ПАТОГЕННОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ

Триада Генле-Коха:

Ф.Генле разработал, а выдающийся немецкий микробиолог Р.Кох затем четко сформулировал получившую название триаду Генле—Коха, по которой можно судить об *этиологической роли микроба* в возникновении болезни:

- 1) **Микроб-возбудитель должен обнаруживаться во всех случаях данного заболевания и не встречаться ни у здоровых, ни у больных другими заболеваниями.**
- **2) микроб-возбудитель должен быть выделен из организма больного в чистой культуре**
- **3) чистая культура выделенного микроба должна вызывать то же заболевание у восприимчивых животных.**

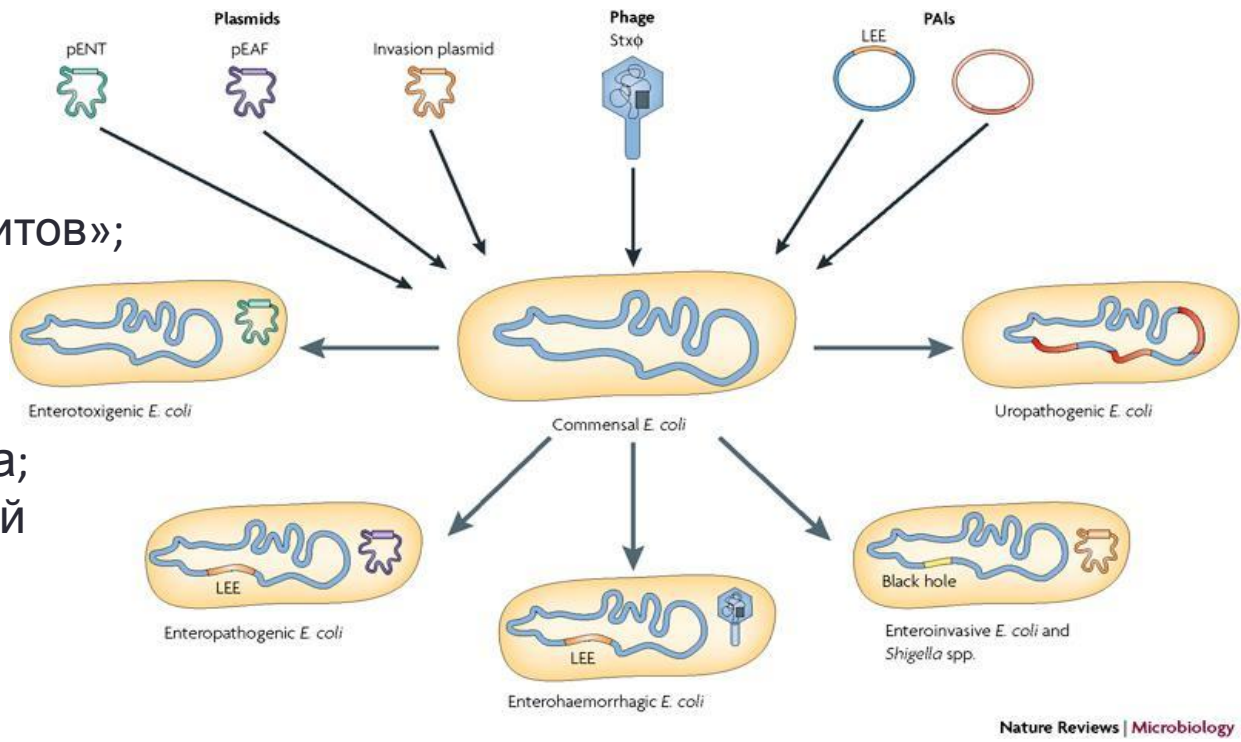
- В настоящее время эта триада в значительной мере утратила свое значение.

Генетические аспекты патогенности

Факторы патогенности контролируются:

- *— генами локализованными в хромосоме;*
- *— генами плазмид;*
- *— генами, привнесенными умеренными фагами*.

LEE- локус «стирания энтероцитов»;
PAI- остров патогенности;
pEAF – плазмида адгезина энтеропатогенной *E. coli* ;
pENT- плазмида энтеротоксина;
Stx – Шига-токсин- кодирующий бактериофаг



Генетические аспекты патогенности

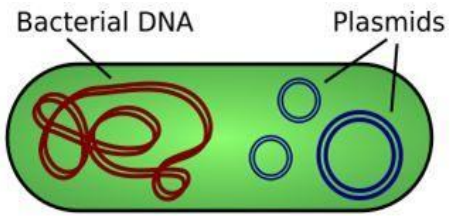
- Патогенность – генетически закрепленная способность
- Гены «патогенности» организованные в островки патогенности, способные к горизонтальному переносу
- Это большие (10-200 кб) участки ДНК бактериальной хромосомы или плазмиды, фланкированные прямыми повторами, с высоким содержанием ГЦ
- Интегрированы с генами тРНК, которые являются сайтами интеграции ДНК
- Обладают свойствами транспозонов, т.е. имеют гены интегразы, транспозазы или участок инсерционной последовательности и могут перемещаться из одного локуса тРНК в другой
- В одной бактериальной ДНК может быть несколько таких островков, например,у Salmonella обнаружено 5.

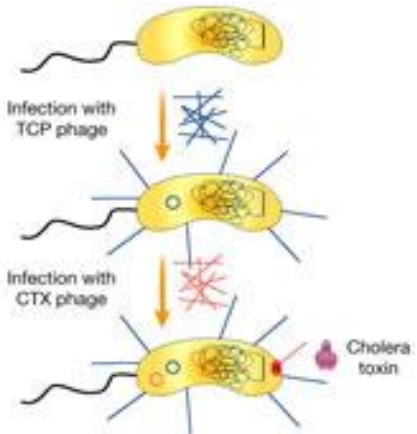
Генетические аспекты патогенности

Механизм превращения непатогенных в патогенные связан по меньшей мере с двумя процессами:

- 1. с получением дополнительных генов от бактериофагов (патогенная дифтерийная палочка) или плазмид (диареегенные эшерихии возникли в результате приобретения ими плазмид, содержащих гены, детерминирующие выработку токсина.)

- 2. с утратой генов (редукционная эволюция) - утрата значительной части генома в ходе редуктивной эволюции зарегистрирована у возбудителя коклюша *Bordetella pertussis* , возбудителя чумы *Yersinia*

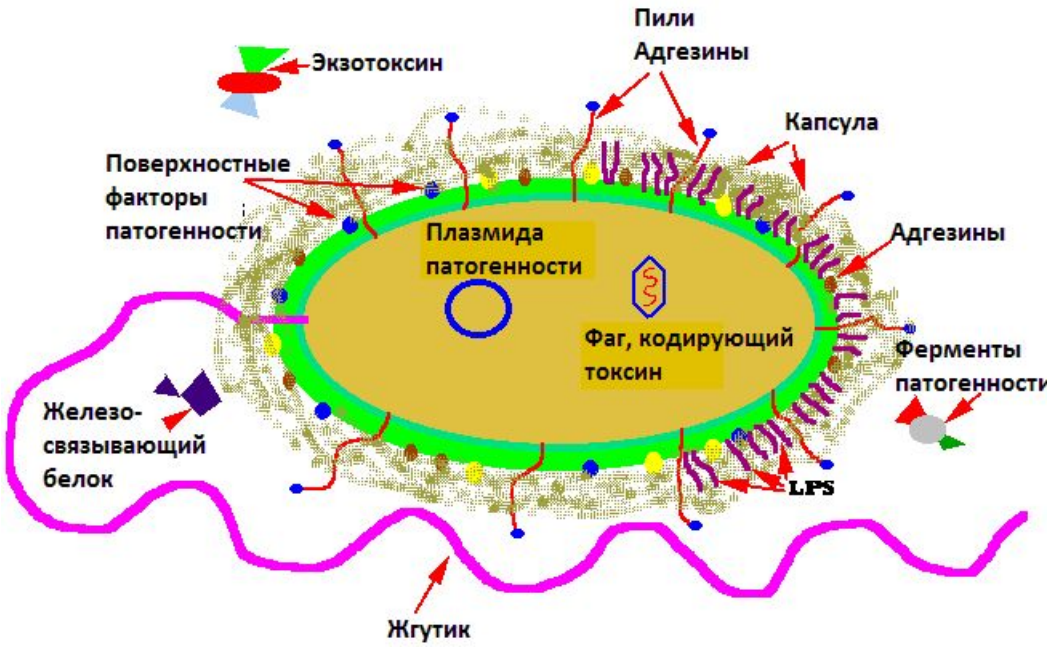




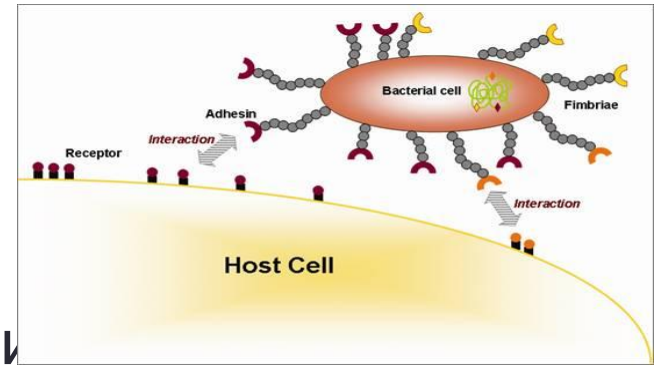
- Патогенность – потенциальная способность микроорганизма вызывать инфекционный процесс. Полифункциональное свойство, детерминировано геномом, передается по наследству.
- Вирулентность – степень патогенности (количественная характеристика), фенотипическое проявление патогенного генома
- Вирулентность может варьировать и может быть определена лабораторными методами (чаще- DL50- 50% летальная доза- количество патогенных микроорганизмов, позволяющая вызвать гибель 50% зараженных животных.

Факторы патогенности микроорганизмов

- Факторы адгезии и колонизации
- Факторы инвазии и агрессии
- Антифагоцитарные факторы
- Токсические факторы



Факторы адгезии



- Адгезия происходит на поверхности слизистых оболочек различных органов и систем.

