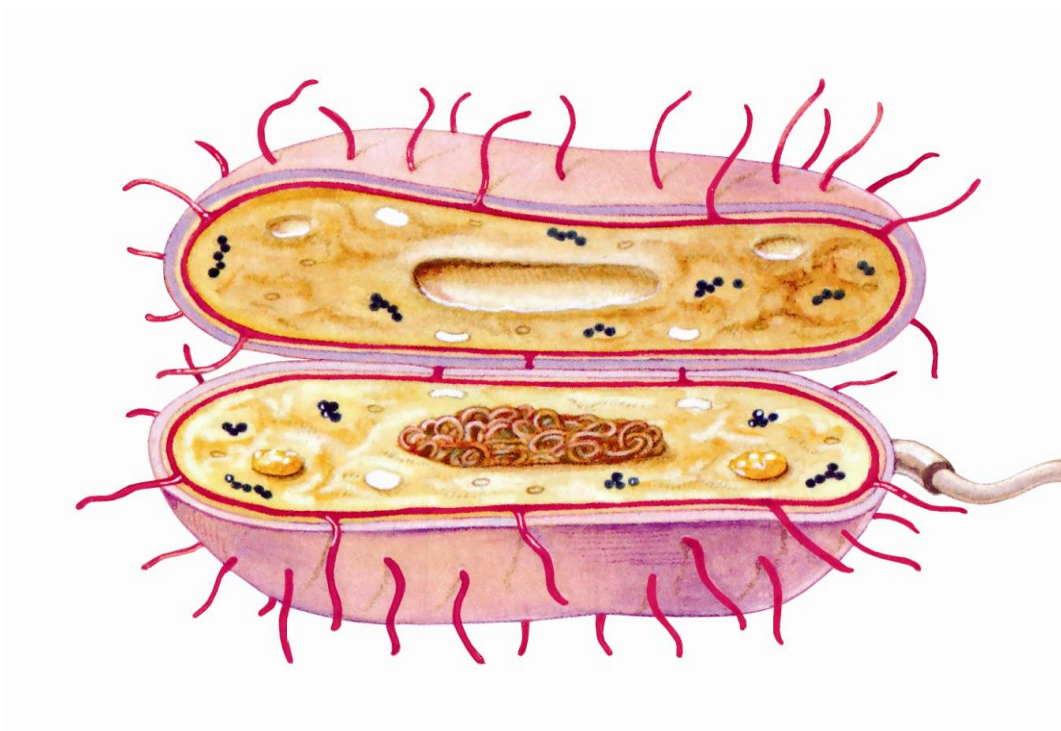


**ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России
Кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии**

ЧАСТНАЯ БАКТЕРИОЛОГИЯ

Модули II–VI



**Учебно-методическое пособие
для самостоятельной работы студентов
по частной микробиологии**

Тверь 2018

**ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России
Кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии**

ЧАСТНАЯ БАКТЕРИОЛОГИЯ

Модули II–VI

**Учебно-методическое пособие
для самостоятельной работы студентов
по частной микробиологии**

Под редакцией профессора В.М. Червинца

Утверждено Центральным координационным методическим советом ТГМУ

Тверь, 2018

Составители:

профессор, доктор медицинских наук В.М. Червинец
профессор, доктор медицинских наук Ю.В. Червинец
доцент, кандидат медицинских наук А.М. Самоукина
доцент, кандидат медицинских наук Е.С. Михайлова
старший преподаватель, кандидат биологических наук Е.А. Беляева

Редактор: профессор, доктор медицинских наук В.М. Червинец

Рецензенты:

доцент, кандидат медицинских наук О.В. Волкова
доцент, кандидат медицинских наук В.М. Курицын

Утверждено Центральным координационным методическим советом ТГМУ

Частная микробиология, вирусология и иммунология. Модули II–VI [Текст] /
Учебно-методическое пособие для самостоятельной работы студентов по
микробиологии, вирусологии и иммунологии /Под ред. В.М. Червинца. — Тверь:
2018. — 178 с.

Методические указания составлены коллективом кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Тверского государственного медицинского университета и предназначены в помощь студентам II курса лечебного, педиатрического, стоматологического, фармацевтического факультетов и факультета ВСО при подготовке и выполнении практических занятий.

Оглавление

Модуль II «Стафилококковые и стрептококковые инфекции. Инфекции, вызываемые спорообразующими и неспорообразующими анаэробами»	4
Тема 1: Микробиологическая диагностика стафилококковых и стрептококковых инфекций	4
Тема 2: Микробиологическая диагностика инфекций, вызываемых спорообразующими и неспорообразующими анаэробами	22
Модуль III «Кишечные инфекции»	38
Тема 1: Микробиологическая диагностика колиэнтеритов и кишечного иерсиниоза	38
Тема 2: Микробиологическая диагностика дизентерии, брюшного тифа, паратифов А и В, сальмонеллезных гастроэнтеритов	51
Тема 3: Микробиологическая диагностика холеры	66
Модуль IV «Воздушно-капельные инфекции»	73
Тема 1: Микробиологическая диагностика воздушно-капельных инфекций: туберкулез, дифтерия	73
Тема 2: Микробиологическая диагностика воздушно-капельных инфекций: менингококковая инфекция, коклюш	85
Тема 3: Микробиологическая диагностика воздушно-капельных инфекций: атипичные пневмонии	94
Модуль V «Трансмиссивные заболевания, ИППП и микозы»	105
Тема 1: Микробиологическая диагностика трансмиссивных заболеваний: сыпной тиф (эпидемический и эндемический), Ку-лихорадка, возвратный тиф, клещевой боррелиоз (болезнь Лайма)	105
Тема 2: Микробиологическая диагностика венерических заболеваний: сифилиса, гонореи, трихомоноза, урогенитального хламидиоза и микоплазмоза	119
Тема 3: Микробиологическая диагностика микозов (кандидоза и дерматомикозов) и актиномикоза	143
Модуль VI «Зоонозные инфекции»	155
Тема 1: Микробиологическая диагностика бруцеллеза и туляремии	155
Тема 2: Микробиологическая диагностика чумы и сибирской язвы	164
ЛИТЕРАТУРА	173

Модуль II «Стафилококковые и стрептококковые инфекции. Инфекции, вызываемые спорообразующими и неспорообразующими анаэробами»

Занятие № 1

ТЕМА: Микробиологическая диагностика стафилококковых и стрептококковых инфекций

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ знать: классификацию и основные биологические свойства стафилококков и стрептококков, факторы патогенности, методы микробиологической диагностики, биопрепараты для этиотропной терапии и специфической профилактики стафилококковых и стрептококковых инфекций

уметь: готовить мазки, окрашивать по Граму, микроскопировать препараты, определять морфологические и тинкториальные свойства, проводить бактериологические исследования гноя, фекалий, выделять чистую культуру стафилококков из исследуемого материала, определять чувствительность микрофлоры к антибактериальным препаратам, дифференцировать стрептококки в мазках по морфологическим и тинкториальным свойствам; определять факторы патогенности стафилококков; определять чувствительность стафилококков к антибиотикам; учитывать реакцию определения антител к О-стрептолизину.

Задание на дом

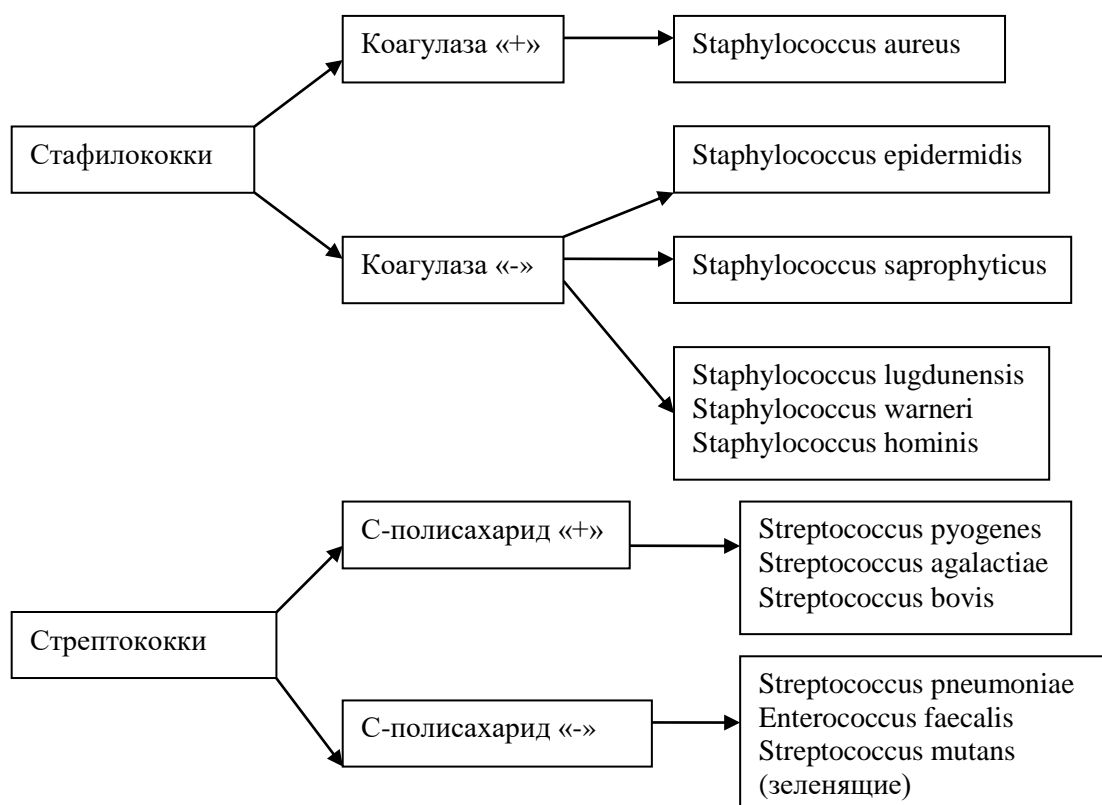
1. Вопросы для самоподготовки:

- 1) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики стафилококковых инфекций
- 2) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики стафилококковых инфекций

Грамположительные кокки

Грамположительные кокки представлены стафилококками и стрептококками — основными возбудителями гнойно-воспалительных поражений у человека. Их отличительные свойства:

- сферическая форма,
- положительная окраска по Грамму,
- отсутствие способности к спорообразованию



Стафилококки

1. Таксономия и классификация

Стафилококки относят к отряду Firmicutes, семейству Micrococcaceae, роду Staphylococcus. К роду Staphylococcus относят около 30 различных видов микроорганизмов. По наличию коагулазы все стафилококки разделяют на две группы: коагулаза-положительные (среди патогенных видов это лишь *S. aureus*) и остальные виды называют коагулаза-отрицательными. Медицинское значение имеют три основных вида *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*.

2. Нозологические формы

Являются представителями нормальной микрофлоры человека и животных. Стафилококки густо колонизируют различные биотопы организма человека: кожу, слизистую носа, зева, ротовой полости и т. д. Особенно много стафилококков на кожных покровах, где они являются доминирующей микрофлорой.

Подавляющее большинство инфекционных заболеваний, вызываемых стафилококками, носит эндогенный характер. Механизм инфицирования обычно связан с переносом микроба из участков колонизации на травмированную поверхность. Стафилококки вызывают кожные гнойничковые инфекции (пиодермии), раневые инфекции, бактериемии, эндокардиты, пневмонии, артриты, остеомиелиты, перитониты, инфекции мочевыделительной системы (уретриты, пиелиты, циститы и др.), пищевые токсикоинфекции, синдром «ошпаренной кожи», синдром токсического шока и др.

3. Эпидемиология и пути передачи

Источник инфекции — больные со стертыми формами стафилококковой инфекции или носители, значительно реже — больные животные, например, больные маститом коровы при пищевых стафилококковых отравлениях и энтероколитах. Наибольшую эпидемиологическую опасность представляет медицинский персонал лечебно-профилактических учреждений, который может являться носителем госпитальных штаммов стафилококка. В соответствии с Международной классификацией, различают постоянных носителей, у которых при посеве из полости носа всегда выделяется стафилококк, и перемежающихся носителей, у которых стафилококк выделяется время от времени.

Поскольку стафилококки, как и все условно-патогенные микроорганизмы, не имеют органного тропизма, то для стафилококковых инфекций характерна множественность механизмов, путей и факторов передачи. Они могут передаваться контактно через нестерильный медицинский инструмент, руки медперсонала, алиментарно с молочными продуктами, кондитерскими изделиями, аэрогенно, парентерально при инъекциях. Хорошо переносят высушивание, сохраняя вирулентность; погибают при прямом воздействии солнечного света в течение 10-12 часов. Они довольно устойчивы к нагреванию — при 70-80°C погибают за 20-30 мин, при 150° С — за 10 мин; сухой жар убивает их за 2 часа. Бактерии чувствительны к действию дезинфектантов, но резистентны к чистому этанолу.

Восприимчивость к стафилококкам очень низкая у лиц с нормальным иммунным статусом и повышенная у лиц с иммунодефицитными состояниями. Очень часто стафилококковая инфекция развивается на фоне вторичных иммунодефицитов, например, после перенесенной ОРВИ.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Стафилококки представлены неподвижными клетками диаметром 0,5-1,5 мкм, располагающиеся скоплениями, напоминающие гроздь винограда в результате деления в нескольких плоскостях, что и определило их название (от греч. staphyle — виноградная гроздь — kokkos, зерно, ягода).

5. Питательные среды и культуральные свойства

Стафилококки — факультативные анаэробы, но более быстро растут в аэробных условиях. Хорошо растут на простых питательных средах. Температурный оптимум 30-37°C, pH 7,0-7,5. На плотных средах через 18-24 часа культивирования формируют мутные круглые ровные колонии средних размеров кремового, желтого или оранжевого цвета.

Образующиеся липохромные пигменты защищают бактерии от токсического воздействия кислородных радикалов. Стафилококки устойчивы к повышенному содержанию хлорида натрия и хорошо растут на средах с 5-10% содержанием NaCl, что используется при приготовлении селективных питательных сред (молочно-солевой и желточно-солевой агары). На желточно-солевом агаре лецитиназа положительные стафилококки образуют колонии, окруженные венчиком опалесценции, благодаря наличию фермента лецитовителазы. На кровяном агаре вокруг колоний стафилококка образуются зоны альфа-или бета-гемолиза. На жидких питательных средах дают равномерное помутнение, а затем рыхлый хлопьевидный осадок.

6. Антигенная структура

Имеют сложное антигенное строение. У стафилококков выделяют более 50 антигенных субстанций, разделяемых на родовые, видовые и типовые Аг. Антигенными свойствами обладают пептидогликан и тейхоевые кислоты клеточной стенки, поверхностный белок А и капсула.

