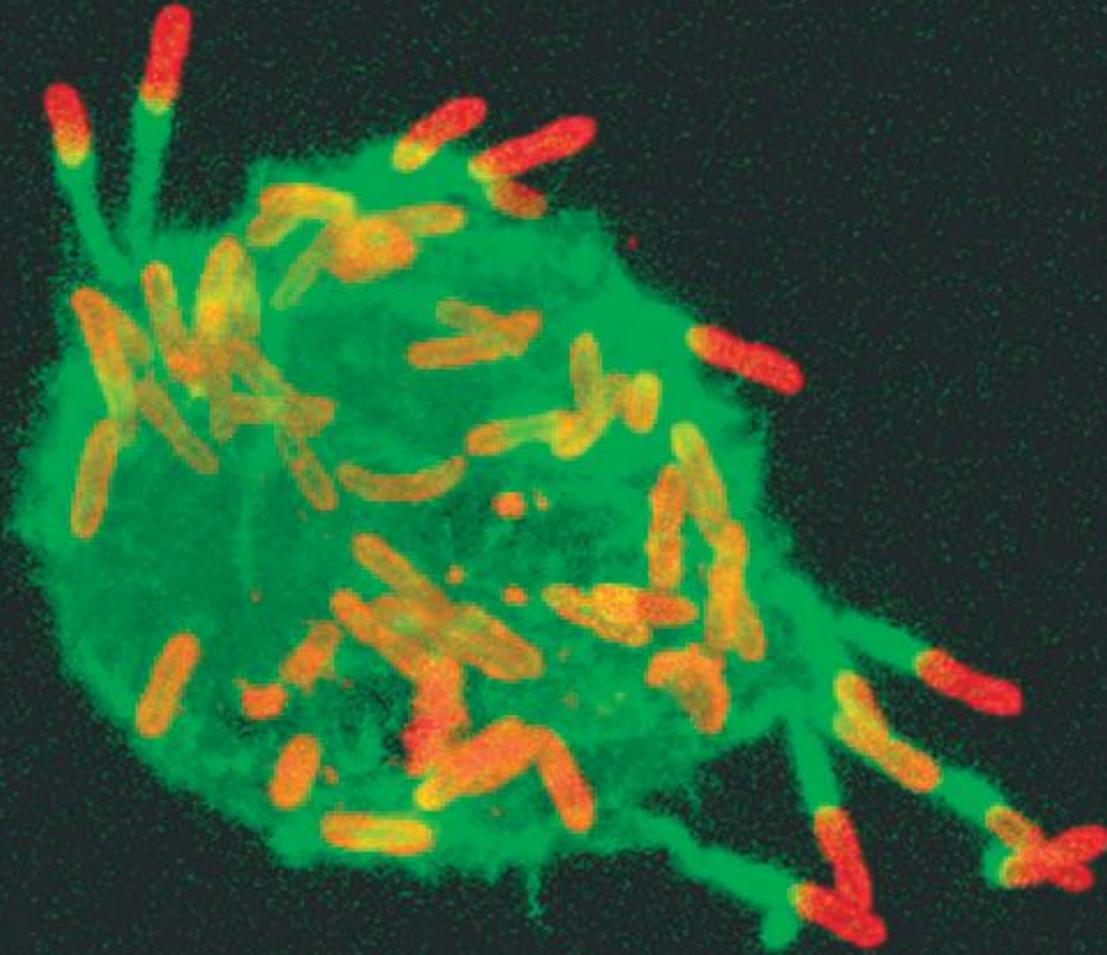


Ситуация продолжает ухудшаться, ведется поиск новых антимикробных средств, моделирование исходя из трехмерных моделей молекул-мишеней.

Сиквенс и анализ геномов патогенов помогает находить новые цели. Перспективны исследования бактериофагов.



Transmission electron micrograph of *Listeria monocytogenes* in a host macrophage. The bacterium has polymerized host actin into a long tail that it uses for intracellular propulsion and to move from one host cell to another.



Burkholderia pseudomallei (stained red) also forms actin tails (stained dark green) as shown in this confocal micrograph. Note that the actin tails enable the bacterial cells to be propelled out of the host cell.

Постулаты Коха



1. Микроорганизм постоянно встречается в организме больных людей (или животных) и отсутствует у здоровых;
2. Микроорганизм должен быть изолирован от больного человека или животного и его штамм должен быть выращен в чистой культуре;
3. При заражении чистой культурой микроорганизма здоровый человек (или животное) заболевает;
4. Микроорганизм должен быть повторно изолирован от экспериментально заражённого животного или человека.