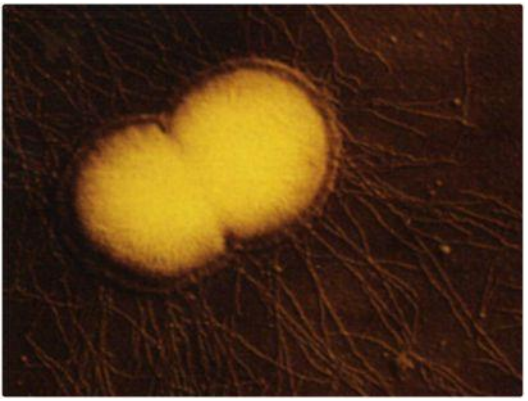
Адгезия протекает в две стадии:

1.неспецифическое обратимое прикрепление бактерии к поверхности эукариотической клетки

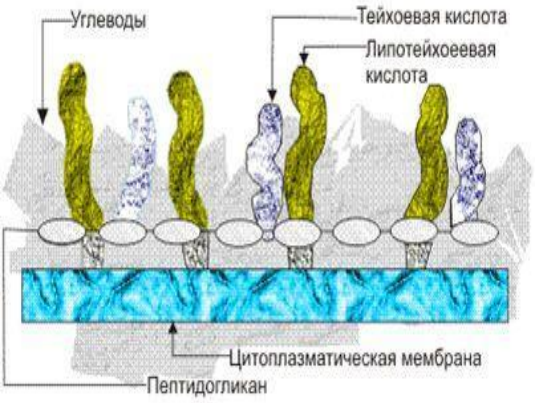
2. специфическое необратимое

- Со специфичностью адгезии связан *микробный тропизм* – способность микроорганизмов поражать определенные органы и ткани
- Адгезия служит сигналом к запуску каскада сложных реакций как у бактерии, так и у макроорганизма

Факторы адгезии - Адгезины



Фимбрии



Поверхностные структуры грамположительных бактерий

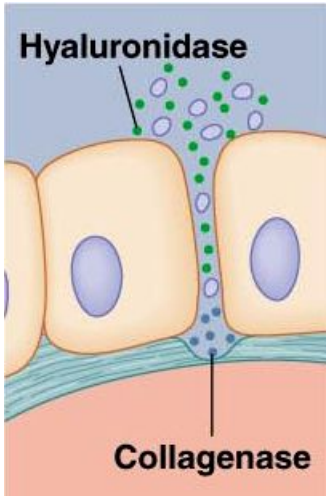
- Грамположительные и грамотрицательные бактерии – используют различные стратегии специфической адгезии.
- У грамотрицательных микроорганизмов молекулы адгезинов входят в состав специализированных органелл – ворсинок (фимбрий, **пилей**), вследствие чего они названы фимбриальными адгезинами.
- Грамположительные бактерии осуществляют адгезию посредством афимбриальных адгезинов – поверхностные структуры: **капсула; тейхоевые и липотейхоевые кислоты**; М-белок стрептококков; фибронектинсвязывающие белки стрепто- и стафилококков. Рецепторами для адгезинов грам(+) бактерий чаще всего являются фибронектин и белки межклеточного матрикса.
- Афимбриальные адгезины описаны и у грам(–) бактерий (филаментозный гемагглютинин у *Bordetella pertussis*)

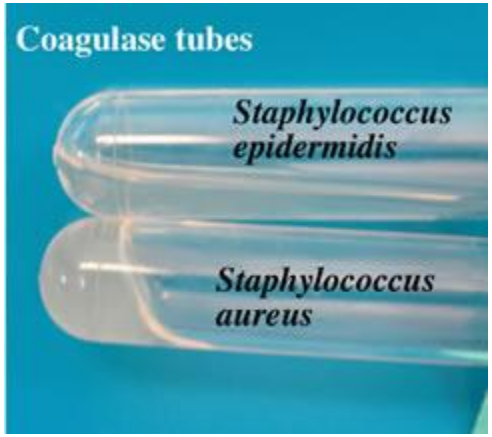
Факторы инвазии и агрессии

- *Инвазия* –проникновение возбудителя через слизистые и соединительнотканные барьеры
- *Агрессия* – подавление естественной резистентности и адаптивного иммунитета.
- Действуют совместно.
- Инвазивностью и агрессивностью обладают многие *поверхностные структуры бактериальной клетки* (жгутики, поверхностные белки, липополисахарид клеточнй стенки Грам-бактерий), а также *ферменты* секретируе бактериями

Факторы инвазии и агрессии

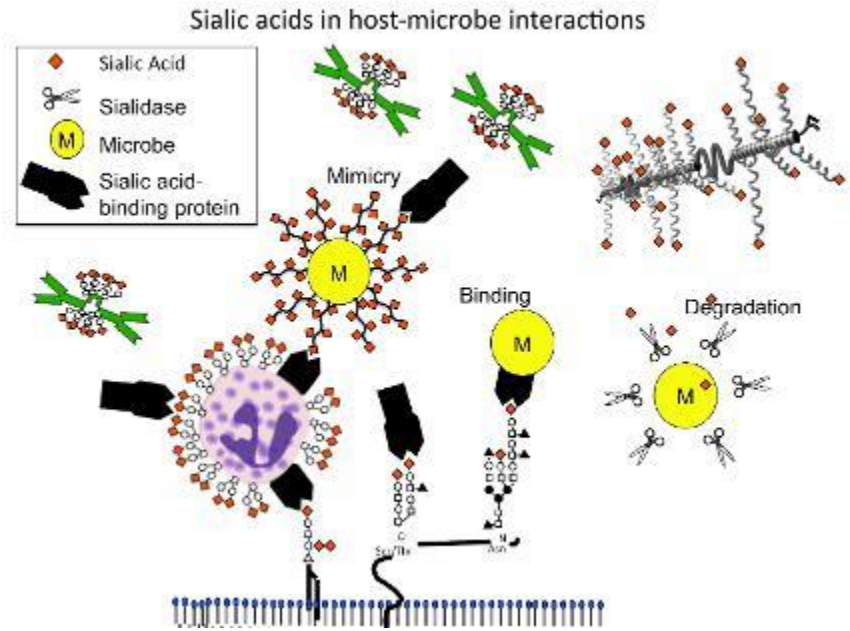
- Распространение микроорганизмов по межклеточным пространствам обеспечивают внеклеточно секретируемые белки, обладающие ферментативной активностью и нарушающие целостность внеклеточного матрикса:
- Гиалуронидаза- деполимеризует гиалуроновую кислоту- основной компонент соединительной ткани
- Плазмокоагулаза-взаимодействует с активатором плазмы с образованием тромбоподобного вещества, которое превращает фибриноген в фибрин, и вокруг возбудителя образуется чехол из фибрина.





Нейраминидаза

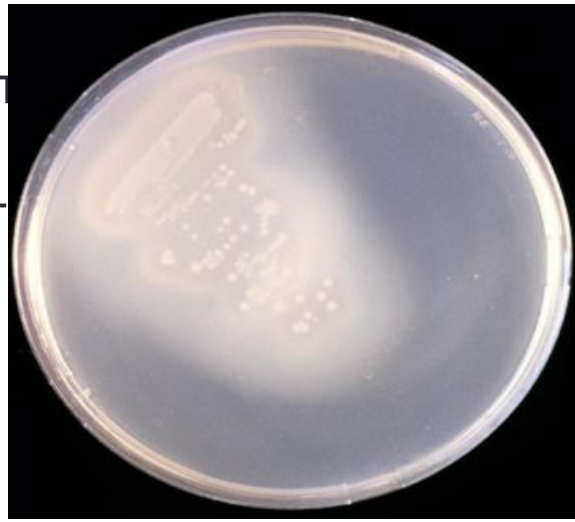
- Сиаловые кислоты экспрессированы на поверхности клеток и входят в состав секретируемых гликопротеинов. А поверхности маскируют антигенные детерминанты.
- Играют значительную роль в физиологии и иммунном ответе, воспалении, канцерогенезе, проникновении бактерий, вирусов.



Микробы используют различные стратегии выживания в организме хозяина: мимикрия сиаловых кислот хозяина, их связывание или деградация

Нейраминидаза- отщепляет остатки сиаловых (нейраминовых кислот) от ганглиозидов (сиаловые кислоты входят в состав муцина, секретов слизистых, придает им вязкость, затрудняет продвижение микроорганизма к эпителиоцитам; находятся на поверхности рецепторов клеток слизистых оболочек, и других клеток, например, лейкоцитов) и разрушает муциновый барьер, снижается активность фагоцитоза

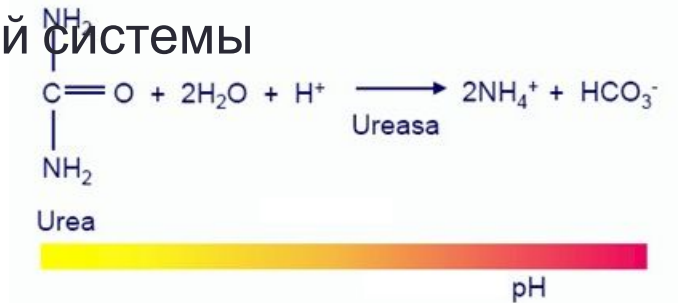
Факторы инвазии и агрессии



- *Лецитиназа (фосфолипаза)* – гидролизует лецит (фосфоглицерид фосфатидилхолин) основной компонент мембран млекопитающих, разрушает липиды клеточных мембран

- *ДНК-аза* – гидролиз молекул ДНК

Уреаза - распад мочевины до углекислого газа и аммиака. Аммиак вызывает сдвиг pH в щелочную сторону, что способствует подселению других микроорганизмов в урогенитальном тракте; обладает прямым токсическим эффектом для клеточных мембран; подавляет клеточное дыхание, токсичен для центральной нервной системы



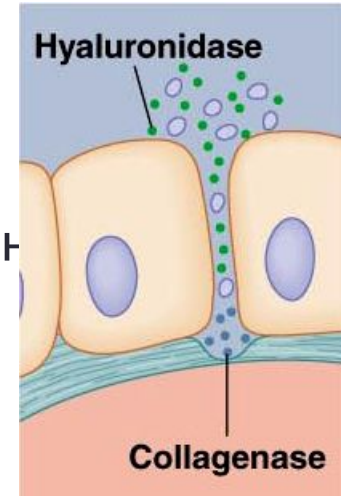
Факторы инвазии и агрессии

- Протеолитические ферменты:
- Основной мишенью протеолитических ферментов, образуемых бактериями, являются белки, включая сигнальные и эффекторные белковые молекулы иммунной защиты