7. Биохимические свойства

Стафилококки каталаза-положительны, что позволяет дифференцировать их со стрептококками в лабораторных условиях и оксидаза-отрицательны. Стафилококки обладают высокой ферментативной активностью: восстанавливают нитраты, вырабатывают сероводород, разлагают мочевины, ферментируют углеводы с образованием кислоты, активно гидролизуют белки, гиппурат, жиры. По наличию коагулазы стафилококки делят на две группы: коагулаза-положительные — *S.aureus*, и коагулаза-отрицательные — *S.epidermidis* и *S.saprophyticus*. Родовым свойством является ферментация глюкозы в анаэробных условиях с образованием молочной кислоты, что отличает стафилококки от микрококков.

8. Факторы патогенности

Стафилококки — условные патогенны. Факторами патогенности стафилококков являются поверхностные структуры бактериальной клетки, ферменты и токсины.

Капсула защищает бактерии от поглощения полиморфно-ядерными лейкоцитами, способствует адгезии микроорганизмов и их распространению по тканям. При культивировании *in vitro* капсула обычно не образуется.

Адгезины — поверхностные белки, участвующие в процессе адгезии и способствующие колонизации, взаимодействуют с муцином слизистых оболочек, белками внеклеточного матрикса, протеогликанами соединительной ткани и др.

Компоненты клеточной стенки. Стимулируют развитие воспалительных реакций через активацию различных механизмов: стимулируют синтез интерлейкина-1 макрофагами, активируют систему комплемента и служат мощными хемоаттрактантами для нейтрофилов.

- Тейхоевые кислоты активируют систему комплемента по альтернативному пути, свертывающую и калликреин-кининовую системы,
- Белок А (агглютиноген А) неспецифически связывает Fc-фрагменты Ig G (что активирует систему комплемента по классическому и альтернативному пути) и усиливает активность естественных киллеров. Белок А проявляет свойства суперантигена, что совместно с активацией комплемента приводит к развитию местных и системных реакций (анафилаксия, феномен Артюса и др.)

Ферменты. Каталаза разрушает H₂O₂, защищая бактерии от токсических кислородных радикалов. β-лактамазы разрушают молекулы β-лактамовых антибиотиков. Липазы облегчают адгезию и проникновение в ткани. Коагулаза вызывает свертывание плазмы крови. Стафилококки также образуют фибринолизин, гиалуронидазу, лецитиназу, дезоксирибонуклеазу и др. ферменты.

Токсины:

Мембранотоксины (стафилолизины или гемолизины). Выделяют токсины четырех антигенных типов; бактерии способны одновременно синтезировать несколько подобных продуктов. Стафилолизины обуславливают гемолитическую активность стафилококков на кровяном агаре.

- α -гемолизин имеет наибольшее значение, взаимодействует с клеточной мембраной и вызывает локальный протеолиз, воздействует на эпителиоциты, полиморфно-ядерные лейкоциты, фибробласты, гепатоциты, тромбоциты и др.
- β -гемолизин (сфингомиелиназа) проявляет выраженные свойства холодового гемолизина и активен при низких температурах.
- γ -гемолизин — двухкомпонентный гемолизин с умеренной активностью в отношении эритроцитов человека, гемолитическая активность на кровяных средах обычно отсутствует.
- δ -гемолизин — агрегат низкомолекулярных соединений, проявляющих детергентные свойства, которые обуславливают цитотоксичность широкого спектра.

Эксфолиатины А и В вызывают разрушение десмосом зернистого слоя эпидермиса и отслойку рогового слоя. Синтез токсина А (термостабильного) контролируют хромосомные, а токсина В (термолабильного) — плазмидные гены. Эти токсины обладают местным и системным (синдром «ошпаренной кожи») действием. Проявляет свойства суперантигена.

Токсин синдрома токсического шока (TSST-1 — toxic shock syndrome toxin) — экзотоксин, сходный по структуре с энтеротоксинами В и С и обуславливающий развитие специфического симптомокомплекса. Проявляет свойства суперантигена.

Лейкоцидин — экзотоксин, обладающий способностью разрушать лейкоциты многих животных, ингибирующий всасывание воды и активирующий образование цАМФ (одно из звеньев патогенеза стафилококковых диарей).

Энтеротоксины (А-Е) — термостабильные низкомолекулярные белки, проявляющие свойства суперантигена. Эти токсины ответственны за развитие пищевых отравлений. Синтез энтеротоксинов обычно контролируется хромосомными генами.

9. Патогенез

Стафилококки, как и все условно-патогенные микроорганизмы, вызывают оппортунистические инфекции. При целом ряде патологических состояний, ведущих к снижению иммунного статуса организма, стафилококки приобретают способность покидать свои нормальные биотопы на поверхности кожи и слизистых оболочек, преодолевать тканевые барьеры, в норме для них непреодолимые, причем даже и неповрежденные, и транслоцироваться во внутреннюю стерильную среду организма, т. е. в незаселенную экологическую нишу, размножаться там и вызывать типовую патологическую реакцию — воспаление. Клинически это проявляется в виде гнойно-воспалительных процессов различной локализации и степени тяжести — от местных ограниченных до тяжелых генерализованных, таких как сепсис и септикопиемия.

Они способны поражать практически любые ткани организма человека. Выделяют следующие нозологические формы, при которых этиологическим фактором является стафилококк:

- болезни кожи и подкожной клетчатки, из которых у детей наиболее распространенными являются пиодермия, эксфолиативный дерматит; у взрослых — абсцесс, фурункул, гидроадениты, панариции, множественные абсцессы и др.;
- болезни органов дыхания, из которых наиболее часты ангина, плеврит, пневмония;
- болезни нервной системы и органов чувств — менингит, отит, конъюнктивит и др.;
- болезни органов пищеварения — стоматит, перитонит, парапроктит, энтерит, энтероколит, пищевая интоксикация;
- болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани — артриты, остеомиелит, периостит и др.;
- болезни системы кровообращения — эндокардит, перикардит, флебит и др.;
- болезни мочеполовых органов — цистит, уретрит, мастит, эндометрит, орхит и др.;
- стафилококковый сепсис.

Среди патологии, обусловленной *S. aureus* особое место занимают поражения, вызванные действием экзотоксинов:

- Синдром «ошпаренных младенцев» (болезнь Риттера) наблюдают у новорожденных, инфицированных штаммами, продуцирующими эксфолиатину; характерно формирование больших очагов эритемы с последующим образованием пузырей и обнажением мокнущих эрозированных поверхностей, как при термических ожогах.
- Синдром «ошпаренной кожи» (болезнь Лайелла) возникает у более старших детей и взрослых; характерны очаги эритемы, пузыри, тяжелая интоксикация и отхождение субэпидермального слоя.
- Синдром токсического шока характеризуется появлением высокой температурой тела (38,8°C и выше), падением артериального давления с развитием полиорганной дисфункции, скарлатиноподобной сыпью с последующей десквамацией эпителия через 1-2 недели. Этиологическим фактором являются стафилококки, продуцирующие TSST-1 и энтеротоксины В и С.
- Пищевые отравления (токсикоинфекции) характеризуются коротким инкубационным периодом и проявляются рвотой, болями в животе и водянистой диареей. Патогенез поражений связан со способностью энтеротоксинов индуцировать избыточное образование ИЛ-2.

10. Иммуитет

Постинфекционный иммунитет — клеточно-гуморальный, нестойкий и ненапряженный, как при всех оппортунистических инфекциях.

11. Методы лабораторной диагностики

Основной метод диагностики стафилококковых инфекций бактериологический. Из исследуемого материала готовят мазки для первичной бактериоскопии, окрашивают по методу Грама и микроскопируют. Наличие в препаратах грамположительных кокков, располагающихся в виде гроздьевидных скоплений, позволяет поставить предварительный диагноз стафилококковой инфекции. Однако в патологическом материале стафилококки редко образуют типичные скопления, а располагаются поодиночке или небольшими группами.

Посев исследуемого материала проводят на кровяной агар и желточно-солевой агар для получения изолированных колоний. Посевы инкубируют при 37°C в течение суток (табл. 1).

Таблица 1. Схема бактериологического метода диагностики стафилококковых инфекций

1 день	1. Ориентировочная бактериоскопия окраска по Граму: гроздьевидные скопления грам(+) кокков 2. Посев на желточно-солевой агар и кровяной агар с целью получения изолированных колоний
2 день	1. Изучение культуральных свойств (мутные круглые ровные колонии средних размеров кремового, желтого или оранжевого цвета) ЖСА: при наличии лецитиназы вокруг колоний образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком (опалесценция); Кровяной агар: при наличии гемолизина вокруг колоний образуются зоны α- и β-гемолиза; 2. Приготовление мазка, окраска по Граму и изучение морфологических и тинкториальных свойств: гроздьевидные скопления грам(+) кокков 3. Пересев на скошенный агар с целью получения чистой культуры
3-4 день	1. Определение чистоты выделенной чистой культуры макроскопически и микроскопически 2. Идентификация выделенной чистой культуры по <ul style="list-style-type: none"> • морфологическим и тинкториальным свойствам: гроздьевидные скопления грам(+) кокков • культуральным свойствам: мутные круглые ровные колонии средних размеров кремового, желтого или оранжевого цвета (признаком патогенности стафилококков является образование золотистого или желто-лимонного пигмента) • биохимическим свойствам (см.табл 2) • факторам патогенности (наличие плазмокоагулазы, лецитиназы, гемолизина и др.) • фаготипу (фагоидентификация) 3. Определение чувствительности выделенной чистой культуры к антибактериальным препаратам. Особое значение для идентификации стафилококков с высокими вирулентными свойствами и множественной устойчивостью к антибиотикам имеет оценка резистентности к метициллину (MRSA-стафилококки).

На следующий день изучают культуральные свойства. Стафилококки образуют мутные круглые ровные колонии средних размеров кремового, желтого или оранжевого цвета (S-формы). Для определения гемолитической активности выявляют зону полного (β -гемолиза) и неполного (α -гемолиза). Гемолитические свойства бактерий связаны с наличием гемолизина (экзотоксина, мембранотоксина по механизму действия). Лецитиназную активность (способность продукции экзофермента лецитиназы) определяют на желточно-солевом агаре. Вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью образуются зоны опалесценции (помутнения с перламутровым блеском). Для последующей идентификации проводят накопление чистой культуры на скошенном агаре. Для постановки реакции на плазмокоагулазу плазму крови, разведенную в 2 раза, разливают по 0,4 мл в пробирки, вносят одну петлю испытуемой культуры стафилококка и помещают в термостат при 37°C. Оценивают результат через 1, 2, 4 и 24 часа. При наличии плазмокоагулазы происходит свертывание плазмы с образованием сгустка фибрина (гель). Плазмокоагулазная активность является основным идентификационным признаком *S.aureus*.

Для определения ферментации маннита в анаэробных условиях с целью внутривидовой идентификации (табл. 2) используется дифференциально-диагностическая среда, содержащая маннит и индикатор. При расщеплении маннита образуются кислые продукты, изменяющие цвет индикатора в среде (индикатор Андрее — красная окраска, индикатор ВР — синяя).

Таблица 2. Дифференциальные признаки стафилококков

Признак	Вид		
	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
Наличие липохромного пигмента	+/-	-	+
Образование плазмокоагулазы	+	-	-
Образование лецитиназы	+	-	-
Гемолитическая активность	+	-	-
Ферментация маннита в анаэробных условиях	+	-	+
Ферментация углеводов в аэробных условиях:			
• глюкозы	+	+	-
• сахарозы	+	+	+
• лактоза	+	+/-	+/-
• трегалоза	+	-	+
• фруктоза	+	+	+
Чувствительность к новобиоцину	S	S	R
Примечание: (+) — наличие признака, (-) — отсутствие признака, S — чувствительный, R — резистентный.			

Для проведения фагоидентификации используют международный набор фагов (21 тип). Исследуемую культуру засевают в чашки Петри методом газона, подсушивают и наносят каплю фага, предварительно расчертив дно чашки на квадраты. Используют группоспецифические бактериофаги (поливалентные) с целью определения фагогруппы, а затем определяют фаготип с помощью моновалентных бактериофагов.

Важным этапом бактериологического анализа является изучение чувствительности к антибактериальным препаратам с использованием различных методик (диско-диффузионный метод, метод серийных разведений, E-тест).

Для экспресс-идентификации применяют тест латекс-агглютинации с использованием коммерческих частиц латекса, нагруженных антителами, например, «Staphylatex» American Bioscan. Для биохимической идентификации используют системы api Staph (bio Mérieux).

Серологические исследования не имеют принципиального значения, а результаты часто носят противоречивый характер, что связано со сложной антигенной структурой этого

микроорганизма. Иногда для типовой идентификации энтеротоксинов проводят реакцию преципитации в геле со специфическими сыворотками.

Иммунохимические исследования основаны на обнаружении антигенов (ферментов и токсинов) возбудителя в материале от больного с помощью чувствительных серологических реакций.

Молекулярно-генетические методы исследования позволяют выявить ДНК возбудителя в исследуемом материале методом ПЦР.

12. Лечение и профилактика

Тактика лечебных мероприятий определяется особенностями клинических форм. Общие принципы лечения основываются на комплексной терапии, включающей адекватное хирургическое вмешательство (санация гнойных очагов), рациональную антибактериальную терапию и иммунотерапию. Широкое распространение штаммов стафилококков с множественной лекарственной резистентностью делает необходимым назначение антибактериальных препаратов с учетом результатов антибиотикограммы. Предпочтительно назначение антибиотиков широкого спектра действия (полусинтетические пенициллины), обладающие устойчивостью к β -лактамазам бактерий. Высокоэффективны комбинированные препараты, содержащие блокаторы β -лактамаз (амоксиклав — амоксициллин + клавулоновая кислота).