- Коллагеназа- вызывает гидролиз коллагена мышечных волокон

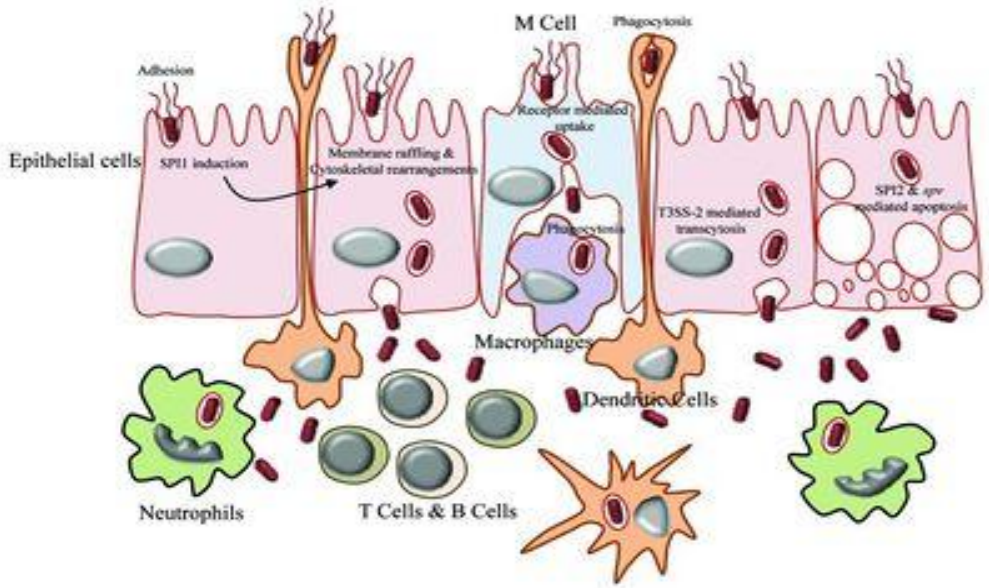
- Фибринолизин - растворяет сгустки фибрина вокруг очага воспаления, что способствует распространению возбудителя - генерализации инфекции
- Протеазы- гидролиз тканевых белков

- IgA протеазы -гидролиз секреторных иммуноглобулин нарушение местного иммунитета



Факторы инвазии и агрессии

- Проникновение микроорганизма внутрь эукариотической клетки обеспечивают:
- А. Фагоцитоз
- Б. Активная инвазия -способность микроорганизмов проникать внутрь клеток, не являющихся "профессиональными" фагоцитами



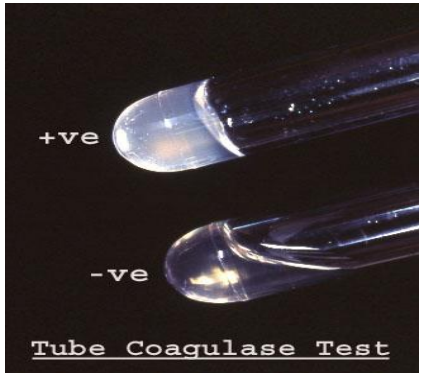
Антифагоцитарные факторы

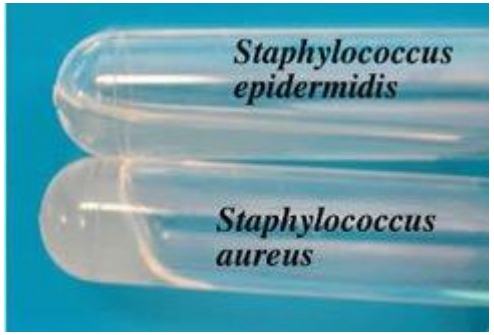
- Имеют поверхностную локализацию – капсулы, капсулоподобные структуры
- Не являются жизненно важными для бактериальной клетки
- Имеют макромолекулярную структуру

Антифагоцитарные факторы

- **1. Факторы, действующие на стадии распознавания и прикрепления:**

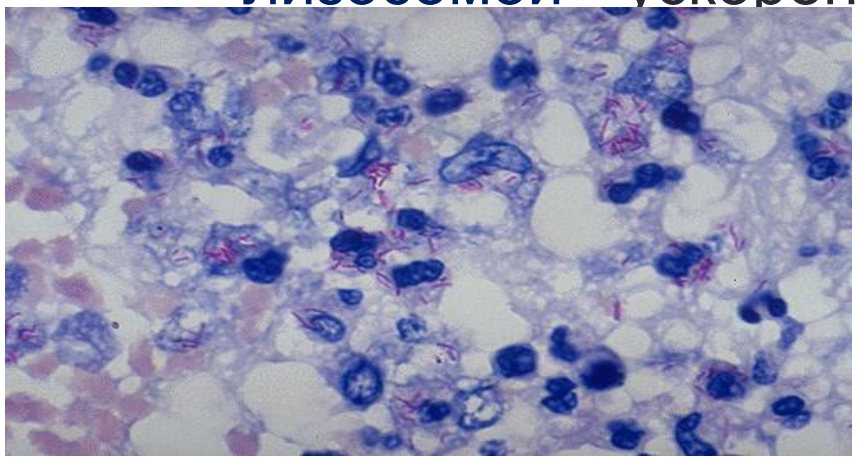
- Полисахаридные капсулы *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, B. anthracis придают микробной клетке гидрофильность
- М белок стрептококков группы А; К антиген *грамотрицательных бактерий*, включая Vi антиген of *Salmonella typhi; капсула* Neisseria gonorrhoeae маскируют рецепторы на поверхности микроорганизмов
- Поверхностный полисахаридный слой *Pseudomonas aeruginosa (слизисты слой легко отделяется, и микроб ускользает)*
- Белок А *Staphylococcus aureus* взаимодействует с Fc-фрагментами иммуноглобулинов и нарушает присоединение комплека Аг-Ат к макрофагу
- плазмокоагулаза *Staphylococcus aureus* покрывает поверхность кокков фибрином





Антифагоцитарные факторы

- **2. Факторы, действующие на стадии поглощения:**
- Препятствие слиянию фагосомы с лизосомой – стратегия *Salmonella*, *M. Tuberculosis* (корд-фактор и воск Д), *Legionella* и *Chlamydiae*
- Подавление процессов закисления в фаголизосоме, что приводит к нарушению действия лизосомальных ферментов
- Разрушение мембраны фагосомы до слияния с лизосомой – ускоренный выброс: листерии,



Внутриклеточное расположение M. tuberculosis. Окраска по Цилю-Нильсену

Антифагоцитарные факторы

3. Секреция микроорганизмами биологически активных веществ, способствующих гибели фагоцитов:

- Гемолизины S. Pyogenes, S.aureus
- Лейкоцидин S.aureus
- Фосфолипазы клостридий – возбудителей газовой гангрены

Антифагоцитарные факторы

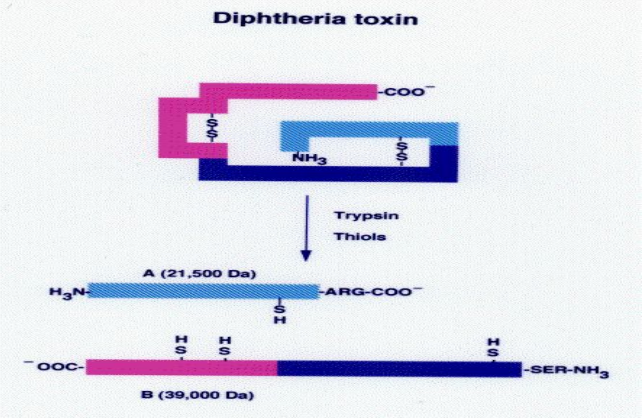
4. Уклонение от иммунологического надзора

- Экранирование (маскировка) антигенных детерминант с помощью капсул и капсулоподобных образований
- Антигенная мимикрия- ускользание от распознавания иммунной системой. Некоторые патогены покрывают поверхность своей клетки веществами, которые распознаются как «свои»:*Treponema pallidum* связывает на своей поверхности фибронектин; стрептококки группы А образуют капсулу из гиалуроновой кислоты.
- Вариабельность антигенных свойств – способность менять антигенную структуру у гонококков, боррелий, некоторых вирусов
- Образование L-форм, которые вместе с клеточной стенкой утрачивают и антигенные детерминанты

Бактериальные токсины

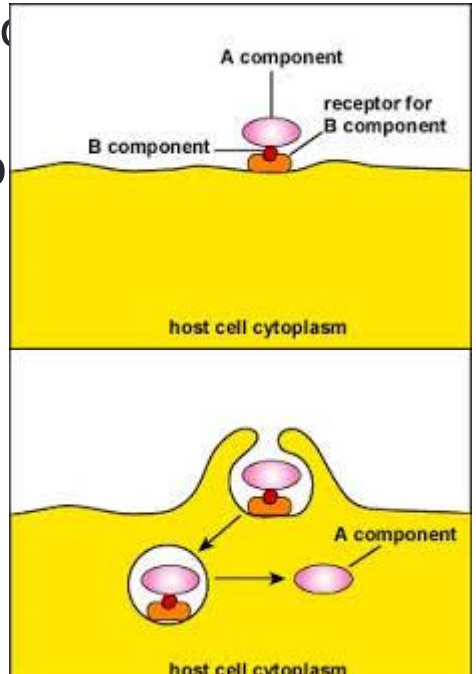
Экзотоксины	Эндотоксины
Образуют грам+ и грам- бактерии	Только грам-
Секретируются как правило живыми клетками в окружающую среду	Высвобождаются при гибели клетки
Белки	Липид А липополисахарида наружной мембраны клеточной стенки грам-бактерий
Термолабильны	Термостабильны
Токсичность проявляется при минимальных количествах вещества	Низкотоксичны
Действие высокоспецифично: нейротоксины, гистотоксины (см.далее)	Действие однотипно
Высокоиммуногенны	Не иммуногенны
При обработке формалином образуют анатоксины – основа специфической профилактики	Специфической профилактики нет

Бактериальные токсины. Экзотоксины



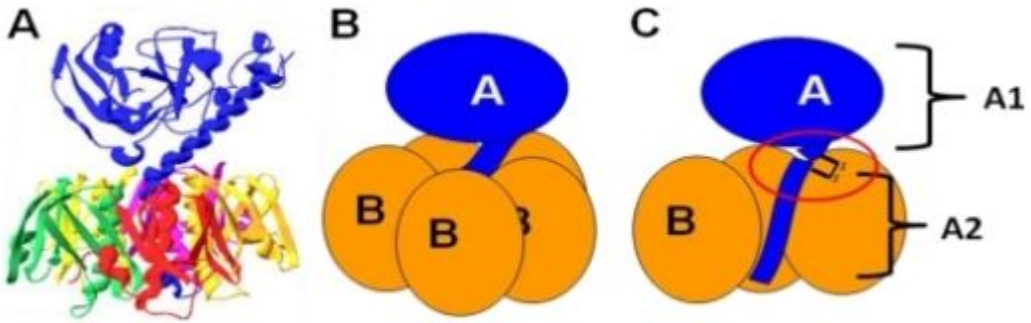
- *Простые* – полипептидная цепь
- *Сложные* – несколько связанных полипептидных цепей, соединенных между собой.

- Простые токсины вырабатываются в неактивной форме (протоксин) – активируются протеазами.
- Биологический смысл активации – образование бифункциональной системы состоящей из фрагмент соединенных дисульфидной связью
- В- отвечает за транспортную и рецепторную функцию
- А- обладает ферментативными свойствами, оказывает специфическое действие



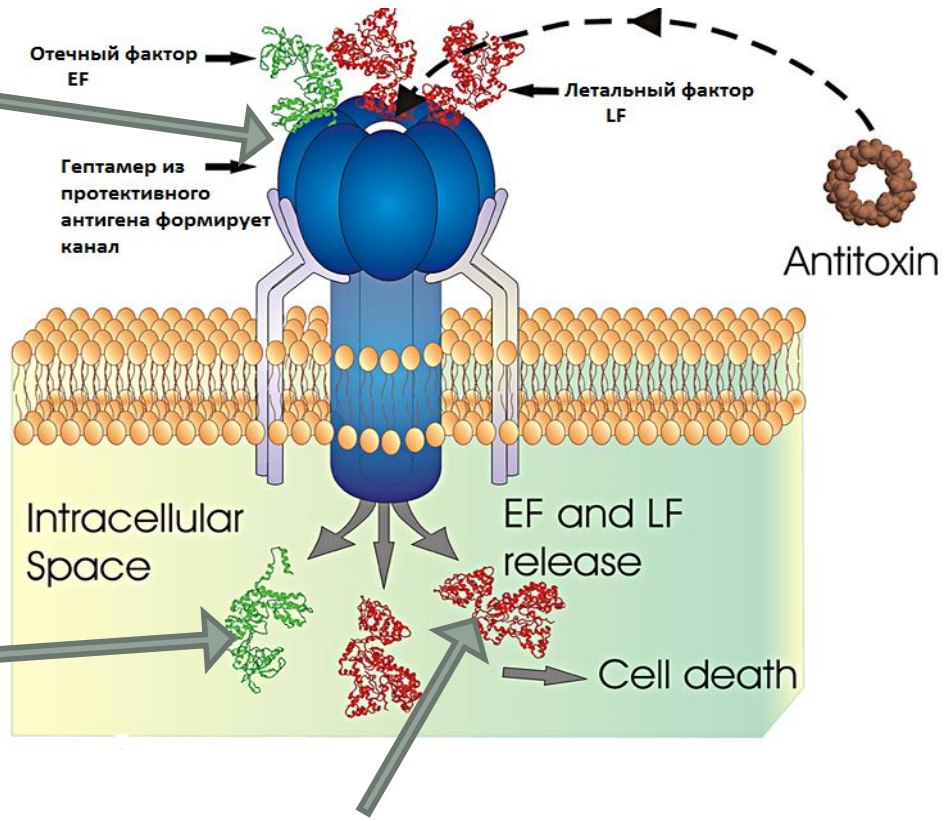
Бактериальные токсины. Экзотоксины

- Сложные токсины состоят минимум из 2 полипептидных цепей: А и В и представляют собой АВ-систему
- Фрагмент В присоединяется к клеточным рецепторам и расщепляет А на А1 и А2
- А2 способствует проникновению А1 в клетку
- А1 оказывает токсическое действие



Трехкомпонентный сибиреязвенный токсин

Протективный антиген – выполняет транспортную функцию, формирует каналы в клеточной мембране макрофагов и других клеток организма,



Отечный токсин - является кальмодулин-зависимой аденилат-циклазой, увеличивающей внутриклеточные уровни циклического АМР

Летальный токсин – **основной токсин B.anthracis** представляет собой цинкметаллопротеазу

БЕЛКОВЫЕ ТОКСИНЫ РАЗДЕЛЯЮТ ПО СТЕПЕНИ СВЯЗИ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКОЙ

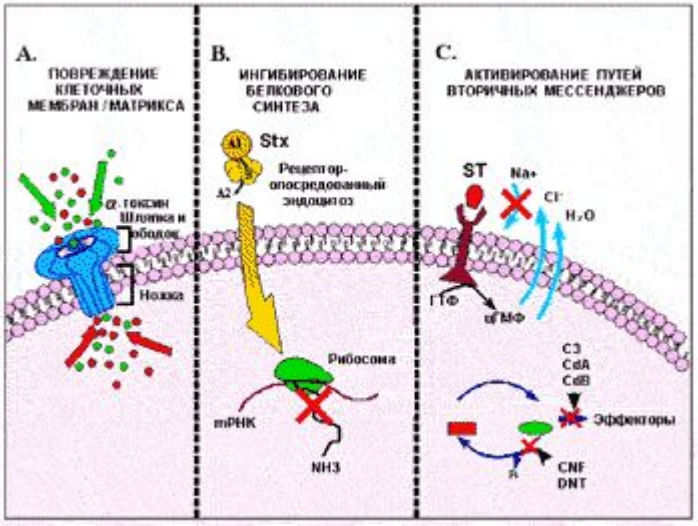
- **А. Токсины, секретируемые во внешнюю среду**

(дифтерийный токсин)

- **В. Частично секретируемые токсины** (ботулинический токсин и столбнячный тетаноспазмин) –большая часть остается внутри бактериальной клетки, а часть токсина выделяется и проникает в клетки макроорганизма
- **С. Несекретируемые токсины**

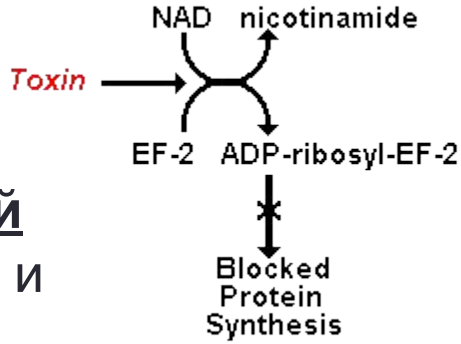
(токсин Шига и шигаподобные токсины) - освобождаются только после гибели и распада клетки-продуцента

- Токсины, ингибирующие синтез белка (цитотоксины)
- Токсины, повреждающие клеточные мембраны
- Функциональные блокаторы (активаторы путей метаболизма вторичных мессенджеров)
- Токсины- Zn-металлопротеазы – нейротоксины



Бактериальные токсины. Экзотоксины

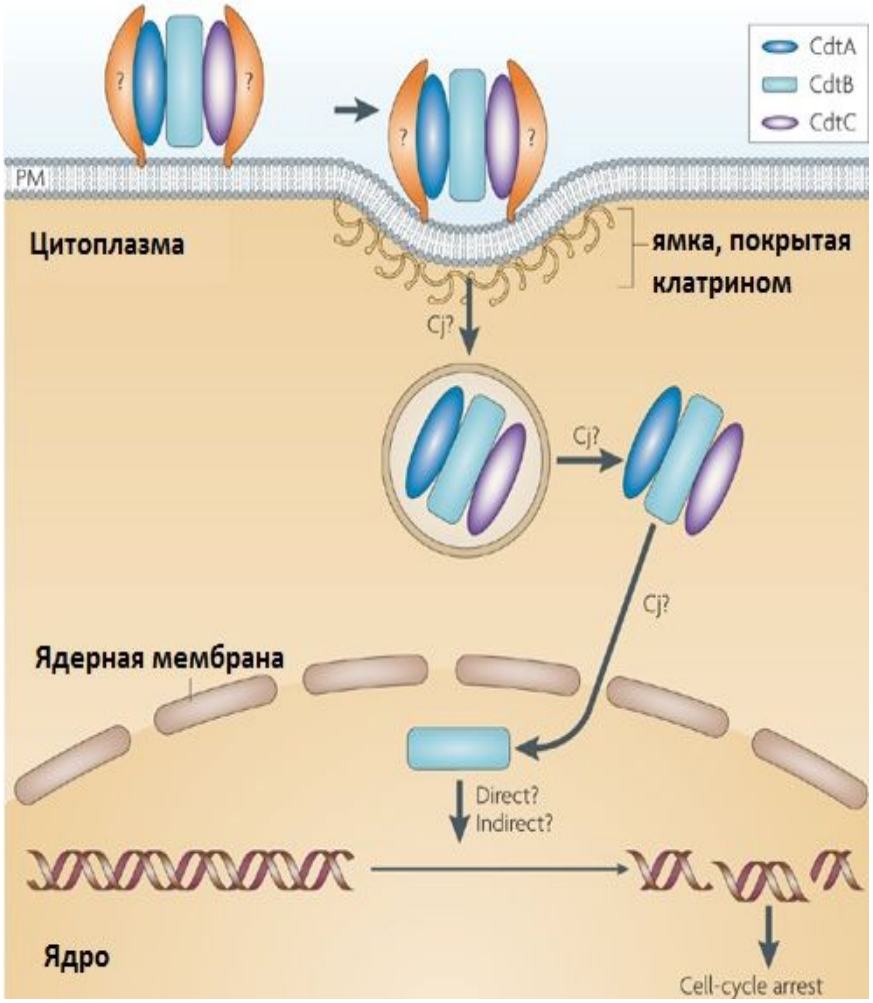
- **Токсины, ингибирующие синтез белка (цитотоксины):**



- **<u>Дифтерийный гистотоксин и токсин А синегнойной палочки</u>** взаимодействуют с фактором элонгации EF-2 и осуществляют его <u>АДФ-рибозилирование.</u>
- При этом блокируется синтез белка на рибосомах, что, в конечном итоге, приводит к гибели клеток.
- *А – субъединица обладает ферментативной активностью, осуществляет гидролиз NAD+ с присоединением образующегося остатка АДФ-рибозы к белковой молекуле*

- ***<u>Шига-токсин</u>*** – вызывает <u>ферментативное повреждение 28s р РНК</u> эпителиоцитов толстого кишечника, нарушается функционирование рибосом, факторы элонгации не могут связаться с рибосомами, нарушается синтез белка, клетка погибает.
- осуществляет *гидролиз специфических N-гликозидных связей*