Спектр используемых антибактериальных препаратов:

I. Пенициллины (оксациллин, нафциллин)

II. Цефалоспорины, тетрациклины, аминогликозиды, макролиды, фторхинолоны

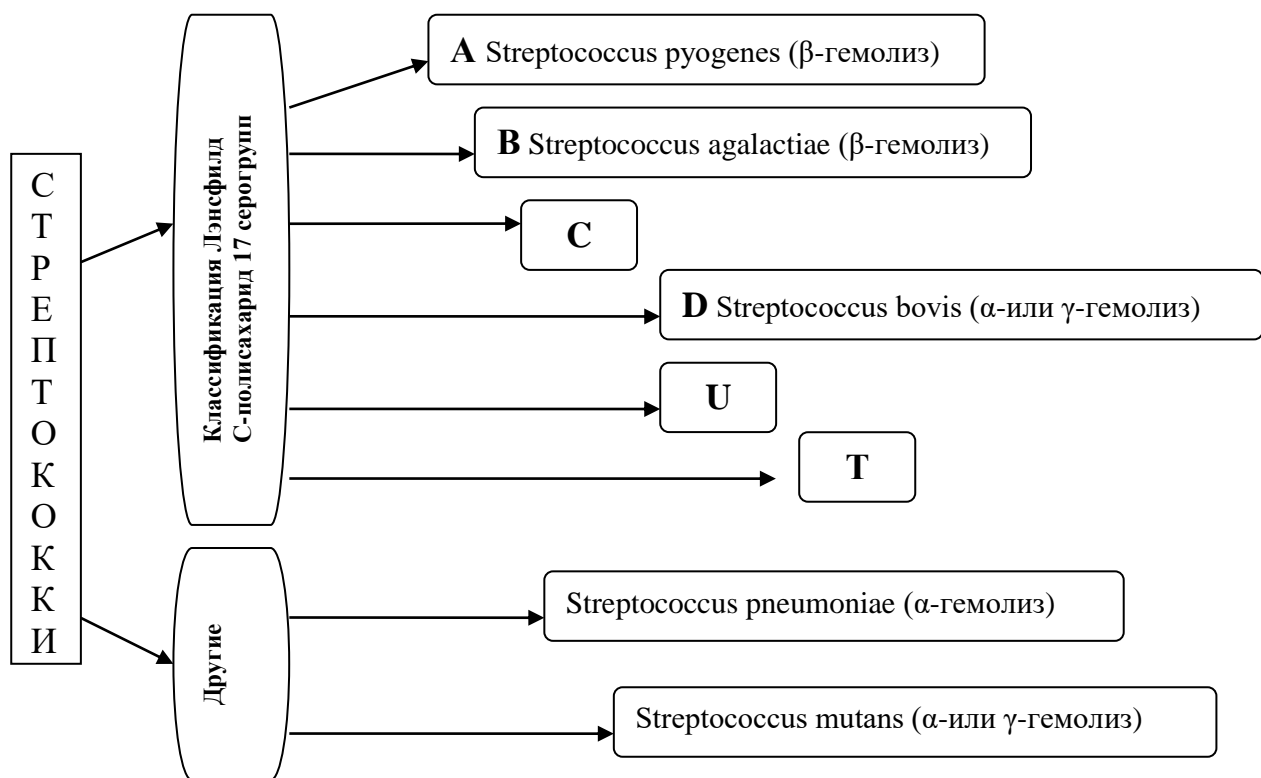
III. Ванкомицин используется в случае MRSA (метициллин резистентных стафилококков)

Создание эффективной вакцины для профилактики поражений у людей и животных — актуальная и сложная проблема прикладной иммунологии. Это обусловлено сложным антигенным строением, отсутствием информации о роли всех антигенных субстанций в развитии искусственной невосприимчивости и наличием большого количества сероваров. В настоящее время существуют убитые вакцины, обеспечивающие образование высоких титров антител, но лишь к антигенам вакцинных штаммов. Для создания антитоксического иммунитета используют стафилококковый анатоксин, но его активность ограничена лишь группой бактерий I фагогруппы. В отдельных случаях вводят стафилококковый иммуноглобулин и противостафилококковую донорскую гипериммунную плазму. С учетом того, что стафилококковые инфекции протекают на фоне иммуносупрессии показано назначение иммуностимуляторов.

Стрептококки

1. Таксономия и классификация

Стрептококки относят к отделу Firmicutes, семейству Streptococcaceae, включающее семь родов, шесть из которых патогенны для человека: Streptococcus, Enterococcus, Aerococcus, Leuconostoc, Pediococcus и Lactococcus. Существуют различные классификации стрептококков: по культуральным особенностям (рост в экстремальных условиях), по гемолитической активности (α -, β - и γ -гемолитические), биохимическим свойствам. Однако наибольшее распространение получила классификация Ребекки Лэнсфилд (1933), основанная на наличии группоспецифических углеводов (С-полисахаридов) в клеточной стенке. В соответствии с этим выделяют 20 серогрупп, обозначаемых заглавными латинскими буквами.



Внутри групп стрептококки разделяют на серовары по специфичности белковых М-, Р- и Т-антигенам. Зеленыящие стрептококки и пневмококки лишены групповых антигенов и не включены в какую-либо серологическую группу.

2. Нозологические формы

Стрептококки являются представителями нормофлоры организма человека и животных. Стрептококки группы А колонизируют кожные покровы и слизистые оболочки человека; группы В колонизируют носоглотку, ЖКТ и влагалище. Стрептококки являются условно-патогенными микробами и не имеют органного тропизма, поэтому для стрептококковых инфекций характерна множественность механизмов, путей и факторов передачи. Стрептококковые инфекции — это большая и разнородная группа острых и хронических, специфических и неспецифических заболеваний (табл. 3).

Таблица 3. Стрептококки, имеющие медицинское значение

Вид	Серогруппа	Гемолиз	Место обитания	Основные лабораторные критерии	Инфекционные заболевания
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	β	Кожа и ротоглотка	ПИР (+), чувствителен к бацитрацину	Фарингиты, импетиго, ревматизм, гломерулонефрит, скарлатина, рожа
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	β	Урогенитальный тракт женщин	САМР (+), гидролизует гипсурат	Неонатальный сепсис и менингиты
<i>Enterococcus faecalis</i> и др. энтерококки	D	α или γ	Кишечник	Растут в присутствии желчи и 6.5% NaCl, гидролизуют эскулин, ПИР (+)	Абсцессы брюшной полости, инфекции мочевыделительной системы, эндокардиты
<i>Streptococcus bovis</i>	D	отс	Кишечник	Растут в присутствии желчи, гидролизуют эскулин, не растут при 6.5% NaCl, разлагают	Эндокардиты, выделен при раке кишечника

Вид	Серогруппа	Гемолиз	Место обитания	Основные лабораторные критерии	Инфекционные заболевания
				крахмал	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	α	Ротоглотка	Чувствительны к оптохину и солям желчных кислот, ферментируют инулин	Пневмония, менингиты, эндокардиты
Зеленящие стрептококки (<i>viridans</i>)	-	α	Полость рта, кишечник	Резистентны к оптохину, не чувствительны к желчи, не растут в присутствии 6.5% NaCl	Эндокардиты, абсцессы, кариес (<i>S.mutans</i>)
<i>Peptostreptococcus</i> (различные виды)	-	α или α с	Полость рта, кишечник	Строгие анаэробы	Абсцессы (чаще полибактериальной этиологии)

3. Эпидемиология и пути передачи

Являются представителями нормофлоры организма человека и животных. Стрептококки группы А колонизируют кожные покровы и слизистые оболочки человека; группы В колонизируют носоглотку, ЖКТ и влагалище. Известны штаммы пневмококка, колонизирующие организм человека и животных.

Источник инфекции — больные люди или носители, значительно реже — больные животные; при пневмококковой инфекции — больные люди и носители. Основные пути передачи — контактный (с заносом в рот грязными руками) и воздушно-капельный, а также через инфицированные пищевые продукты, хранящиеся при комнатной температуре (например, молоко).

Поскольку стрептококки не имеют органного тропизма, то для стрептококковых инфекций характерна множественность механизмов, путей и факторов передачи, хотя доминирует аэрогенная передача воздушно-капельным путем.

Устойчивость в окружающей среде у стрептококков ниже, чем у стафилококков. Стрептококки различных групп, кроме энтерококков, погибают при нагревании до 56°C в течение 30 минут, при 100°C — моментально; хорошо выдерживают высушивание, особенно в белковой среде, сохраняя жизнеспособность, но быстро утрачивая вирулентность. Чувствительны к действию обычно применяемых антисептиков и дезинфектантов.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Стрептококки представлены неподвижными сферическими клетками размером 0,5-2,0 мкм, располагающиеся в мазках парами или короткими цепочками (от греч. streptos — цепочка и kokkos — ягода). Грамположительны, клеточная стенка состоит из трех слоев: наружный слой содержит типоспецифические белковые антигены (M и T), в состав среднего слоя входит групповой полисахарид (C-полисахарид), внутренний слой представлен пептидогликаном. Из клеточной стенки выходят фимбрии, содержащие M-антиген (основной фактор патогенности) и покрытые липотейхоевой кислотой, являющейся основным адгезином. Некоторые виды имеют капсулу. Стрептококки групп А, В и С имеют капсулу, построенную из гиалуроновой кислоты, аналогичной входящей в состав соединительной ткани. Такая капсула обладает низкими иммуногенными свойствами и не распознается как чужеродный агент. Спор не образуют. При неблагоприятных воздействиях стрептококки способны образовывать L-формы.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Факультативные анаэробы; капнофилы; некоторые микроаэрофилы, предпочитают анаэробные условия. Растут в интервале температур 25-45°C; оптимум 37°C. Требовательны к средам культивирования. Растут только на сложных питательных средах с добавлением крови, сыворотки, асцитической жидкости, углеводов. Обычно образуют мелкие (1-2 мм), мутноватые, круглые колонии (S-формы), некоторые образуют слизистые колонии. При

росте на кровяном агаре образуют колонии с зоной α -(частичный, зеленеющий), β -(полный) и γ -гемолита (визуально невидимый). В бульоне стрептококк дает придонно-пристеночный рост в виде хлопьев или зерен, оставляя среду прозрачной.

6. Антигенная структура

По наличию специфических полисахаридов (С-полисахарид, группоспецифический) стрептококки делят на 20 серогрупп по Лэнсфилд, которые выявляются в реакции преципитации. Внутри групп стрептококки разделяют на серовары по специфичности белковых антигенов М, Р (нуклеопротеин) и Т, выявляемые в реакции агглютинации.

М-белок, типоспецифический антиген стрептококков группы А, *S.pyogenes* (от англ. mucoid, слизистый, т.к. колонии штаммов-продуцентов имеют слизистую консистенцию) — основной фактор вирулентности стрептококков. Антитела к нему обеспечивают длительную невосприимчивость к повторному заражению, однако выделяют более 80 сероваров белка М, что значительно снижает эффективность гуморальных защитных реакций. Т-антиген, в отличие от М-белка не связан с вирулентными свойствами стрептококков; не кислотоустойчив, термолабилен.

7. Биохимические свойства

Ферментативная активность ниже, чем у стафилококков. Хемоорганотрофы; метаболизм бродильный; клинически значимые виды ферментируют глюкозу с образованием молочной кислоты. Характерными свойствами стрептококков являются отсутствие каталазной активности и способность большинства видов лизировать эритроциты. Биохимическая идентификация, в основном, используется для стрептококков, не имеющих С-полисахарида и для негемолитических видов, поскольку в данном случае сероидентификация невозможна.

Для дифференцировки пневмококка используется проба с оптохином (угнетает их рост); способность ферментировать инулин и чувствительность к желчи (дезоксихолатная проба).

8. Факторы патогенности

Белок М (фимбриальный белок) — основной фактор патогенности. Обладает антифагоцитарным действием, непосредственно действуя на фагоциты или маскируя рецепторы для компонентов комплемента и опсонин, адсорбируя на своей поверхности фибриноген, фибрин и продукты его деградации. Белок также проявляет свойства суперантигена, вызывая поликлональную активацию лимфоцитов и образование антител с низким аффинитетом. Подобные свойства играют существенную роль в нарушении толерантности к тканевым изоантигенам и развитии аутоиммунной патологии.

Капсула защищает стрептококков от антимикробного потенциала фагоцитов и облегчает адгезию к эпителию. Капсула построена из гиалуроновой кислоты и обладает низкой иммуногенностью. Бактерии способны самостоятельно разрушать капсулу при инвазии в ткани за счет синтеза гиалуронидазы.

С5а-пептидаза — фермент, подавляющий активность фагоцитов за счет расщепления и инактивации С5а компонента комплемента, который является мощным хемоаттрактантом.

Стрептолизин О (от англ. oxygen sensitive, чувствительный к кислороду) проявляет свойства гемолитина, разрушая эритроциты в анаэробных условиях. Проявляет иммуногенные свойства, титры антител к нему имеют прогностическое значение.

Стрептолизин S (от англ. stable, устойчивый), не чувствителен к кислороду, не несет антигенной нагрузки и вызывает поверхностный гемолитиз на кровяных средах. Оба гемолитина разрушают не только эритроциты, но и другие клетки (фагоциты, кардиомиоциты и др.).

Эритрогенные (пирогенные) токсины весьма схожи с токсинами стафилококков. Синтезируются стрептококками группы А; иммунологически выделяют три типа (А, В, С) токсинов. Их действие связано с развитием стрептококкового токсического шока и скарлатины. Эритрогенные токсины обладают свойствами суперантигенов, оказывают митогенное действие на Т-лимфоциты, а также стимулируют секрецию макрофагами ИЛ-1 и ФНО.

Кардиогепатический токсин синтезируют некоторые штаммы стрептококков группы А. Он вызывает поражения миокарда и диафрагмы, а также образование гигантоклеточных гранул в печени.

Стрептокиназа (фибринолизин) активирует пламиноген, что приводит к образованию пламина и растворению фибриновых волокон.

Стрептодорназа (ДНК-аза) четырех типов продуцируется стрептококками группы А. Выявление антител к ДНК-азе используется в диагностике различных осложнений. Очищенная смесь стрептокиназы и стрептодорназы используется для рассасывания тромбов, фибриновых и гнойных экссудатов.

Перекрестные реакции. Стрептококки инициируют выраженную воспалительную реакцию за счет продукции более 20 растворимых веществ. Патогенез ревматических поражений связан с иммунными механизмами, в частности перекрестная реакция с миокардиоцитами и белком М возбудителя. Весьма сходны механизмы повреждения почек при острых гломерулонефритах, обусловленных депонированием иммунных комплексов (стрептококк — IgG) на базальной мембране. С одной стороны, они активируют комплементарный каскад, что стимулирует иммунный ответ, с другой — за счет нарушения аутоотолерантности и антигенной мимикрии индуцируют клеточные цитотоксические реакции.

9. Патогенез

Стрептококки вызывают оппортунистические инфекции; патогенез аналогичен патогенезу стафилококковых поражений и обусловлен действием многочисленных факторов патогенности микроба. Например, патогенез большинства пневмоний включает аспирацию слюны, содержащей пневмококки, и проникновение бактерий в нижние отделы воздухоносных путей. Существенное значение имеет нарушение защитных дренирующих механизмов — кашлевого толчка и мукоцилиарного клиренса.

Для стрептококковых инфекций характерно поражение различных органов и тканей организма человека. Стрептококковые инфекции подразделяют на:

- острые стрептококковые заболевания, при которых стрептококк является главным или единственным возбудителем. Сюда относятся скарлатина, рожа, ангина, импетиго, острый гломерулонефрит, острый и подострый бактериальные эндокардиты, послеродовой сепсис;
- хронические стрептококковые заболевания, при которых стрептококк — главный или единственный возбудитель. Сюда относятся ревматизм и хронический тонзиллит;
- острые и хронические заболевания, при которых стрептококк является одним из множества возбудителей. В эту группу включают различные гнойно-воспалительные заболевания.

10. Иммуитет

Постинфекционный иммунитет нестойкий и ненапряженный, как при всех оппортунистических инфекциях.

11. Методы лабораторной диагностики

Лабораторная диагностика включает бактериологический и серологический методы, а при подозрении на пневмококковую инфекцию — бактериоскопический и биологический.

Материал для исследования определяется клинической картиной болезни: кровь, гной, моча, ликвор, отделяемое зева и др. Мазки из патологического материала для первичной бактериоскопии окрашивают по Граму и микроскопируют. При положительном результате обнаруживают цепочки или пары грамположительных кокков. Пневмококки имеют овальную или ланцетовидную форму, располагаются парами, окруженными толстой капсулой.