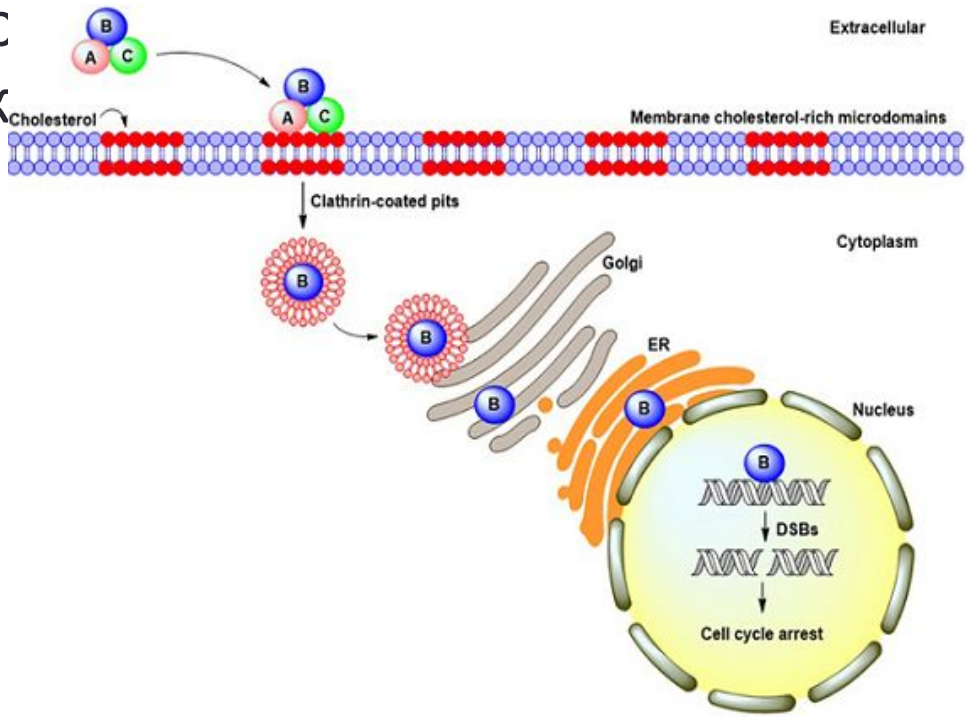
CDT энтеробактерий (cytolethal distending toxin, цитотоксичный расширяющий токсин)



- Продуцируется многими грамотрицательными бактериями
- Гетеротример: состоит из 3х субъединиц CdtA, CdtB иCdtC
- CdtB – ДНКаза, вызывающая двунитевые разрывы ДНК и как результат – блокирование клеточного цикла и апоптоз

CDT

- CdtA и CdtC связываютя с богатыми холестеролом доменами ЦПМ
- После чего CdtB проникает в клетку путем клатрин-зависимого эндоцитоза
- Путем ретроградного транспорта попадает из комплекса Гольджи в ЭПР, пр подвергается деградации как остальные экзотоксины
- Проникает в ядро благодаря предполагаемой сигнальной аминокислотной последовательности в его молекуле



Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications of *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin, Chen-Kuo Lai et al, Front. Cell. Infect. Microbiol., 09 February 2016

Тифоидный токсин

A_2B_5

Субъединицы A

Субъединицы B

PltA
(pertussis-like toxin A)

АДФ-рибозил трансфераза, гомолог субъединицы А коклюшного токсина

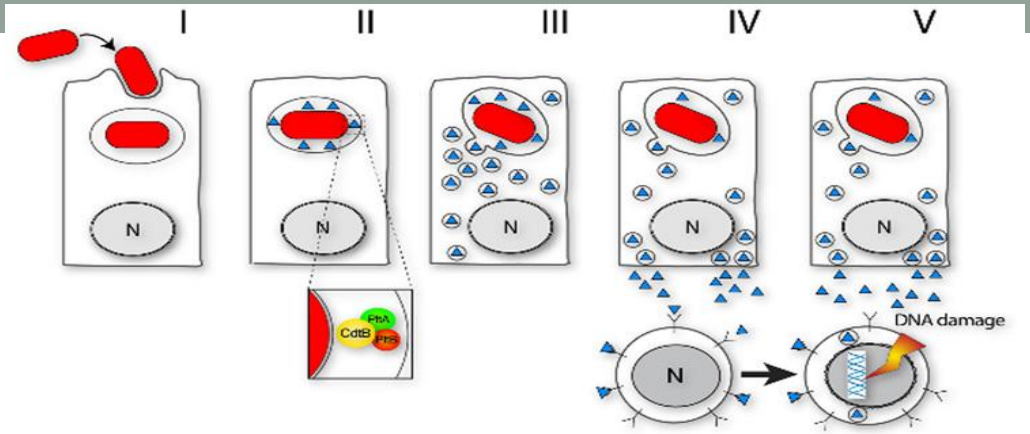
CdtB
CDT (cytolethal distending toxin, цитотоксичный расширяющий токсин)

ДНКаза

PltB
(pertussis-like toxin B)

Является гомологом одного из компонентов В-субъединицы токсина коклюша, участвует в проникновении токсина в клетку

- PltA, PltB, и CdtB кодируются генами в составе одного оперона.
- S.Typhi продуцирует токсин только в клетках млекопитающих.
- Клиническая симптоматика проявляется только у человека.
- Узкий тропизм обеспечивает взаимодействие гликан-связывающего домена PltB субъединицы со специфическими гликанами: у клеток человека конечное положение в углеводной цепочке гликопротеинов занимает N-ацетилнейраминовая кислота, что во многом определяет свойства данного гликопротеина, тогда как у приматов и других млекопитающих - N-гликолилнейраминовая кислота.
- Механизм действия идентичен соответствующим экзотоксинам: PltA катализирует присоединение АДФ-рибозы к субъединицам G-белков, что приводит к их конформационной перестройке, и как следствие - активации аденилатциклазы и нарушению водно-солевого обмена; CdtB инициирует повреждение ДНК, нарушение клеточного цикла и апоптоз.
- Обе субъединицы с различными биохимическими активностями работают только в комплексе - CdtB/PltA/PltB –единый тифоидный токсин



I Интернализация *S.* Typhi

II Сальмонелла продуцирует токсин, только находясь в вакуоли внутри клетки

III Комплекс CdtB/PltA/PltB распознается клеточными механизмами (?) и упаковывается в переносчик-транспортер

IV Комплекс секретируется во внеклеточное пространство, где распознает(ся) рецепторами неинфицированных клеток (в том числе иммунокомпетентных) и индуцирует повреждение ДНК

V Инфицированные клетки не экспрессируют рецептор для токсина и выступают убежищем для бактерий

Экзотоксины

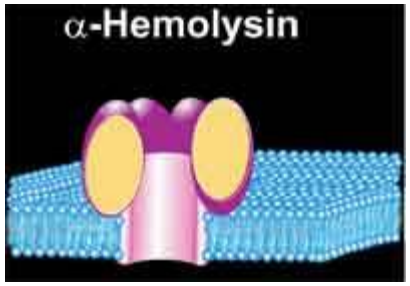
- Бактерии способны использовать свой токсин, чтобы защищаться от своих конкурентов: например, энтеротоксин кишечной палочки предотвращает действие холерного экзотоксина и шига-токсина.
- Бактерии прибегают к самоубийству, чтобы сородичи успешнее заразили организм. Например, *S. typhimurium* вырабатывает токсин TTSS-1, вызывающий воспаление кишечника. Он уничтожает кишечную микрофлору, расчищая место для бактерии, одновременно убивая многих ее представителей. В центре просвета кишечника только 15% *S. typhimurium* выделяют этот фактор, у стенки – практически все. Чем больше бактерий населяет кишку, тем больше погибает «пристенных». Это помогает оставшимся победить микрофлору кишечника [Ackermann M. et al, 2008]. Саморазрушающая кооперация зависит от генов, контролирующих суицидальное поведение, которые не всегда экспрессируются, то есть эффект гена не всегда выражен. В результате, только часть бактерий вырабатывают фактор TTSS-1.

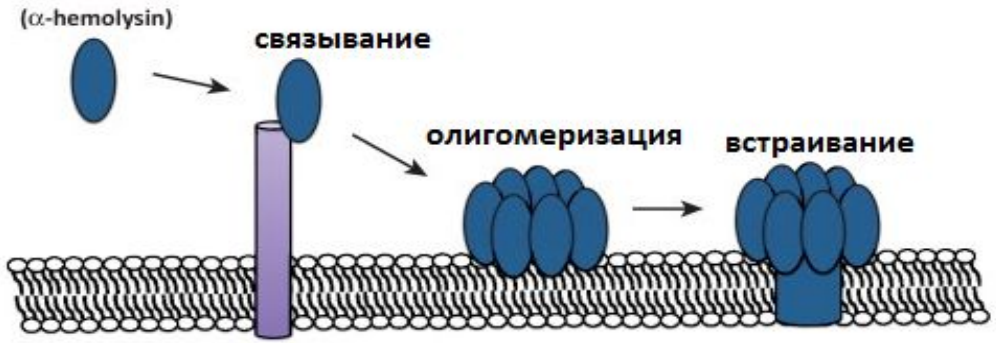
  Исследователи считают, что феномен саморазрушающей кооперации появляется, если достаточно велико «общественное благо», во имя которого она совершается, в данном случае - воспаление кишечника. В случае *S. typhi-murium* выгода в минимизации количества необходимых для заражения бактерий, их требуется не более ста.

Бактериальные токсины. Экзотоксины

Токсины, повреждающие клеточные мембраны:

- Нарушающие целостность мембран клеток с помощью *ферментативного гидролиза фосфолипидов* – фосфолипаза ***C. perfringens***
- *Порообразующие-гемолизины и лейкоцидин*; могут повреждать моноциты, тромбоциты (***альфа токсин стафилококков*** - *встраивание в мембрану и олигомеризация*)



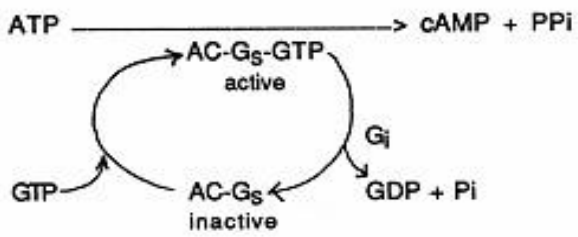


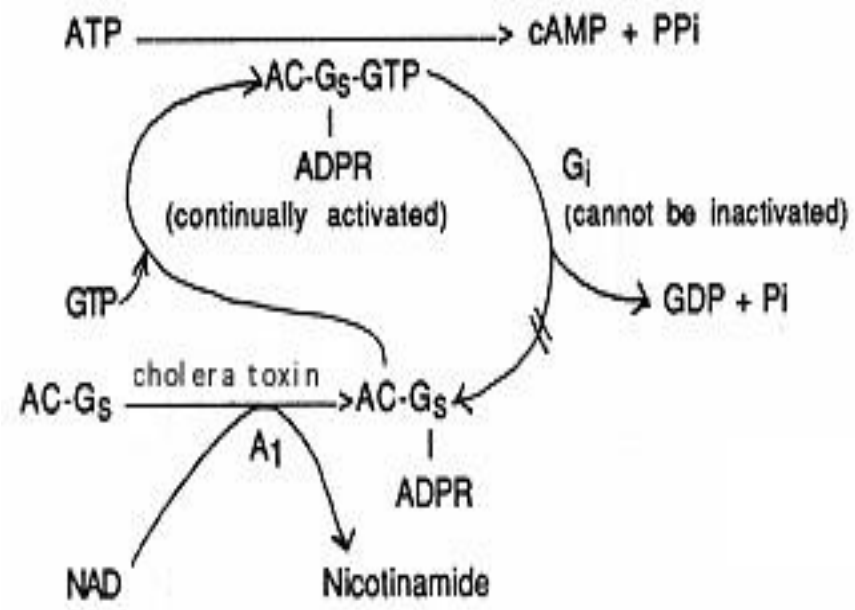
Бактериальные токсины. Экзотоксины

Функциональные блокаторы (активаторы путей метаболизма вторичных мессенджеров):

- Эти токсины способствуют усилению синтеза цАМФ, что приводит к нарушению транспорта электролитов (термолабильный токсин холерного вибриона и E.coli(LT), коклюшный токсин).
- Холероген действует в тонкой кишке, усиливает активность аденилатциклазы
- Коклюшный токсин – действует в респираторном тракте, изменяет активность аденилатциклазы.
- Термостабильный токсин (ST) E.coli аналогично действует на гуанилатциклазную систему

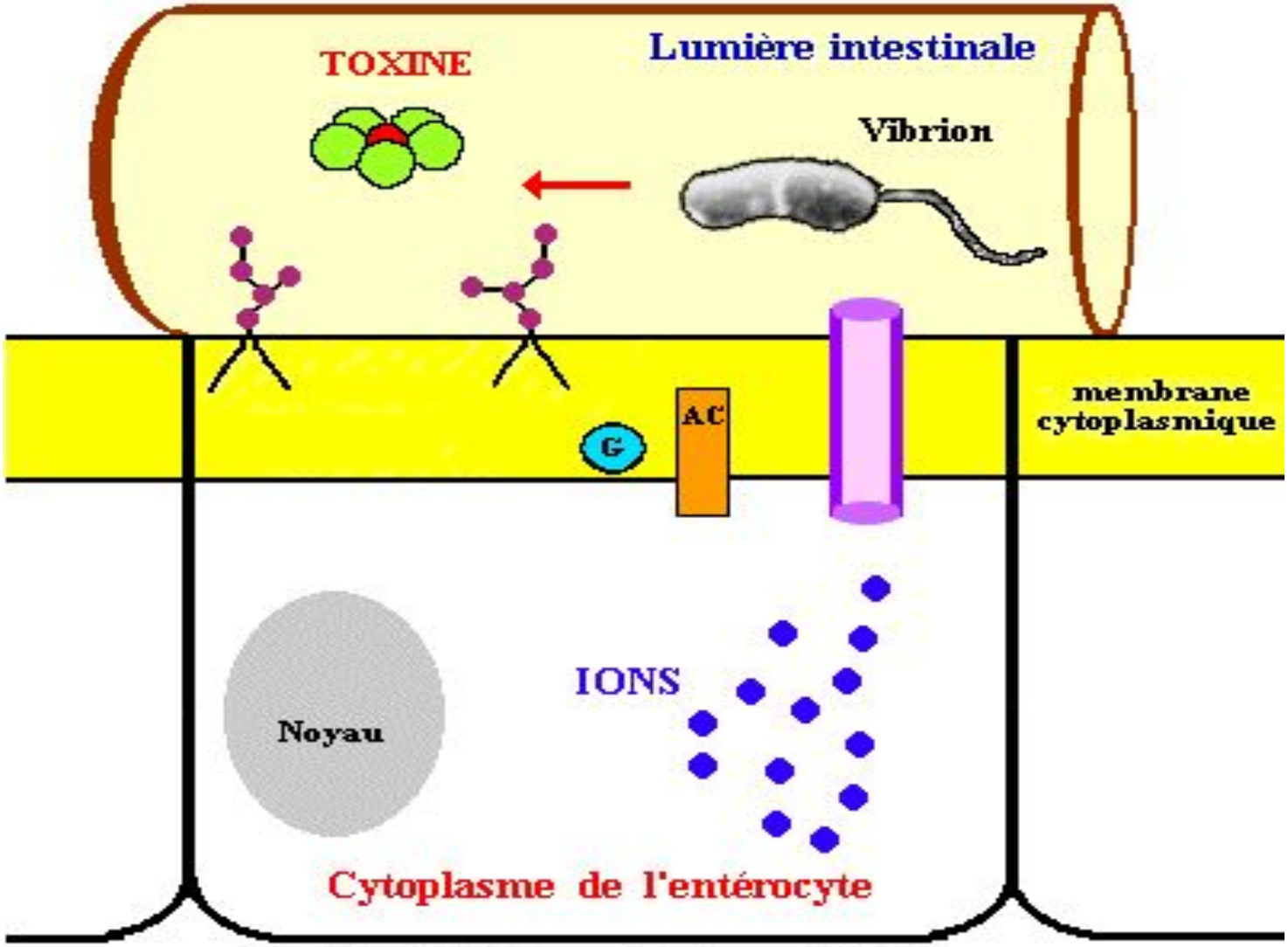
Термолабильный энтеротоксин холерного вибриона





В норме регуляция аденилатциклазы осуществляется регуляторным белком (Gs) и гуанозинтрифосфатом (GTP). Однако, активация подавляется регуляторным белком(Gi) и происходит гидролиз ГТФ.

A1 субъединица холерного токсина прикрепляется к белку Gs с образованием комплекса (Gs-ADPR), и гидролиз ГТФ становится невозможен. Поскольку гидролиз ГТФ является ключевым событием для инактивации аденилатциклазы, фермент остается в состоянии постоянной активации.

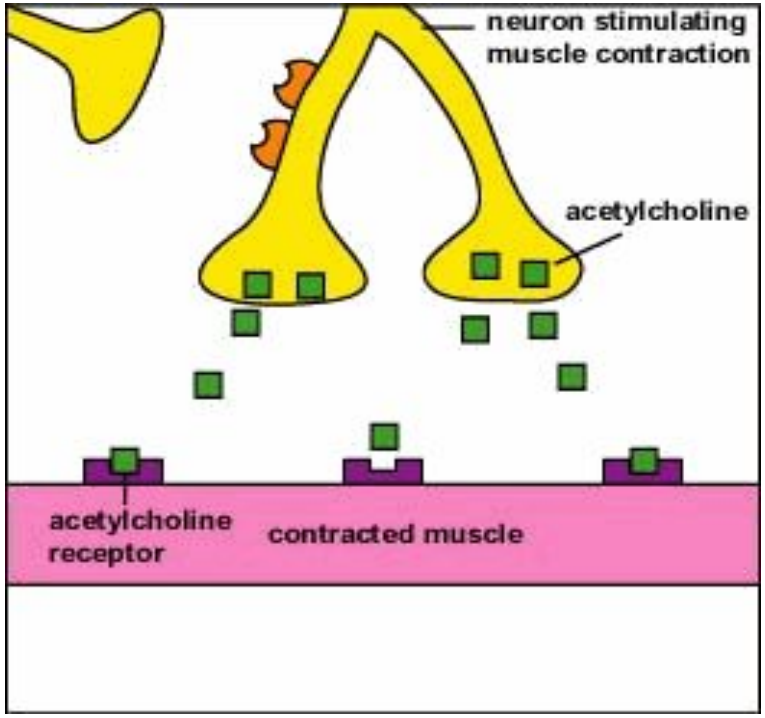


T. RUMMENS Jolimont Toulouse Mai 2001

Бактериальные токсины. Экзотоксины

Токсины- Zn-металлопротеазы – нейротоксины:

- Клеточные мишени для токсина - группа белков, необходимых для соединения синаптических пузырьков с пресинаптическими плазматическими мембранами с последующим высвобождением нейромедиаторов



Столбнячный токсин

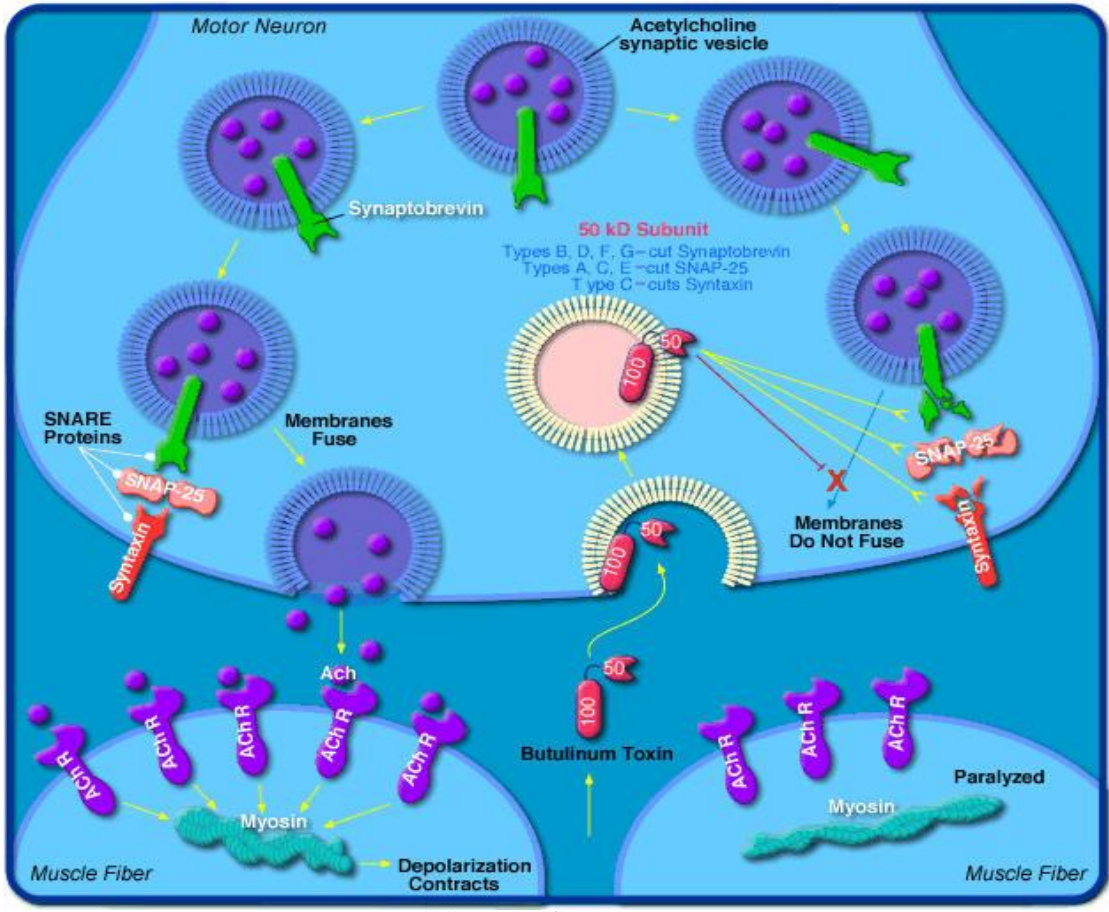
- связывается с рецепторами пресинаптической мембраны моторных нейронов,
- затем с помощью обратного везикулярного транспорта перемещается в спинной мозг, где внедряется в тормозные и вставочные нейроны.
- Расщепление синаптобревина в этих нейронах приводит к нарушению высвобождения глицина и гамма-аминомасляной кислоты через пресинаптические мембраны в синаптическую щель- судороги