Исследуемый материал засевают на кровяной агар Колумбия и инкубируют при 37°C в течение 18-24 часов. На кровяном агаре стрептококки образуют бесцветные мелкие S-формы, окруженные зоной α -, β - и γ -гемолиза. Из части материала, взятого из колоний готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. Для получения чистой культуры

подозрительные колонии пересевают в пробирки со скошенным кровяным агаром или сахарным бульоном. Идентификация выделенной чистой культуры проводится на основании изучения ряда свойств: морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических и антигенных (табл. 4)

Таблица 4. Схема бактериологического метода диагностики стрептококковых инфекций

1 день	1. Ориентировочная бактериоскопия окраска по Граму: пары или цепочки грам(+) кокков 2. Посев на кровяной агар Колумбия с целью получения изолированных колоний
2 день	1. Изучение культуральных свойств (мелкие бесцветные S-колонии с зонами α-, β- и γ-гемолиза); 2. Приготовление мазка, окраска по Граму и изучение морфологических и тинкториальных свойств: пары и цепочки грам(+) кокков 3. Пересев на скошенный кровяной агар или сахарный бульон с целью получения чистой культуры
3-4 день	1. Определение чистоты выделенной чистой культуры макроscopicически и микроскопически 2. Идентификация выделенной чистой культуры по <ul style="list-style-type: none"> • морфологическим и тинкториальным свойствам: пары и цепочки грам(+) кокков • культуральным свойствам: мелкие бесцветные S-формы с зонами α-, β- и γ-гемолиза на кровяном агаре; придонно-пристеночный рост с образованием зерен и хлопьев на сахарном бульоне, среда остается прозрачной; • биохимическим свойствам*: для полной оценки биохимических свойств используют идентификационные тест-системы API 20 Strep • антигенным свойствам: реакция преципитации с полисахаридным преципитином C, выделенным из чистой культуры и сыворотками серогрупп А, В, С и др.; затем определяют серовар в реакции латекс-или коагуляции. 3. Определение чувствительности выделенной чистой культуры к антибактериальным препаратам.

Примечание: Биохимическая идентификация, в основном, используется для стрептококков, не имеющих С-полисахарида и для негемолитических видов, поскольку в данном случае сероидентификация невозможна.

Серологический метод диагностики используется при подозрении на ревматический процесс и гломерулонефрит, а также позволяет выявить носителей. Определяют титр сывороточных антител к стрептолизину О или стрептодорназе.

Определение антител к О-стрептолизину

Реакция основана на подавлении (нейтрализации) антителами сыворотки крови способности О-стрептолизина вызывать гемолиз. Реакцию ставят со стандартным сухим О-стрептолизинном.

Компоненты реакции: исследуемая сыворотка, О-стрептолизин, 3,5% взвесь эритроцитов, фосфатный буфер.

Для постановки реакции исследуемую сыворотку прогревают при 56°C в течение 30 минут и разводят фосфатным буфером 1:50, 1:250, 1:1000. Диагностический препарат О-стрептолизина также разводят буфером. К каждому разведению исследуемой сыворотки вносят 1 мл О-стрептолизина, инкубация 45 мин при 37°C, а затем по 0,2 мл взвеси эритроцитов, инкубация 60 мин при 37°C. После инкубации отмечают последнюю пробирку, в которой сыворотка еще нейтрализует рабочую дозу О-стрептолизина (гемолиз отсутствует). Титр сыворотки выражают числом единиц анти-О-стрептолизина (АЕ St-O) в 1 мл (указаны на демонстрационных пробирках). Титр анти-О-стрептолизина до 250 АЕ St-O обнаруживается у практически здоровых людей. При ревматическом процессе с первых дней болезни антитела выявляют в высоких титрах — 500 АЕ St-O и выше.

12. Лечение и профилактика

Основу лечения составляет адекватная антибактериальная терапия. Лечение ревматизма проводят пенициллинами короткого действия, профилактику пенициллинами длительного

действия. Среди пневмококков часто встречаются штаммы, резистентные к пенициллинам; химиотерапию проводят антибактериальными препаратами к которым выявлена чувствительность (цефалоспорины, левомицетин, ванкомицин и др.). Лечебные иммунобиологические препараты против стрептококков не разработаны.

Специфическая профилактика стрептококковых инфекций не разработана. Проводится неспецифическая профилактика, включающая комплекс мер, направленных на ликвидацию источника инфекции, выявление и лечение больных и носителей инфекции, соблюдение санитарно-гигиенического режима в ЛПУ, мер асептики, антисептики, дезинфекции и стерилизации.

Для профилактики пневмококковых инфекций используется поливалентная вакцина (см. *S.pneumoniae*).

Стрептококки группы А (*Streptococcus pyogenes*)

Стрептококки группы А обнаруживают повсеместно. Они чаще колонизируют кожные покровы и слизистые оболочки человека, а в холодный сезон частота носительства в носоглотке у школьников может достигать 25%. Резервуаром служит больной человек или носитель; основные пути передачи — контактный и воздушно-капельный, а также через инфицированные продукты, хранящиеся при комнатной температуре.

Факторы патогенности. Основной фактор патогенности белок М (фимбриальный белок). Адгезия микроорганизмов происходит при участии липотейхоевых кислот (адгезинов), покрывающих поверхностные фимбрии. Важную роль играют и другие факторы патогенности: капсула, С5а-пептидаза, стрептолизин О и S, эритрогенные токсины, кардиогепатический токсин, стрептокиназа, стрептодорназа, гиалуронидаза и др.

Клинические проявления. *Фарингит* — наиболее типичное проявление стрептококковой инфекции. Характерны боль в горле, лихорадка, регионарная лимфаденопатия.

Скарлатина — острое инфекционное (специфическое) экзантемное заболевание, обусловленное действием стрептококкового токсина (эритрогенного) и характеризующееся появлением точечных высыпаний или мелких пятен интенсивно красного цвета, появляющихся сначала на шее и верхней части грудной клетки, а затем принимающих генерализованную форму. Характерны ангина, лимфадениты. Патогномичным клиническим признаком является эритема языка (малиновый язык).

Кожные инфекции. Основные кожные инфекции, вызванные стрептококками группы А — флегмона, рожа и пиодермия-импетиго. В мягких тканях эти бактерии вызывают некротизирующие фасциты и редко гангренозные поражения. Чаще они развиваются на месте предшествующей травмы.

Синдром токсического шока. Выделенный в отдельную нозологическую форму стрептококковый синдром токсического шока развивается как осложнение целлюлитов, фасцитов и бактериемии. Клинические проявления аналогичны таковым при септических шоках, а смертность может достигать 30%.

Острая ревматическая лихорадка может развиваться как осложнение носоглоточной инфекции у предрасположенных лиц. Лихорадка сопровождается острым мигрирующим полиартритом, малой хореей, кардитами. Наиболее серьезные осложнения — острая сердечная недостаточность и формирование приобретенных пороков сердца на фоне септических эндокардитов.

Острый гломерулонефрит является более редким осложнением, развивающимся после перенесенной стрептококковой инфекции (фарингит, ангина, пиодермия). Поражения вызывают М-серовары стрептококков. Тяжесть заболевания варьирует от бессимптомных форм, выявляемых только лабораторно до острой почечной недостаточности.

Микробиологическая диагностика. Основу диагностики составляет выделение и идентификация возбудителя, (бактериологический метод) и обнаружение антител в сыворотке крови больного (серологический метод).

Через 24 часа на кровяном агаре стрептококки группы А образуют блестящие вязкие колонии. В жидких средах бактерии дают придонный, иногда поднимающийся вверх рост.

Весьма информативные методы раннего выявления стрептококков — определение чувствительности к антимикробным агентам диско-диффузионным методом. Для дифференцировки стрептококков группы А от прочих β-гемолитических стрептококков применяют тест чувствительности к бацитрацину, к которому стрептококки группы А чувствительны. Более специфичен тест гидролиза пирролидонил-β-нафтиламида (ПИР-тест). *S. pyogenes* — единственный стрептококк, дающий положительную реакцию. Для проведения ПИР-теста в пробирки вносят полоски фильтровальной бумаги, пропитанные ПИР. Под действием бактериальных пептидаз ПИР расщепляется до β-нафтиламида, и после внесения 0,01% раствора *p*-диметиламиноциннамальдегида полоски окрашиваются в вишнево-красный цвет.

Лечение. Основу терапии составляет адекватная антибактериальная химиотерапия.

Спектр используемых антибактериальных препаратов

- I пенициллины (бензилпенициллин) цефалоспорины, тетрациклины, аминогликозиды
- II макролиды (кларитромицин или азитромицин) для лиц с аллергическими реакциями на пенициллины, фторхинолоны и др.

Профилактика. Специфическая профилактика отсутствует.

Стрептококки группы В (*Streptococcus agalactiae*)

Стрептококки группы В обычно колонизируют носоглотку, ЖКТ и влагалище; подавляющую часть изолятов составляет *S. agalactiae*. Стрептококки группы В вызывают менингиты и септицемии новорожденных. Наиболее типичен вертикальный путь заражения — при прохождении плода по родовым путям, инфицированным стрептококками. В ряде случаев *S. agalactiae* вызывает пневмонии, которые чаще возникают на фоне ОРВИ и обусловлены снижением местной иммунной защиты и активацией микрофлоры зева и носоглотки.

Факторы патогенности. В основе патогенеза гематогенное диссеминирование возбудителя, обусловленное дефицитом специфических антител и компонентов комплемента. Факторами патогенности являются капсула, обладающая у стрептококков группы В иммуногенными свойствами, в отличие от бактерий группы А, и нейраминидаза, участвующая в процессах адгезии.

Клинические проявления. Среди поражений, вызываемых стрептококками группы В доминирует патология новорожденных (бактериемия, менингиты, пневмонии). У рожениц стрептококки группы В вызывают эндометриты, поражения мочевыводящих путей и осложнения хирургических ран после кесарева сечения.

Микробиологическая диагностика. Принципы микробиологической диагностики аналогичны таковым при выделении стрептококков группы А. *S. agalactiae* обычно не чувствителен к бацитрацину. Весьма специфичен тест гидролиза гиппурата. Обычно используют для дифференцировки со *S. pyogenes* (реакция отрицательная). Другая дифференцирующая реакция САМР-тест, основанный на феномене усиления гемолитического действия золотистого стафилококка в присутствии гемолизинов других бактерий. Дальнейшую идентификацию проводят путем серотипирования в реакции латекс-агглютинации или коаггутинации с использованием моноклональных антител, меченых флюорохромами.

Лечение. Основа терапии рациональная антибактериальная химиотерапия.

Спектр используемых антибактериальных препаратов

- I пенициллины (бензилпенициллин), цефалоспорины, тетрациклины
- II аминогликозиды для лиц с угрожающими жизни состояниями, макролиды, фторхинолоны и др.

Профилактика. Специфическая профилактика отсутствует.

Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*)

Пневмококк является одним из основных возбудителей внебольничных бактериальных пневмоний (2-4 случая на 1000 человек). Наиболее подвержены инфекции дети и лица преклонного возраста. Резервуар инфекции — больные и носители, основной путь передачи контактный, а в период вспышек также воздушно-капельный. В подавляющем большинстве

инфекция развивается на фоне сниженной резистентности организма. Пик заболевания приходится на холодное время года.

Морфологические и тинкториальные свойства. Пневмококки представлены неподвижными овальными или ланцетовидными кокками диаметром около 1 мкм. В мазках из клинического материала располагаются парами, окруженными толстой капсулой.

Культуральные свойства. Растут на питательных средах с добавлением крови, сыворотки или асцитической жидкости. Образуют нежные, полупрозрачные, четко очерченные колонии диаметром 1 мм, с зоной α -гемолита на кровяном агаре.

Факторы патогенности. В большинстве случаев пневмонии развиваются после аспирации слюны, содержащей *S. pneumoniae*. Затем бактерии проникают в нижние отделы дыхательных путей и вызывают формирование воспалительных инфильтратов с нарушением гомеостаза легочной ткани. Основными факторами патогенности являются капсула и субстанция С. Капсула защищает от микробицидного действия фагоцитов и опсоинов. Субстанция С — тейхоевая кислота клеточной стенки, содержащая холин и специфически взаимодействующая с С-реактивным белком, что приводит к активации комплементарного каскада.

Клинические проявления. Пневмококки вызывают острую бактериальную пневмонию, стрептококковые менингиты, средние отиты, мастоидиты и др.

Микробиологическая диагностика. Основу диагностики составляют выделение и идентификация возбудителя (бактериологический метод). Материал необходимо исследовать как можно быстрее, т.к. бактерии подвержены аутолизу. При первичной бактериоскопии обнаруживают ланцетовидные диплококки и нейтрофилы. После культивирования для дифференцировки от других стрептококков используют тест чувствительности к оптохину, который угнетает рост 100% клинических изолятов. От зеленеющих стрептококков пневмококки отличает способность ферментировать инулин, а также чувствительность к солям желчных кислот (дезоксихолатная проба) в присутствии которых происходит лизис пневмококков.

Лечение. Адекватная антибактериальная терапия. Пенициллины являются препаратами выбора, однако встречаются и резистентные штаммы.

Спектр используемых антибактериальных препаратов

- I пенициллины (бензилпенициллин) кроме резистентных штаммов
- II цефалоспорины (цефотаксим и цефтриаксон), тетрациклины, аминогликозиды, макролиды, фторхинолоны
- III ванкомицин (наиболее резистентные штаммы сохраняют чувствительность к ванкомицину)

Профилактика. Для специфической профилактики пневмококковых инфекций разработана поливалентная вакцина, включающая капсульные полисахаридные антигены 23 сероваров, вызывающих 90% гематогенных инфекций. Иммунизация показана группам повышенного риска; проводят двукратно с интервалом 5-10 лет.

I. План практической работы

1. Приготовить мазок из гноя больного фурункулезом или фекалий ребёнка при стафилококковом энтероколите, окрасить по Граму, микроскопировать, зарисовать.

Приготовление мазка. Мазок выполняют на чистом, обезжиренном предметном стекле, по поверхности которого капля воды должна растекаться равномерно. Для очистки стекла необходимо натереть его кусочком мыла и удалить мыло с помощью сухой или влажной марлевой салфетки. Для приготовления мазка на обратной стороне предметного стекла маркируют карандашом по стеклу зону с мелкую монету, бактериологической петлей наносят исследуемый материал и равномерно распределяют в маркированной зоне. Препарат высушивают при комнатной температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает равномерно и быстро. Если же высушивание препарата замедлено, то препарат подогревают, держа стекло мазком вверх, в потоке теплого воздуха над пламенем горелки. Для последующей фиксации предметное стекло проводят через верхнюю, наиболее горячую часть пламени горелки в положении мазком вверх 3 раза (в течение 3-5 сек).

Этапы окраски по Грамму:

1. На фиксированный мазок поместить фильтровальную бумажку, пропитанную генцианвиолетом, смочить водой, 2-3 минуты.
2. Снять бумажку, слить с препарата оставшуюся краску и налить раствор Люголя на 1 минуту.
3. Для дифференцирования нанести на мазок этиловый спирт и обесцветить в течение 3-6 с, промыть водой.
4. Нанести фуксин Пффейфера (водный раствор фуксина) и докрасить 1-2 мин, промыть водой, высушить.

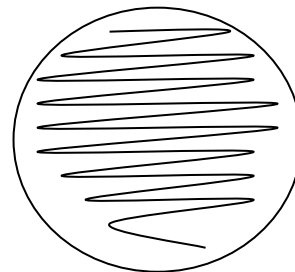
Порядок проведения иммерсионной микроскопии:

1. Поднять конденсор микроскопа до уровня предметного стекла и полностью открыть диафрагму. Включить осветитель и установить максимальную освещенность поля зрения с помощью зеркала;
2. На мазок нанести каплю иммерсионного масла, поместить препарат на предметный столик микроскопа. Поставить в рабочее положение иммерсионный объектив, маркированный черной линией;
3. Под контролем зрения, глядя сбоку, с помощью макровинта осторожно опустить тубус микроскопа до погружения иммерсионного объектива в каплю масла. Глядя в окуляр, очень медленно поднимать тубус при помощи макровинта, пока не появится изображение объекта. Далее провести точную фокусировку с помощью микровинта;
4. В процессе микроскопии следует медленно передвигать препарат, установить наилучшее поле зрения и изучить морфологические (форму и расположение) и тинкториальные (окрашивание) свойства микроорганизмов;
5. По окончании микроскопии поднять тубус и после этого снять препарат с предметного столика микроскопа. Протереть фронтальную линзу иммерсионного объектива чистой марлевой салфеткой, смоченной спиртом, и повернуть револьвер таким образом, чтобы ни один из объективов не был направлен в сторону конденсора.

2. Произвести посев гноя или фекалий на ЖСА с целью выделения чистой культуры стафилококков методом истощающего штриха.

Желточно-солевой агар — элективная (селективная) питательная среда, поскольку содержит высокие концентрации соли (8-10%), что позволяет ингибировать рост сопутствующей микрофлоры, не препятствуя размножению стафилококков. ЖСА одновременно позволяет дифференцировать лецитиназа-положительные и лецитиназа-отрицательные стафилококки, вследствие присутствия желтка куриного яйца. Лецитиназа-положительные стафилококки продуцируют фермент лецитиназу, который расщепляет лецитин куриного желтка и вокруг колоний образуется зона помутнения с перламутровым блеском.

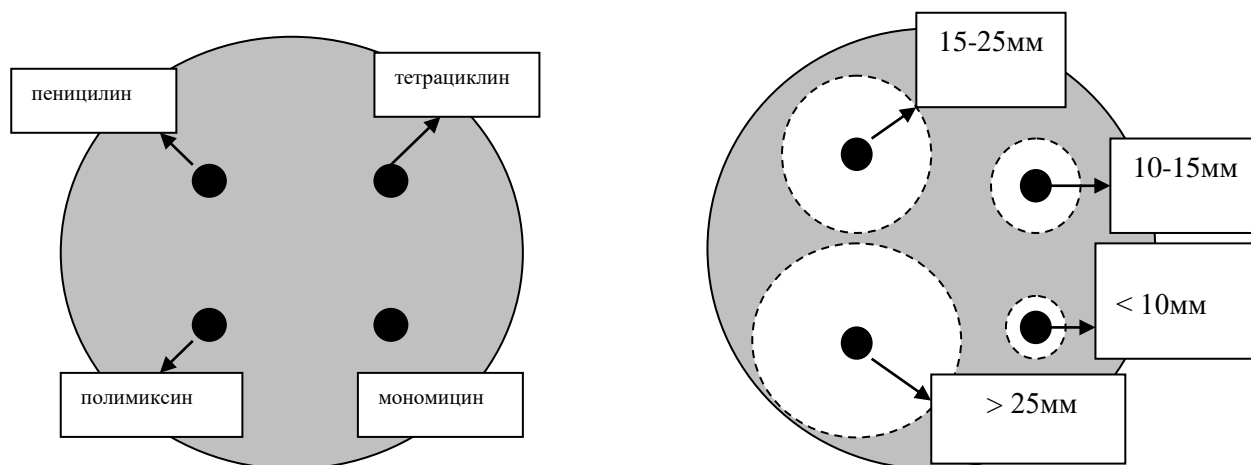
Посев производится методом истощающего штриха с целью получения изолированных колоний. Исследуемый материал втирают петлей в поверхность среды у края чашки, и затем распределяют параллельными штрихами по поверхности среды с целью получения изолированных колоний.



3. Учесть опыт определения чувствительности микрофлоры гноя или фекалий к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом.

Диско-диффузионный метод используется для оценки эффективности антибиотиков в клинических условиях. Питательную среду (Мюллера-Хинтона, АГВ) разливают в чашки, помещенные на строго горизонтальной поверхности, заполнив их на одинаковую высоту 4 мм (25 мл среды для чашек с внутренним диаметром 9 см). Клинический материал (гной), выделенную от больного, засевают на поверхность питательного агара сплошным газоном.

После посева крышку чашки приоткрывают не более чем на 15 мин и дают поверхности среды подсохнуть. Затем стерильным пинцетом следует положить на поверхность агара бумажные диски, пропитанные раствором определенного антибиотика, и слегка придавить. Расстояние между дисками и краем чашки должно быть не менее 15-20 мм. Чашки инкубируют около 18-24 ч при 37°C в перевернутом положении. При наличии чувствительной к антибиотику флоры вокруг соответствующих дисков отмечается зона



угнетения роста микроорганизмов. Диаметр зоны измеряют в мм, определяя чувствительность: высокая (>25 мм), средняя (15-25 мм), низкая (10-15 мм).

4. Учеть результаты определения факторов патогенности стафилококков

Гемолизин (экзофермент, по механизму действия мембранотоксин) определяют путем посева испытуемой культуры на чашки Петри с кровяным агаром. Посевы инкубируют при 37°C в течение 18-24 часов. Вокруг колоний гемолитических микроорганизмов образуются зоны полного (β) или неполного, зеленыщащего (α) гемолиза.

Для обнаружения *лецитиназы* (*лецитовитеказы*) производят посев исследуемой культуры на питательный агар с лецитином (желточный агар). Вокруг колоний бактерий, выделяющих фермент, образуется зона помутнения с перламутровым блеском.

Плазмокоагулаза выявляется при посеве испытуемой культуры в 0,4 мл стерильной цитратной плазмы крови. Посевы инкубируют при 37°C в течение 2-5 ч. В случае образования фермента происходит свертывание плазмы (образование геля), а в контроле без стафилококка она остается жидкой (золь).

5. Микроскопировать с масляной иммерсией готовые микропрепараты различных видов стрептококков (*S.pyogenes*, *S.pneumoniae*), описать морфологические и тинкториальные свойства, зарисовать

S.pyogenes в мазках, окрашенных по Граму представлены неподвижными сферическими или слегка вытянутыми кокками размером 0,5-2,0 мкм, располагающиеся парами или короткими цепочками (от греч. streptos — цепочка и kokkos — ягода); грамположительны.

Пневмококки (*S.pneumoniae*) представлены неподвижными овальными или ланцетовидными кокками диаметром около 1 мкм. В мазках из клинического материала располагаются парами, окруженными толстой капсулой.

6. Произвести учёт реакции, поставленной на определение антител к О-стрептолизину в диагностике ревматизма.

Реакция основана на подавлении (нейтрализации) антителами сыворотки крови способности О-стрептолизина вызывать гемолиз. Реакцию ставят со стандартным сухим О-стрептолизинном. Компоненты реакции: 1. Исследуемая сыворотка

2. О-стрептолизин
3. 5% взвесь эритроцитов
4. фосфатный буфер

Для постановки реакции исследуемую сыворотку прогревают при 56°C в течение 30 минут и разводят фосфатным буфером 1:50, 1:250, 1:1000. Диагностический препарат О-

стрептолизина также разводят буфером и применяют в количестве 0,3 мл, в котором содержится 1 рабочая доза О-стрептолизина. Рабочая доза — это количество О-стрептолизина, которое почти полностью нейтрализуется половиной международной единицы анти-О-стрептолизина стандарта ГИСК. О-стрептолизин в рабочей дозе должен вызывать полный лизис 0,2 мл 5% взвеси эритроцитов. Разведенную сыворотку и другие ингредиенты разливают по пробиркам согласно таблице №5 инкубируют. После инкубации отмечают последнюю пробирку, в которой сыворотка еще нейтрализует рабочую дозу О-стрептолизина (гемолиз отсутствует).

Таблица 5. Схема постановки антистрептолизиновой реакции с О-стрептолизином

Ингредиент	Количество материала (мл)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Контроль
Номера пробирок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Контроль
Исследуемая сыворотка 1:50	0,4	0,2	0,15	0,1	-	-	-	-	-	-	-	--
Исследуемая сыворотка 1:250	-	-	-	-	0,4	0,3	0,25	0,2	0,1	-	-	--
Исследуемая сыворотка 1:1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,1	--
Фосфатный буфер, мл	0,1	0,3	0,35	0,4	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,25	0,25	0,8 0,5
Стрептолизин О, мл	По 1 мл в каждую пробирку, инкубация 45 мин при 37° С											— 0,3
5% взвесь эритроцитов, мл	По 0,2 мл в каждую пробирку, инкубация 1 ч при 37° С											— -
Число АЕ St-O в 1 мл в международных единицах	65	125	165	250	313	413	500	625	1250	2000	3000	--

Титр сыворотки выражают числом единиц анти-О-стрептолизина (АЕ St-O) в 1 мл (указаны на демонстрационных пробирках). Титр анти-О-стрептолизина до 250 АЕ St-O обнаруживается у практически здоровых людей. При ревматическом процессе с первых дней болезни антитела выявляют в высоких титрах — 500 АЕ St-O и выше.

7. Решение ситуационных задач

Модуль II «Стафилококковые и стрептококковые инфекции. Инфекции, вызываемые спорообразующими и неспорообразующими анаэробами»

Занятие № 2

ТЕМА: Микробиологическая диагностика инфекций, вызываемых спорообразующими и неспорообразующими анаэробами

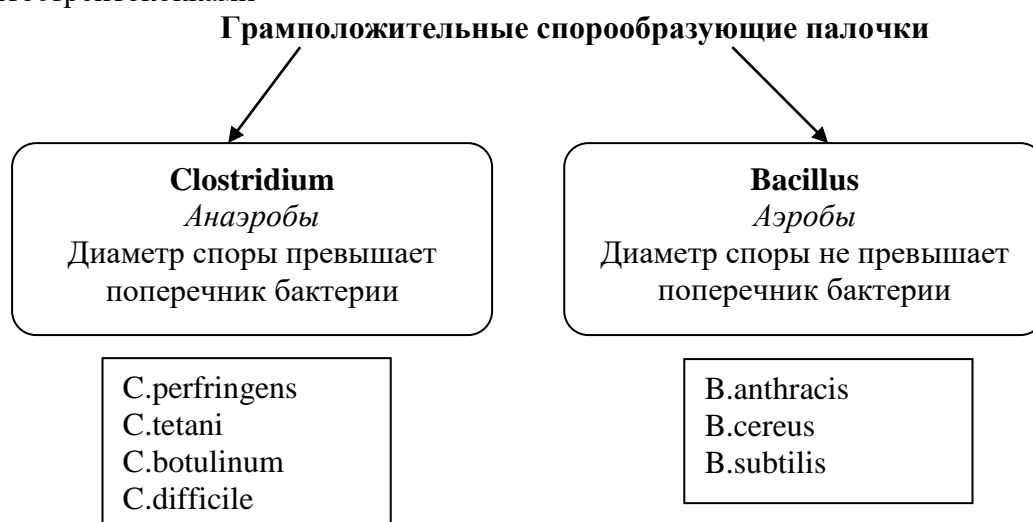
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ знать: классификацию и таксономию, морфологические, тинкториальные, культуральные, антигенные, биохимические свойства, факторы патогенности, особенности культивирования возбудителей газовой гангрены, столбняка; ботулизма; эпидемиологию, патогенез, микробиологическую диагностику и биопрепараты для этиотропного лечения и специфической профилактики газовой гангрены, столбняка, ботулизма; основные биологические свойства бактероидов, порфиромонад, превотелл, фузобактерий, вейлонелл, пептококков, пептострептококков; микробиологическую диагностику; методы профилактики и терапии

уметь: приготавливать мазки из раневого отделяемого, окрашивать их по Граму и Ожешко, микроскопировать с масляной иммерсией, определять морфологические и тинкториальные свойства анаэробов, учитывать реакцию нейтрализации с учётом на белых мышах, идентифицировать чистые культуры неспорообразующих анаэробов с помощью АРІ-систем

Задание на дом

1. Вопросы для самоподготовки:

- 1) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики газовой анаэробной инфекции
- 2) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики столбняка
- 3) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики ботулизма
- 4) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики инфекций, вызываемых неспорообразующими анаэробами: бактероидами, порфиромонадами, превотеллами, фузобактериями, вейлонеллами, пептококками и пептострептококками



Клостридии — возбудители газовой гангрены

1. Таксономия и классификация

Род *Clostridium* семейства *Vacillaceae* отдела *Firmicutes* включает около 20 видов, которые играют роль в патологии человека: *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi*, *Clostridium septicum* — возбудители газовой анаэробной гангрены, *Clostridium tetani* — возбудитель столбняка, *Clostridium botulinum* — возбудитель ботулизма, *Clostridium difficile* является этиологическим фактором псевдомембранозного колита.

2. Нозологические формы

Clostridium perfringens — вид бактерий рода *Clostridium*, который занимает первое место по частоте встречаемости и тяжести, вызываемой им, газовой гангрены. *C. perfringens* также является причиной развития пищевых токсикоинфекций, поскольку вырабатывает энтеротоксин. По способности образовывать токсины микроорганизмы разделяют на 6 сероваров: А, В, С, D, Е, F. Для человека патогенны *C. perfringens* А, С и D. Серовары В, С, D, Е вызывают заболевания у сельскохозяйственных животных. *C. perfringens* типов А, С и D вызывают газовую гангрену, некротический энтерит и пищевые токсикоинфекции у человека и животных.

Газовая гангрена (от греч. gangraina, разъедающая язва) — раневая инфекция, вызываемая клостридиями (*C. perfringens*, *C. novyi*, *C. oedematiens*, *C. histolyticum*, *C. septicum* и др.); характеризуется быстро наступающим и распространяющимся некрозом преимущественно мышечной ткани, отеком, газообразованием в тканях (симптом крепитации), тяжелой интоксикацией и отсутствием воспалительных явлений.

Также выделяют пищевые токсикоинфекции, вызванные сероварами А и С:

- *C. perfringens* типа А вызывает преимущественно токсикоинфекции легкой и средней степени тяжести. Симптомы появляются через 8-18 часов, после употребления контаминированной пищи. Заболевание начинается остро, с болями в животе, рвотой (иногда с примесью крови) и диареей (до 20 раз в сутки). Симптомы исчезают в последующие 12-24 часа. Летальные исходы наблюдают редко.
- *C. perfringens* типа С вызывает некротический энтерит. При острых формах болезнь может привести к смерти пациента в течение 12-24 часов.