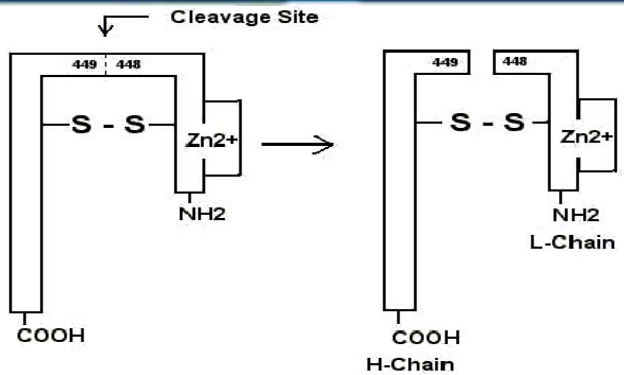
- *Осуществляет гидролиз специфических пептидных связей*

Бактериальные токсины. Экзотоксины

Токсины- Zn-металлопротеазы – нейротоксины:

- *Ботулотоксин* - поступая в кровь, токсин достигает нервно-мышечных соединений и поражает холинэргические отделы периферической нервной системы; происходит пресинаптическая блокада высвобождения ацетилхолина.В результате прекращается подача импульса с нерва на мышцу, развивается парез или паралич разных групп мышц.

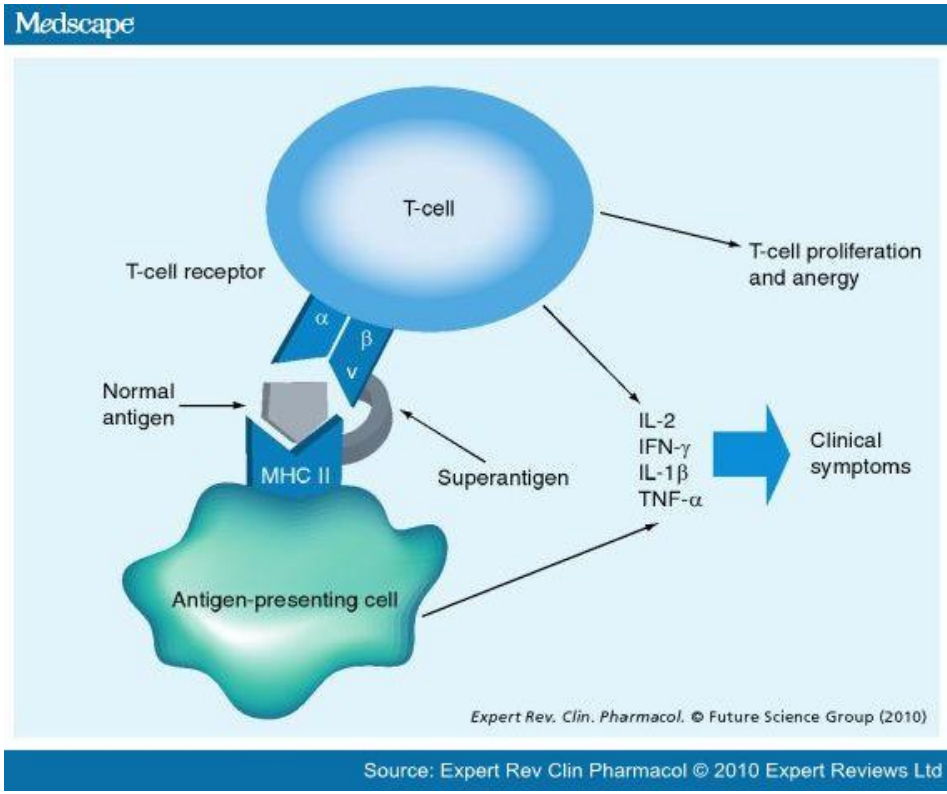




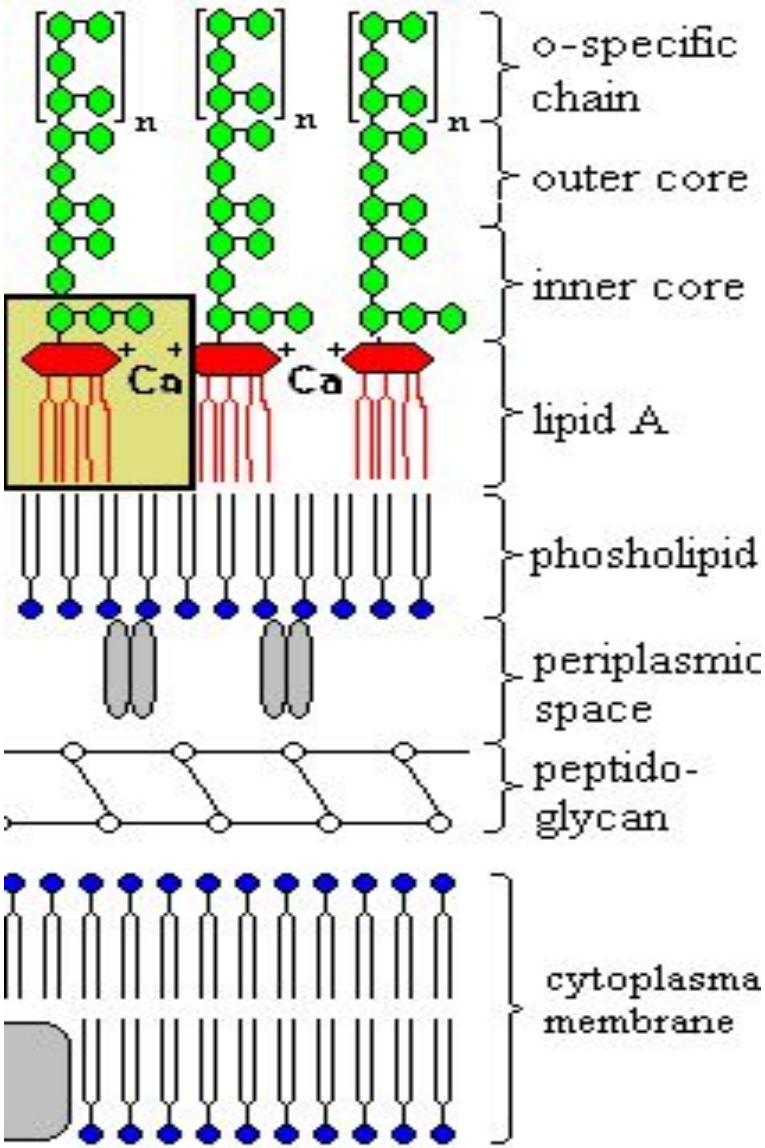
Бактериальные токсины. Экзотоксины

Токсины – суперантигены

- Непосредственно взаимодействуют с Т хелперами (связываются с особым белком на поверхности клетки – рецептором CD28) и стимулируют их к поликлональной активации и гиперпродукции цитокинов, запуская настолько сильную реакцию иммунной системы, что ее называют «иммунной бурей»
- *Экзотоксины St.aureus: энтеротоксин, эксфолиатин, токсин синдрома токсического шока;*
- *Эритрогенный токсин гнойного стрептококка;*