3. Эпидемиология и пути передачи

Возбудитель обитает в кишечнике человека и животных, его выделяют из почвы, воды. Наиболее часто в почве и испражнениях обнаруживают серотип А. Споры способны длительное время сохраняться в окружающей среде; способны вегетировать в почве, богатой гумусом. *C. perfringens* типа А относительно толерантен к кратковременному кислородному воздействию. Споры высоко устойчивы к физическим и химическим воздействиям. Термоустойчивость спор сероваров В и D относительно невысока (погибают при кипячении в течение 15-30 минут), споры типов А и С более устойчивы и выживают при кипячении в течение 1-6 часов и даже автоклавировании.

Естественный резервуар и источник возбудителя инфекции — почва. Механизм передачи — контактный, путь — раневой. Восприимчивость — высокая; заболеваемость значительно возрастает во время военных действий у раненых; основная группа риска в мирное время — работники сельского хозяйства, дорожные и строительные рабочие, шахтеры. В мирное время заболеваемость возрастает при стихийных бедствиях, таких как землетрясения; часто сопровождается краш-синдром.

Газовая гангрена развивается при попадании *Clostridium perfringens* на раневые поверхности, где бактерии активно размножаются в условиях пониженного содержания кислорода. Микроорганизмы, а чаще их споры, могут быть занесены в раны из внешней среды, а также с кожи или из ЖКТ пациента. Для поражений характерны некроз тканей и образование газа с гнилостным запахом.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

К роду *Clostridium* относят подвижные (перитрихи) и реже неподвижные грамположительные палочки. Отличительная особенность клостридий — способность образовывать овальные или круглые эндоспоры. Споры клостридий превышают диаметр бактериальной клетки и располагаются центрально, терминально и субтерминально, придавая бактериям особую форму (барабанных палочек, теннисных ракеток и др.). Клостридии, обитающие в почве имеют центрально расположенные споры, придавая клеткам веретенообразную форму, что определило название рода (от греч. kloster — веретено). *Clostridium perfringens* это короткие, крупные, неподвижные палочки с обрубленными концами (0,6-1,0x1,0-1,5 мкм). Грамположительны. Образуют крупные

овальные споры, расположенные центрально (у *S. perfringens* типа А — субтерминально). В тканях палочки образуют капсулу.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Строгие анаэробы. На плотных средах бактерии образуют S и R-формы. S-формы круглые, сочные, куполообразные, с гладкими ровными краями, влажной консистенции. Сначала они прозрачные, позднее они становятся мутными, серовато-белыми. R-формы неправильной формы, бугристые с неровными шероховатыми краями, сухой консистенции; в глубине агара напоминают комочки ваты. На кровяно-сахарном агаре образуют гладкие сероватые колонии с ровными краями, окруженные зоной полного или частичного гемолиза. Характерное свойство колоний *S. perfringens* типа А, являющееся дифференциальным признаком — способность менять серовато-белый цвет на зеленовато-оливковый после кратковременного пребывания в аэробных условиях. На желточном агаре образуют колонии, окруженные зоной опалесценции, образующейся из лецитина куриного желтка под действием лецитиназы. На среде Китта-Тароцци признаки роста появляются через 1-2 часа в виде помутнения среды и появлением пузырьков газа из-под кусочков печени при встряхивании. Культуры *S. perfringens* типа А имеют характерный запах масляной кислоты.

6. Антигенная структура

Выделяют 6 сероваров (А-F), различающихся по антигенным свойствам, продуцируемых экзотоксинов. Тип А включает много подтипов, идентифицируемых в реакции агглютинации, что облегчает диагностику в случае пищевых токсикоинфекций и раневых анаэробных инфекций.

7. Биохимические свойства

Бактерии ферментируют углеводы (ксилозу, галактозу, сахарозу, маннозу и др.) с образованием кислоты и газа. От прочих клостридий *S. perfringens* отличает способность восстанавливать нитраты, расщеплять лактозу, образовывать лецитиназу. Протеолитическая активность слабая: разжижает желатину, не разлагает казеин. Интенсивно створаживает молоко с образованием крупноячеистого творожистого сгустка, напоминающего пену на волнах («штормовая реакция»). Наиболее характерные признаки — способность вызывать масляно-кислое брожение и анаэробный распад углеводов с образованием масляной кислоты и газов (СО₂, водород, иногда метан).

8. Факторы патогенности

S. perfringens продуцируют более 12 экзотоксинов, обозначаемых буквами греческого алфавита (α, β, γ, δ, ε и др.). Наиболее важную роль в развитии патологического процесса играет α-токсин (лецитиназа, фосфолипаза С). Продуцентами являются все серотипы, однако наиболее активными являются клостридии типа А. Токсин разрушает лецитин клеточных мембран животных клееток, вызывая лизис эндотелиальных клеток, эритроцитов, лейкоцитов и др. Проявляет дермонекротизирующее, гемолитическое и летальное действие.

Таким образом, мишенью для действия основных токсинов являются биологические мембраны в различных тканях, в основе поражения находятся ферментативные процессы, катализирующие гидролитическое расщепление и нарушение клеточной проницаемости с последующим отеком. Последний сопровождается снижением окислительно-восстановительного потенциала в клетках, активацией эндогенных протеаз, приводящих к аутолизу тканей, характерному для газовой гангрены.

Энтеротоксин. Продуценты бактерии типов А и С, вызывающие пищевые токсикоинфекции. Термолабильный, с низкой молекулярной массой, действует в нижних отделах тонкого кишечника. Молекула токсина взаимодействует с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток, повреждает клеточную мембрану и нарушает транспорт ионов, что ведет к потере жидкости и внутриклеточных белков. Диарея развивается вследствие потери воды и электролитов за счет дилатации и повышения проницаемости капилляров.

S. perfringens синтезирует большое количество ферментов, являющихся факторами патогенности: протеазы, коллагеназа, ДНК-аза, желатиназа, гиалуронидазы, способствующие распространению инфекции в тканях организма.

9. Патогенез

Все виды травматизма могут служить причиной развития газовой гангрены. Возникновению последней способствует загрязнение ран землей, наличие обширных очагов размножения и некроза тканей. Газовая гангрена развивается при попадании *S. perfringens* на раневые поверхности, где бактерии активно размножаются в условиях пониженного содержания кислорода. В некротизированных тканях в условиях гипоксии споры прорастают и образуют вегетативные формы. Газовая гангрена — токсинемическая инфекция, основными патогенетическими факторами которой являются гангренозные токсины и ферменты агрессии, повреждающие здоровые ткани и вызывающие тяжелую общую интоксикацию организма. Возбудители продуцируют экзотоксины, которые поступают в кровь, распространяются по организму по кровеносным и лимфатическим сосудам и достигают мышечной ткани. Лецитиназа расщепляет лецитин, являющийся важным компонентом мембран клеток. Образующийся в результате биохимической активности клостридий газ расслаивает мышцы, а гиалуронидаза и коллагеназа увеличивают проницаемость тканей. Для поражений характерны некроз тканей с образованием газа с гнилостным запахом.

10. Иммуитет

Естественный иммунитет у человека к газовой гангрене отсутствует. Перенесенное заболевание не оставляет антитоксического иммунитета, поскольку токсигенная доза гангренозных токсинов во много раз ниже иммуногенной дозы. Ведущая роль в защите от токсинов принадлежит антитоксинам.

11. Методы лабораторной диагностики

Материалом для исследования являются раневое отделяемое, отечная жидкость, кусочки мышечной ткани, перевязочный материал. Рекомендуется брать материал из разных участков очага поражения, особенно из глубоких слоев. При сепсисе исследуемым материалом является кровь.

На первом этапе проводят первичную бактериоскопию: наличие в препаратах крупных грамположительных палочек со спорами, некоторые из которых образуют макрокапсулу позволяет поставить предварительный диагноз (табл. 6).

Исследуемый материал вносят в несколько пробирок со средой Китта-Тароцци, среду Вильсона-Блера (железо-сульфитный агар) и молоком под маслом. Часть пробирок прогревают при 80°C в течение 30 мин для уничтожения неспорообразующих бактерий. Посевы инкубируют в термостате при 37°C. Клостридии растут в глубине среды, в молоке образуют творожистый сгусток. На среде Китта-Тароцци отмечается помутнение и газообразование, а на среде Вильсона-Блера черные колонии в глубине агарового столбика.

Для получения чистой культуры производят пересев на кровяно-сахарный агар и инкубируют в строго анаэробных условиях 3-4 суток. Выросшие колонии пересевают на среду Китта-Тароцци. Идентификацию проводят по биохимическим свойствам.

Для быстрой серологической идентификации токсина *S. perfringens*, обладающего лецитиназной активностью проводится лецитиназная проба, основанная на реакции нейтрализации токсина моновалентными сыворотками. Исследуемый материал (раневое отделяемое) помещают в пробирки с раствором лецитина и добавляют антисыворотки. Присутствие лецитиназы выявляется помутнением жидкости в пробирке. При нейтрализации лецитиназной активности токсина соответствующей антисывороткой жидкость остается прозрачной. Для серологической идентификации токсинов также может быть использована биопроба.

Таблица 6. Схема бактериологического метода диагностики газовой гангрены

1 этап	1. Ориентировочная бактериоскопия Окраска по Граму: грам+ крупные палочки с центрально или субтерминально расположенной спорой Окраска по Циллю-Нильсену: споры-красные, вегетативные формы-синие Окраска по Бури-Гинсу: на темном фоне капсулы бактерий в виде бесцветных ободков вокруг красных бактерий
--------	---

	2. Посев исследуемого материала на среду Китта-Тароцци (помутнение и газообразование из-под кусочков печени)
2 этап	1. Посев на чашку Петри с сахарным кровяным агаром с целью получения изолированных колоний 2. Инкубация в анаэробных условиях при 37°C 3-4 суток
	1. Изучение культуральных свойств Сахарно-кровяной агар: <i>C.perfringens</i> — гладкие сероватые колонии с ровными краями и плотным возвышением в центре колонии, окруженные зоной полного или частичного гемолиза <i>C.novyi</i> — сероватые, полупрозрачные шероховатые колонии, окруженные зоной гемолиза <i>C.septicum</i> — сплошной нежный налет, переплетающиеся нити на фоне гемолиза <i>C.hystolyticum</i> — небольшие блестящие колонии с ровными краями и небольшой зоной гемолиза 2. Пересев на среду Китта-Тароцци и сахарно-кровяной столбик с целью выделения чистой культуры
3 этап	Идентификация чистой культуры по: <ul style="list-style-type: none"> • морфологическим и тинкториальным свойствам (грам+ крупные палочки с центрально или субтерминально расположенной спорой) • культуральным (строгие анаэробы, см. 2 этап) В глубине сахарно-кровяного столбика колонии имеют вид <i>C.perfringens</i> — комочки ваты (R-формы) или зерен чечевицы (S-формы) <i>C.novyi</i> — нежные хлопья ваты, разрыв среды вследствие продукции газа <i>C.septicum</i> — чечевицеобразные колонии <i>C.hystolyticum</i> — «пушинки» с уплотненным центром <ul style="list-style-type: none"> • биохимической активности Лактоза Сахароза Манит <i>C.perfringens</i> + + + <i>C.novyi</i> + — - <i>C.septicum</i> — — - <i>C.hystolyticum</i> — — - Тест-системы для изучения биохимической активности Api 20 A <ul style="list-style-type: none"> • определение токсигенности (лецитиназная проба) • биопроба: реакция нейтрализации токсина антитоксической сывороткой

12. Лечение и профилактика

Лечение направлено на нейтрализацию гангренозных токсинов антитоксином; хирургическое удаление некротизированных тканей. Применяют антитоксические сыворотки, антибактериальную химиотерапию и гипербарическую оксигенацию.

При травмах проводится первичная хирургическая обработка раны, соблюдение правил асептики и антисептики при операциях, предупреждение травматизма.

Специфическая профилактика проводится планомерно и экстренно. Для создания искусственного активного иммунитета применяют секстанатоксин, в состав которого кроме столбнячного и ботулинического (А, В, Е) анатоксинов, входят анатоксины *C.perfringens* и *C.oedematiens*.

Возбудитель столбняка (*Clostridium tetani*)

1. Таксономия и классификация

Род *Clostridium* семейства *Bacillaceae* отдела *Firmicutes* включает около 20 видов, которые играют роль в патологии человека: *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi*, *Clostridium septicum* — возбудители газовой анаэробной гангрены, *Clostridium tetani* — возбудитель столбняка, *Clostridium botulinum* — возбудитель ботулизма, *Clostridium difficile* является этиологическим фактором псевдомембранозного колита.

2. Нозологические формы

Столбняк (tetanus) — инфекционное заболевание, вызываемое *C. tetani*, характеризующееся поражением нервной системы, приступами тонических и клонических судорог, опосредованное нейротоксическим действием бактериального токсина. Столбняк

часто поражает новорожденных при родах в антисанитарных условиях («пупочный столбняк»).

3. Эпидемиология и пути передачи

Естественный резервуар и источник инфекции — почва. Механизм передачи — контактный, путь — раневой (бытовая травма, огнестрельное ранение и др.). Заражение человека связано с бытовыми и производственными травмами (раневого инфицирования). Восприимчивость — высокая; заболеваемость значительно возрастает среди раненных во время военных действий; основная группа риска в мирное время — работники сельского хозяйства, жители сельских районов (80—86 % заболевших), дорожные и строительные рабочие и т. д. Ежегодная смертность от столбняка превышает 1,2 млн человек. Повышенную заболеваемость отмечают в регионах с теплым климатом, создающим условия для длительного сохранения спор и их прорастания. Споры способны длительное время сохраняться в окружающей среде; устойчивы к действию физических и химических факторов: выживают в течение 8-10 часов в 1% растворе сулемы и 5% растворе фенола; выдерживают кипячение в течение 0,5-1 часа.

4. Морфологические и тинкториальные свойства Грамположительные палочки с закругленными концами длиной 4-8 мкм и толщиной 0,3-0,8 мкм, расположенные одиночно или цепочками. Подвижны, содержат 20 и более жгутиков, расположенных по периферии клетки. Споры круглые, реже овальные, расположены терминально. Диаметр спор в 2-3 раза превышает толщину бактерий, придавая им форму «барабанных палочек».

5. Питательные среды и культуральные свойства

Строгие анаэробы. На МПА и желатине растет медленно и образует тонкие прозрачные колонии двух типов: гладкие прозрачные S-формы и серовато-желтые, шероховатые R-формы. S-формы образуют отростки, придающие им паукообразную форму, которые впоследствии сливаются, образуя сеточку на поверхности среды. При посеве столбиком в полужидкий агар через 24-48 часа формирует колонии в виде «чечевицек» (R-формы) или «пушинок» с плотным коричневым центром (S-формы).