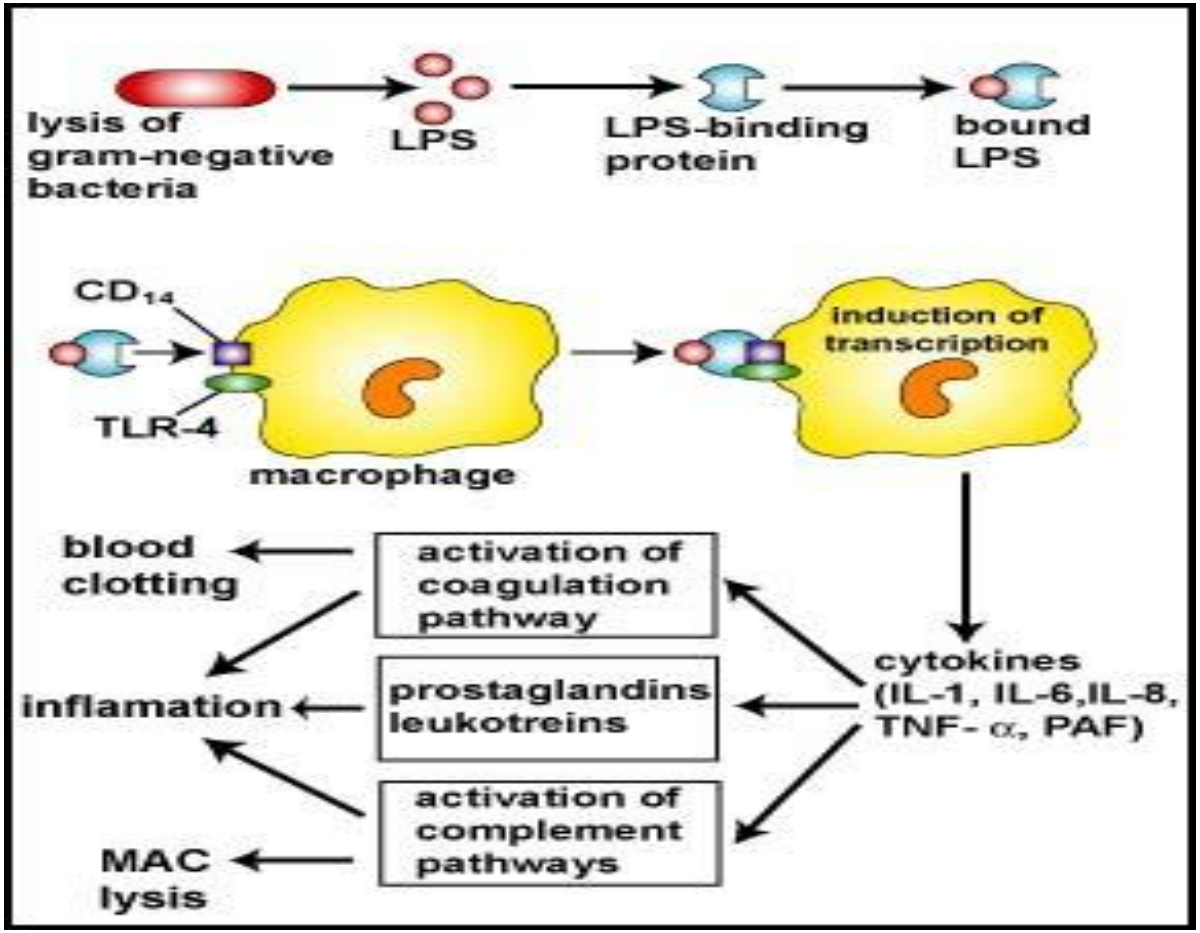
Эндотоксины



- Липид А липополисахаридного комплекса грамотрицательных бактерий

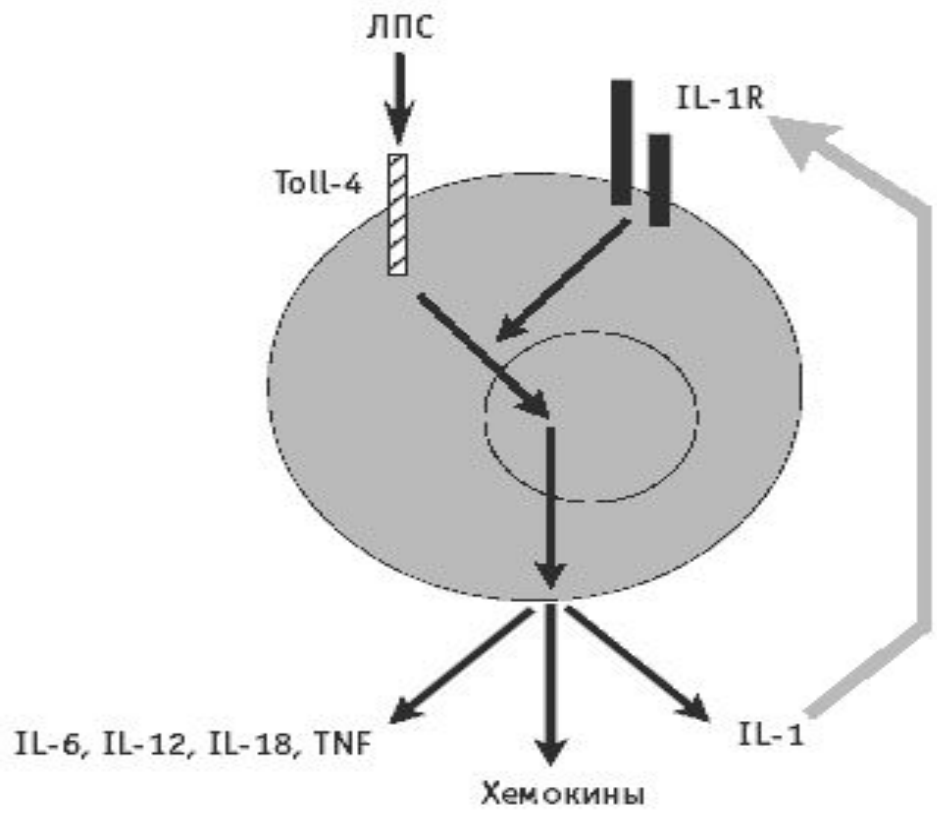
Эндотоксин. Основные характеристики:

- Иммуногенность
- Стимуляция выработки физиологически активных веществ
- Пирогенность
- Активация комплемента по альтернативному пути
- Накопление органических кислот (метаболический ацидоз)
- Повреждение сосудов микроциркуляторного русла
- Нарушение в результате сосудистых повреждений функций почек, печени, сердца, легких, мозга, развитие эндотоксического шока

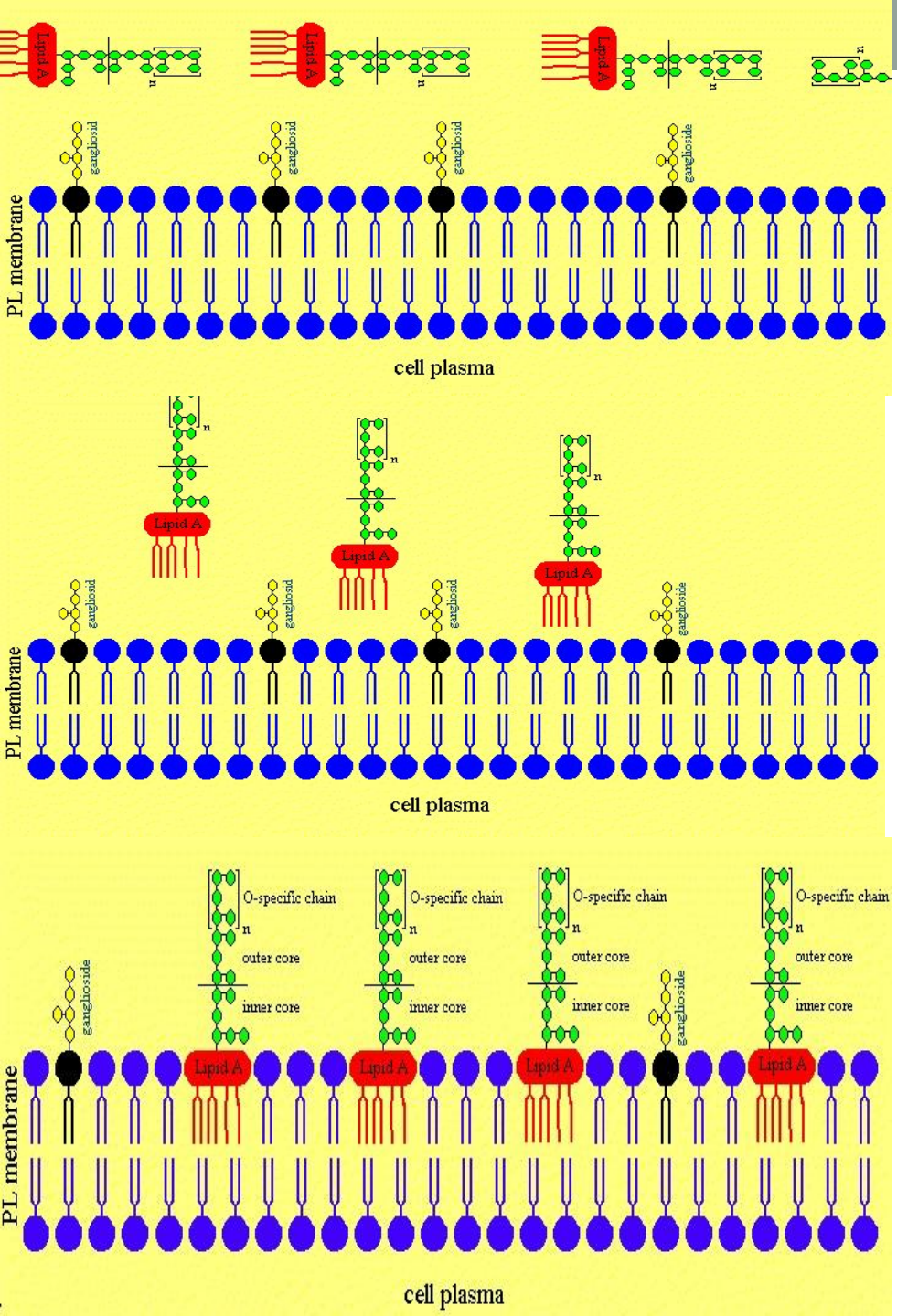


Вместе с тем эндотоксины способны оказывать и благотворное влияние, стимулиру
неспецифическую устойчивость организма к бактериальным и вирусным инфекция
Эндотоксины важны для нормального развития и функционирования иммунной системы организма.

Эндотоксин – суперантиген. Схема активации клеток с участием белка Toll-4 и рецепторов IL-1.



Анализ строения Toll-белков и рецепторного комплекса IL-1 подтверждает, что это не случайно. IL-1 практически повторяет все биологические эффекты ЛПС как на местном, так и на системном уровне



- В экспериментальной модели с S.minnesota в качестве возбудителя менингита было показано, что в ткани мозга ЛПС интеркалирует в мембрану нейронов так, что липид А погружен в фосфолипидный бислой, а углеводный фрагмент выступает над поверхностью мембраны.
- В этом случае анти-ЛПС антитела вместе с активированным комплементом приведут к лизису нейрона с развитием хронического воспаления.
- По мере развития иммунного ответа будет усиливаться повреждение ткани мозга

Токсины, ингибирующие синтез белка (цитотоксины)

- АДФ-рибозилирование (дифтерийный, синегнойный)
- Отщепляет адениловый остаток в 28s рРНК эукариотических рибосом Шига-токсин Shigella dysenteriae (**фрагмент-активатор (А) является N-гликозидазой)**

Функциональные блокаторы (активаторы путей метаболизма вторичных мессенджеров)- активируют аденилатциклазу, повышая уровень цАМФ (термолабильные токсины Vibrio cholerae, E.coli)

Активирует гуанилатциклазу - Термостабильный (ST) энтеротоксин E.coli)

Токсины, повреждающие клеточные мембраны

- *ферментативного гидролиза фосфолипидов* – фосфолипаза C. perfringens
- *Порообразующие*- *гемолизины и лейкоцидин*

Токсины- Zn-металлопротеазы – нейротоксины –

подавляет пресинаптический выход ГАМК и глицина- столбнячный Clostridium tetani

подавляет пресинаптический выход ацетилхолина – ботулинический Clostridium botulinum

Токсины – суперантигены
вызывают поликлональную активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов и гиперпродукцию медиаторов воспаления и иммунного ответа

Энтеротоксин S.aureus

Эндотоксин –
Липополисахарид наружной мембраны Грам отрицательных бактерий
Действие опосредовано Toll-like рецепторами
Эффекты: нарушение микроциркуляции крови, гипотензия

Токсины с субъединицей А – ферментом
Дифтерийный
Холерный
Шига-токсин