6. Антигенная структура

У *C. tetani* выявляют O-соматический и H-жгутиковый антигены. По H-антигену выделяют 10 сероваров. Все серовары продуцируют идентичные по антигенным свойствам тетаноспазмин и тетанолизин.

7. Биохимические свойства

Ферментативная активность низкая, отсутствуют цитохромы, цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза. Основные продукты метаболизма — уксусная, масляная, пропионовая кислоты и этанол. Большинство штаммов не обладает сахаролитической активностью, но выделено несколько штаммов, ферментирующих глюкозу. Проявляет слабые протеолитические свойства; медленно расщепляет белки и пептоны до аминокислот, последние разлагаются до угольной кислоты, аммиака, водорода, индола. Для роста необходимы аргинин, гистидин, тирозин, валин, триптофан и др. Образуют желатиназу и рениноподобный фермент, обуславливающий появление затемненных зон вокруг колоний на молочном агаре.

8. Факторы патогенности

Основные факторы патогенности — тетаноспазмин и тетанолизин.

- Тетаноспазмин — полипептид с дистантным механизмом действия; бактерии редко покидают первичный очаг инфицирования. Токсин фиксируется на поверхности отростков нервных клеток, проникает в них (за счет лигандопосредованного эндоцитоза) и посредством ретроградного аксонного транспорта попадает в ЦНС. Механизм действия связан с подавлением высвобождения тормозных нейромедиаторов в синапсах. Появляется в культурах на 2-е сутки, достигая пика образования к 5-7 дню.
- Тетанолизин (тетаногемолизин) обладает гемолитическим, кардиотоксическим и летальным действием. В патогенезе заболевания имеет менее важную роль. Накапливается в культурах через 20-30 часов

9. Патогенез

Входные ворота инфекции — бытовые и производственные травмы, причем наиболее часто поверхностные или колотые, когда больной не обращается за медицинской помощью. Столбняк — токсинемическая инфекция, основным патогенетическим фактором которой является столбнячный токсин. Возбудитель остается в ткани на месте входных ворот; продуцирует экзотоксин, который поступает в кровь и распространяется по организму по кровеносным и лимфатическим сосудам, а также по нервным стволам, и достигает спинного и продолговатого мозга. Токсин фиксируется на поверхности отростков нейронов, проникает в них за счет ли-ганд-опосредованного эндоцитоза и посредством ретроградного аксонного транспорта попадает в ЦНС. Механизм действия токсина связан с подавлением высвобождения тормозных нейромедиаторов, в частности глицина и у-аминомасляной кислоты, в синапсах (токсин связывается с синаптическими белками синаптобrevином и целлюбrevином), в результате чего нарушается проведение импульсов по нервным волокнам. Первоначально токсин действует на периферические нервы, вызывая местные тетанические сокращения мышц. При столбняке поражается не только нервная система — в патологический процесс вовлекаются все системы организма.

Ведущие проявления — судорожный синдром, включающий болезненные сокращения мышц (тетанус) и длительное напряжение мышц. К характерным признакам столбняка относят опистотонус — тетанический спазм, когда позвоночник и конечности согнуты, больно лежит на спине и опирается на затылок и пятки и risus sardonicus (risus caninus) — подобие оскала, вызванного спазмом лицевых мышц.

10. Иммуитет

Естественный иммунитет у человека к столбняку отсутствует. Постинфекционный иммунитет, как правило, не формируется, поскольку токсигенная доза столбнячного токсина во много раз ниже дозы иммуногенной и отмечаются повторные случаи заболевания.

11. Методы лабораторной диагностики

При наличии эпидемиологического анамнеза и развитии типичной клинической картины выделение возбудителя и его идентификация могут не потребоваться. Бактерии обычно обнаруживают в месте проникновения в организм больного. Поэтому наиболее рационально исследование различного материала, взятого в месте ранения (кусочки ткани, перевязочный материал, кетгут). При подозрении на столбняк женщин после родов или аборта — выделения из матки, у новорожденных — выделения из пупочной раны. В тех случаях, когда входные ворота неизвестны необходим тщательный осмотр для выявления ссадин, царапин, катаральных и воспалительных процессов. Особое внимание обращают на старые рубцы после ранений, где возбудитель может долго сохраняться.

Бактериологическое исследование. Исследуемый материал засевают на среду Китта-Тароцци и инкубируют в условиях анаэробноза при 37°C в течение 3-4 суток, наблюдая придонный рост бактерий (табл. 7). Затем делают посеы на сахарный агар в чашки Петри, в высокий столбик сахарного МПА и инкубируют в анаэробных условиях. На поверхности кровяного агара *S.tetani* образует нежные прозрачные колонии, окруженные малозаметной зоной гемолиза. Для получения чистой культуры подозрительные колонии пересевают в пробирки со средой Китта-Тароцци. Для определения токсигенности выделенной культуры используют серологические реакции (преципитации в агаровом геле и др.). Бактериологический метод в диагностике столбняка используют в качестве дополнительного метода для подтверждения диагноза, поскольку выделение *S.tetani* является непростой задачей.

Таблица 7. Схема бактериологического метода диагностики столбняка

1 день	1. Ориентировочная бактериоскопия (грам+ крупные палочки с терминально расположенной спорой «барабанные палочки») 2. Посев исследуемого материала на среду Китта-Тароцци (среду накопления), инкубация 3-4 суток (придонный рост бактерий)
3-4 день	1. Посев на чашку Петри с сахарным кровяным агаром и пробирку с высоким столбиком сахарного МПА. 2. Инкубация в анаэробных условиях при 37°C

4-5 день	<p>1. Изучение культуральных свойств Сахарно-кровяной агар: нежные прозрачные колонии, окруженные малозаметной зоной гемолиза</p> <p>Высокий столбик сахарного МПА: формирует колонии в виде «чечевичек» (R-формы) или «пушинок» с плотным коричневым центром (S-формы), возможны разрывы среды из-за газообразования</p> <p>2. Пересев на среду Китта-Тароцци с целью выделения чистой культуры</p>
5-7 день	<p>Идентификация чистой культуры по:</p> <ul style="list-style-type: none"> • морфологическим и тинкториальным свойствам (крупные грам+ палочки с терминально расположенной спорой «барабанные палочки») • культуральным (строгие анаэробы, на сахарно-кровяном агаре нежные прозрачные колонии, окруженные малозаметной зоной гемолиза) • биохимической активности (сахаролитическая активность отсутствует, протеолитическая активность слабая (образование индола)) • определение токсигенности (реакция преципитации в геле, ИФА) • биопроба: реакция нейтрализации токсина антитоксической сывороткой с учетом на белых мышах

Биопроба проводится с целью выявления столбнячного токсина. Для этого материал измельчают, добавляют двойной объем физиологического раствора для экстракции токсина и фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат смешивают с антитоксической сывороткой и инкубируют в течение 40 минут. Затем одной группе животных (белые мыши) вводят полученный фильтрат, а другой группе смесь фильтрата с антитоксической сывороткой. При наличии в исследуемом материале *C.tetani* у животных первой группы развиваются симптомы столбняка (ригидность мышц хвоста и задних конечностей). В настоящее время биопроба практически не применяется.

12. Лечение и профилактика

Для специфической терапии с целью нейтрализации токсина используют иммуноглобулин противостолбнячный человека (курс 2-3 инъекции в зависимости от тяжести). Введение начинают при появлении первых симптомов и продолжают до исчезновения судорог. Одновременно проводят антибиотикотерапию:

- I Пенициллины (бензилпенициллин), цефалоспорины
- II Тетрациклины (доксциклин), аминогликозиды, макролиды, фторхинолоны
- III Метронидазол

В комплексной терапии используют седативные препараты, миорелаксанты, гипероксигенацию тканей.

Плановая иммунизация. Начинают с 3-5 месячного возраста столбнячным анатоксином, чаще всего в комбинации с другими микробными антигенами в составе АКДС-вакцины (столбнячный и дифтерийный анатоксины и коклюшные палочки). Вакцинацию проводят по стандартной схеме, а затем проводят ревакцинацию каждые 5-10 лет.

Экстренная иммунизация. Проводят при ранениях, травмах. В зависимости от предшествующей вакцинации проводится либо пассивная иммунизация (однократное введение 3000 МЕ антитоксической сыворотки) либо активно-пассивная иммунизация (вводят столбнячный анатоксин и через 30 минут в другое место вводят 3000 МЕ антисыворотки или 950 МЕ иммуноглобулина).

Возбудитель ботулизма (*Clostridium botulinum*)

1. Таксономия и классификация

Clostridium botulinum — возбудитель ботулизма относится к роду *Clostridium* семейства *Bacillaceae* отдела *Firmicute*

2. Нозологические формы

Ботулизм (от лат. *botulus*, колбаса) — острая пищевая токсикоинфекция, протекающая с преимущественным поражением центральной и вегетативной нервной системы.

Возбудитель вызывает заболевание ботулизм (классическая пищевая токсикоинфекция), раневой ботулизм (возникает при загрязнении некротизированных тканей почвой), ботулизм новорожденных (развивается у детей от 3 до 20 нед при заглатывании спор с последующим их прорастанием), неопределенно классифицируемый (у детей старше 1 года и взрослых, не связанных с пищей и ранами).

3. Эпидемиология и пути передачи

Заболевание регистрируют повсеместно, исключая районы вечной мерзлоты. Наиболее часто заболевания вызывают типы А, В и Е. Естественный резервуар и источник возбудителя инфекции — почва и различные животные. Повышенную заболеваемость отмечают в регионах с теплым климатом, создающим условия не только для длительного сохранения спор в почве, но и их прорастания и размножения вегетативных форм. Механизм передачи — фекально-оральный, путь — алиментарный. Споры, попадая в пищевые продукты (мясные, овощные, особенно консервированные), прорастают, образуют токсин, который при употреблении пищи вызывает отравление. Наибольшую опасность представляют мясные, рыбные и овощные консервы домашнего приготовления. Высоко устойчив к действию физических и химических факторов.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Грамположительные палочки с закругленными концами длиной 4-8 мкм и толщиной 0,6-0,8 мкм, в мазках расположены одиночно или в виде коротких цепочек; подвижны, перитрихи. При неблагоприятных условиях окружающей среды образуют субтерминально расположенные эндоспоры, придающие бактериям форму «теннисной ракетки».

5. Питательные среды и культуральные свойства

Строгие анаэробы. На кровяном агаре с глюкозой образуют очень мелкие сероватые или желтоватые мутные колонии линзообразной формы. Вокруг колоний образуются зоны гемолиза. На печеночном агаре образуют полиморфные звездчатые колонии, в желатине — сероватые, окруженные зоной разжиженной желатины. Хорошо растут в жидких средах (Китта-Тароцци) при условии предварительного удаления кислорода путем кипячения среды в течение 15-20 мин с последующим быстрым охлаждением. Вызывают помутнение среды и газообразование; иногда отмечают запах прогорклого масла, но этот признак непостоянен.

6. Антигенная структура

У *C.botulinum* выявляют О-типоспецифический соматический и Н-группоспецифический жгутиковый антигены. Серологическая идентификация *C.botulinum* основана на выявлении токсинов. В зависимости от структуры выделяют 8 сероваров: А, В, С_{1(α)}, С_{2(β)}, D, E, F и G.

7. Биохимические свойства

В зависимости от биохимических свойств выделяют четыре группы бактерий (табл.8).

Группа	Биохимические свойства
Бактерии I группы	проявляют выраженные протеолитические свойства, гидролизуют желатин и эскулин, ферментируют глюкозу и мальтозу; проявляют липазную активность на яичном агаре
Бактерии II группы	проявляют сахаролитическую активность (глюкоза, мальтоза и др.), но лишены протеолитической активности
Бактерии III группы	проявляют липазную активность и гидролизуют желатин
Бактерии IV группы	гидролизуют желатин, но не проявляют сахаролитических свойств

8. Факторы патогенности

Патогенность обусловлена сильным экзотоксином, чувствительность к которому различна у человека и животных. Человек наиболее чувствителен к токсинам типов А, В, Е. Ботулотоксин — белок, проявляющий нейротоксическое действие, молекулярная масса может варьировать от 60 до 150 кДа. Ботулотоксин является самым сильным ядом, известным человеку. По расчетным данным, 1 г кристаллического токсина содержит 10¹² смертельных для человека доз токсина. Токсины всех типов проявляют гемолизирующее действие. Оптимальная температура для токсинообразования переменна: для бактерий типов А, В, С и D — 35 °С, для бактерий типов Е и F — 28-30 °С.

Токсины сорбируются на клетках слизистой оболочки кишечника, проникают в кровь (где их можно выявить серологически) и в периферические нервные окончания. Экзотоксины — Zn^{2+} -зависимые эндопептидазы, оказывающие нейротоксическое действие. При протеолизе молекула токсина разлагается на две связанных дисульфидной связью фрагмента (L-и H-цепи). Токсин разрушается при кипячении; легко кристаллизуется в белый порошок. Токсины всех типов также обладают гемолизирующим действием. Между собой токсины различаются антигенной структурой и молекулярной массой.

9. Патогенез

Ботулизм — токсинемическая инфекция; основным патогенетическим фактором является токсин, который поступает в кровь и распространяется по организму по кровеносным сосудам. Фармакокинетическая активность токсинов различных типов практически одинакова, они сорбируются на клетках слизистой оболочки кишечника, проникают в кровь и в периферические нервные окончания. Действие токсина включает связывание H-цепи с мембраной, поглощение токсина и формирование пор в синаптических пузырьках (каждую пору формируют 4 молекулы токсина), что приводит к блокированию слияния синаптических пузырьков с мембраной, высвобождению ацетилхолина и развитие вялых параличей (мишень для действия — интегральные синаптические белки). В частности, токсины серотипов В, D, F расщепляют синаптобrevин, А и Е — SNAP-25, С — синтаксин, D и F — целлюбrevин. Избирательно поражают α -моторные нейроны передних рогов спинного мозга, что обуславливает характерные параличи мышц.

Инкубационный период обычно составляет 24 ч, но может варьировать от 4–6 до 96 ч и более. Проявления зависят от природы продукта, ставшего причиной отравления, количества накопившегося в нем и поступившего в организм токсина, состояния больного. Первые, но непостоянные симптомы — расстройства ЖКТ (тошнота, рвота, боли в животе). Часто больные жалуются на сухость во рту или гиперсаливацию. Одновременно развиваются головная боль и нервно-паралитические явления — нарушение глотания (дисфагия), офтальмоплегический синдром: диплопия (двоение в глазах), птоз (опущение век), анизокория (поражение сфинктера зрачка). Затем возникает парез и паралич мышц шеи, конечностей, дыхательной мускулатуры и сердечной мышцы, в результате чего наступает смерть.

10. Иммуитет

После перенесенного заболевания в сыворотке крови обнаруживаются антитела к токсину и к бактериям, что свидетельствует о комплексном характере иммунного ответа. Естественный иммунитет после перенесенного заболевания отсутствует, поскольку токсигенная доза ботулотоксина во много раз ниже иммуногенной (6 кг ботулотоксина способны убить все человечество). Чувствительность к ботулиническому токсину у различных животных подвержена резким колебаниям. Абсолютно резистентные виды неизвестны, но всеядные животные обладают меньшей чувствительностью.

11. Методы лабораторной диагностики

Цель исследования — обнаружение и идентификация токсина, выделение возбудителя является второстепенной задачей. Исследуемым материалом являются остатки пищевых продуктов, материал, полученный от больного (кровь, испражнения, моча, промывные воды желудка, рвотные массы и др.). Исследование проводят одновременно в двух направлениях: обнаружение ботулотоксина (за искл. испражнений) и выделение возбудителя (за искл. крови). Ботулотоксин определяют в биопробе на мышах или с использованием серологических реакций (ИФА, РПГА). Определение типа токсина крайне важно для назначения специфической антитоксической терапии. Для проведения биопробы отбирают партию из 5 животных. Первое заражают исследуемым материалом, а остальным вводят смесь исследуемого материала и 2 мл 200 МЕ определенной антитоксической сыворотки А, В, С и Е. При наличии в материале токсина животные умирают, а выживает животное, получившее антисыворотку, нейтрализовавшую токсин соответствующего типа. Для идентификации токсинов с помощью РПГА используют антительный диагностикум (эритроциты, сенсibilизированные специфическими антитоксинами).

Банки с консервированными продуктами выдерживают в термостате 10-12 суток, растирают, центрифугируют: в надосадочной жидкости определяют наличие токсина, а в осадке — возбудителя. Методы получения культур возбудителя ботулизма аналогичны методикам, используемым при других клостридиозах (табл.9).

Таблица 9. Схема бактериологического метода диагностики ботулизма

I этап	1 день	Посев исследуемого материала на среду Китта-Тароцци (среду накопления) или сразу на сахарно-кровяной агар и высокий столбик сахарного МПА, инкубация в анаэробных условиях 37°C
	2 день	1. Изучение культуральных свойств Сахарно-кровяный агар: неправильной формы колонии с отростками или ровными краями, окруженные зоной гемолиза Высокий столбик сахарного МПА: в виде комочков ваты или чечевицы 2. Пересев на среду Китта-Тароцци с целью выделения чистой культуры
II этап	3 день	1. Идентификация чистой культуры по: <ul style="list-style-type: none"> • морфологическим и тинкториальным свойствам (крупные грам+ палочки с субтерминально расположенной спорой — «теннисные ракетки») • культуральным (строгие анаэробы, на сахарно-кровяном агаре неправильной формы колонии с отростками или ровными краями, окруженные зоной гемолиза; в высоком столбике сахарного МПА колонии в виде комочков ваты или чечевицы) • токсигенности и типу токсина (используют биопробу на мышах с поливалентной антитоксической сывороткой и для определения типа токсина с моновалентными сыворотками; ИФА и РПГА для определения типа токсина)

12. Лечение и профилактика

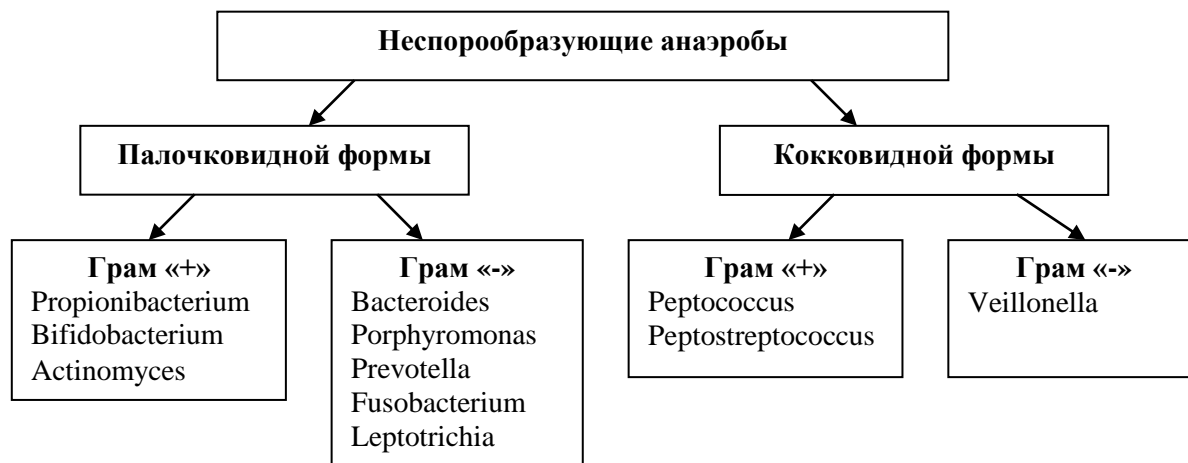
Наиболее эффективно раннее применение соответствующей антитоксической сыворотки. До установления типа токсина используется поливалентная (А, В, С, Е) лошадиная (гетерологичная) антисыворотка, которую вводят по методу Безредко. После лабораторного определения типа токсина вводят антисыворотку соответствующего типа. Одновременно проводят антибактериальную (пенициллины и др.) и симптоматическую терапию.

Для специфической профилактики используют ботулинический полианатоксин, входящий в состав комплексной вакцины для профилактики анаэробных инфекций. Однако в силу спорадичности данного заболевания иммунопрофилактика ботулизма не нашла широкого применения.

В основе профилактики ботулизма лежит неукоснительное соблюдение санитарно-гигиенических правил при производстве пищевых продуктов. При производстве консервированных продуктов необходимо соблюдать условия стерилизации консервов и их хранения, исключая накопление токсина, а также использование ингибиторов (нитриты, органические кислоты).

Неспорообразующие анаэробы

Неспорообразующие анаэробные бактерии имеющие отношение к заболеваниям человека представлены грамположительными бактериями родов *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*; грамотрицательными родов *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella* и др. Некоторые виды потенциально способны вызывать патологические процессы, поэтому они называются условно-патогенными. Инфекции, вызываемые анаэробными бактериями, носят эндогенный характер, и их наиболее часто вызывают ассоциации нескольких видов бактерий. Факторы, предрасполагающие к развитию подобных поражений, включают нарушения целостности кожных покровов и СО, травмы, хирургические вмешательства, нарушение правил проведения внутривенных вливаний и т.п.



Анаэробные грамположительные кокки

Наибольшее значение в патологии человека имеют грамположительные кокки родов *Peptococcus* (*P.niger*) и *Peptostreptococcus* (*P.anaerobius*, *P.asaccharolyticus*, *P.micros*). Прочие анаэробные грамположительные кокки значения не имеют.

Распространенность и устойчивость в окружающей среде. Пептококки и пептострептококки являются частью анаэробной микрофлоры различных биотопов организма человека (слизистых оболочек). При попадании в кислородные условия мгновенно погибают. Чувствительны к действию антисептиков, дезинфектантов и антибактериальных препаратов (пенициллины, левомицетин, метронидазол и др.).

Род *Peptococcus*

Морфологические и тинкториальные свойства. В мазках, окрашенных по Граму пептококки выглядят также как стафилококки — неправильные группы грамположительных кокков, напоминающие гроздья винограда; неподвижны, спор, капсул не образуют. Типовой (единственный) вид *Peptococcus niger*.

Культуральные свойства. Строгие анаэробы, нуждаются в обогащенных питательных средах (5% кровяной Шедлер агар и др.). На кровяном агаре в анаэробных условиях через 48 часов образуют мелкие, выпуклые, блестящие, полупрозрачные или мутные колонии черного цвета. Температурный оптимум роста 37°C.

Антигенные свойства. Изучены недостаточно. Антигенными свойствами обладают пептидогликан и тейхоевые кислоты клеточной стенки.

Биохимические свойства. Инертны по отношению к углеводам, энергию получают расщеплением пептонов. Обычно каталаза-отрицательны, не восстанавливают нитраты, не образуют индол.

Медицинское значение. Вызывают гнойно-воспалительные заболевания различных биотопов организма человека, чаще всего в ассоциации с другими условно-патогенными микроорганизмами. Эти заболевания носят эндогенный характер.

Факторы патогенности. Изучены недостаточно, связаны со способностью к адгезии (адгезины), продукцией гиалуронидазы и коллагеназы.

Микробиологическая диагностика. Основные методы бактериоскопический и бактериологический (см. схему).

Лечение. Использование антибактериальной химиотерапии.

Профилактика. Укрепление местного и общего иммунитета.

Род *Peptostreptococcus*

Морфологические и тинкториальные свойства. Представлены неподвижными грамположительными кокками или коккобациллами, образующими короткие цепочки. Способны образовывать капсулу. Спор не образуют. Типовой вид *Peptostreptococcus anaerobius*.

Культуральные свойства. Строгие анаэробы, нуждаются в обогащенных питательных средах (5% кровяной Шедлер агар и др.). На кровяном агаре в анаэробных условиях через 48 часов образуют мелкие, выпуклые, блестящие, полупрозрачные или мутные колонии с зоной

α -гемолита или без него. Температурный оптимум роста 37°C. Колонии *R. anaerobius* имеют характерный сладковатый запах, бактерии чувствительны к анетолсульфонату натрия, что используется для их дифференциации с помощью дисков.

Антигенные свойства. Изучены недостаточно. Антигенными свойствами обладают пептидогликан и тейхоевые кислоты клеточной стенки.

Биохимические свойства. Хемоорганотрофы, некоторые виды способны ферментировать углеводы, восстанавливать нитраты и образовывать индол. Обычно каталаза-отрицательны.

Медицинское значение. Вызывают гнойно-воспалительные заболевания различных биотопов организма человека (челюстно-лицевой области, кишечника, легких, матки и др.), чаще всего в ассоциации с другими условно-патогенными микроорганизмами. Эти заболевания носят эндогенный характер.

Факторы патогенности. Изучены недостаточно, связаны со способностью к адгезии (адгезины и наличие капсулы), продукцией гемолизина, гиалуронидазы и коллагеназы.

Микробиологическая диагностика. Основные методы бактериоскопический и бактериологический (см. схему).

Лечение. Использование антибактериальной химиотерапии (препараты выбора — клиндамицин, левомицетин, имипенем и метронидазол).

Профилактика. Укрепление местного и общего иммунитета.

Грамотрицательные анаэробные кокки

Наибольшее значение в патологии человека имеют анаэробные грамотрицательные кокки рода *Veillonella*.

Род *Veillonella*

Распространенность и устойчивость в окружающей среде. Бактерии являются частью анаэробной микрофлоры слизистых оболочек полости рта, носоглотки и кишечника. При попадании в кислородные условия мгновенно погибают. Чувствительны к действию антисептиков, дезинфектантов и антибактериальных препаратов (клиндамицину и метронидазолу).

Морфологические и тинкториальные свойства. Неподвижные грамотрицательные кокки диаметром 0,3-0,5 мкм. В мазках располагаются парами, беспорядочными скоплениями или короткими цепочками. Типовой вид — *Veillonella parvula*.

Культуральные свойства. Строгие анаэробы. Оптимальная температура роста 30-37°C, оптимум pH 6,5-8,0. На молочном агаре образуют звездчатые блестящие колонии диаметром 1-3 мм.

Антигенные свойства. Изучены недостаточно, связаны с липополисахаридом клеточной стенки.

Биохимические свойства. Хемоорганотрофы; расщепляют пируват, лактат, малат, фумарат, оксалоацетат. Каталазоотрицательны, не гидролизуют желатин, не сворачивают молоко, не образуют индол, восстанавливают нитраты в нитриты. При ферментации лактата образуют ацетат, пропионат, углекислый газ и водород.

Медицинское значение. Вызывают гнойно-воспалительные заболевания челюстно-лицевой области, носоглотки, кишечника только в ассоциации с другими условно-патогенными микроорганизмами.

Факторы патогенности. Изучены недостаточно, возможно, патогенность обусловлена наличием эндотоксина.

Микробиологическая диагностика. Основные методы бактериоскопический и бактериологический (см. схему).

Лечение. Использование антибактериальной химиотерапии (препараты выбора — клиндамицин, левомицетин, имипенем и метронидазол).

Профилактика. Укрепление местного и общего иммунитета.

Лечение. Использование антибактериальной химиотерапии (препараты выбора — клиндамицин и метронидазол).

Профилактика. Укрепление местного и общего иммунитета.

Анаэробные грамотрицательные палочки

Род Bacteroides

Представлен вариabельными по своим размерам грамотрицательными палочками, обладающими высокой степенью полиморфизма.

Распространенность и устойчивость в окружающей среде. Бактероиды являются представителями нормальной микрофлорой толстой кишки. При попадании в кислородные условия мгновенно погибают. Чувствительны к действию антисептиков, дезинфектантов и антибактериальных препаратов (метронидазол, левомицетин и имипенем). Резистентны к пенициллинам и цефалоспорином I и II поколения.

Морфологические и тинкториальные свойства. В мазках из клинического материала представлены бледными полиморфными палочками с закругленными концами, по Граму окрашиваются неравномерно. Большинство видов неподвижны, спор не образуют. Некоторые виды образуют капсулу. Типовой вид — *Bacteroides fragilis*.

Культуральные свойства. Облигатные анаэробы; хемоорганотрофы. Оптимальная температура роста 30-37°C. Культивируется на анаэробном кровяном агаре, тиогликолевой среде. Добавление гемина и менадиона (витамин К) стимулирует рост культуры. На кровяном агаре *B. fragilis* образует серовато-белые, прозрачные или мутноватые мелкие S-формы без зоны гемолиза. Основные признаки бактериоидов — способность расти в присутствии 20% желчных солей, резистентность к канамицину (100 мкг), ванкомицину (5 мкг) и колистину (10 мкг).

Антигенные свойства. Содержат соматический O-антиген, подвижные виды могут иметь H-жгутиковoй и K-капсульный антигены.

Биохимические свойства. Хемоорганотрофы. *B. fragilis* расщепляет глюкозу, лактозу, сахарозу с образованием кислоты. Гидролиз желатины выражен слабо, не образует индол, образует сероводород, не гидролизует гиппурат (родовой признак); не вызывает гемолиза.

Медицинское значение. Бактероиды редко вызывают моноинфекции, гораздо чаще они обуславливают смешанные поражения, вызванные ассоциациями с анаэробными стрептококками, фузобактериями и др. Основные поражения — абсцессы в основном органов брюшной полости.

Факторы патогенности. Патогенез поражений, вызванных бактериоидами, включает адгезию к поверхности эпителия и выделение различных продуктов, повреждающих его. *B. fragilis* секретирует нейраминидазу, гиалуронидазу и фибринолизин. Микроорганизм снабжен капсулой и способен выделять супероксид дисмутазу, защищающие его от вне-и внутриклеточных микробицидных факторов фагоцитов. Все бактериоиды содержат эндотоксин, отличающийся по структуре от ЛПС других грамотрицательных бактерий.

Микробиологическая диагностика. Основные методы бактериоскопический и бактериологический (см. схему).

Лечение. Препараты выбора — левомицетин, метронидазол и имипенем.

Профилактика. Укрепление местного и общего иммунитета.

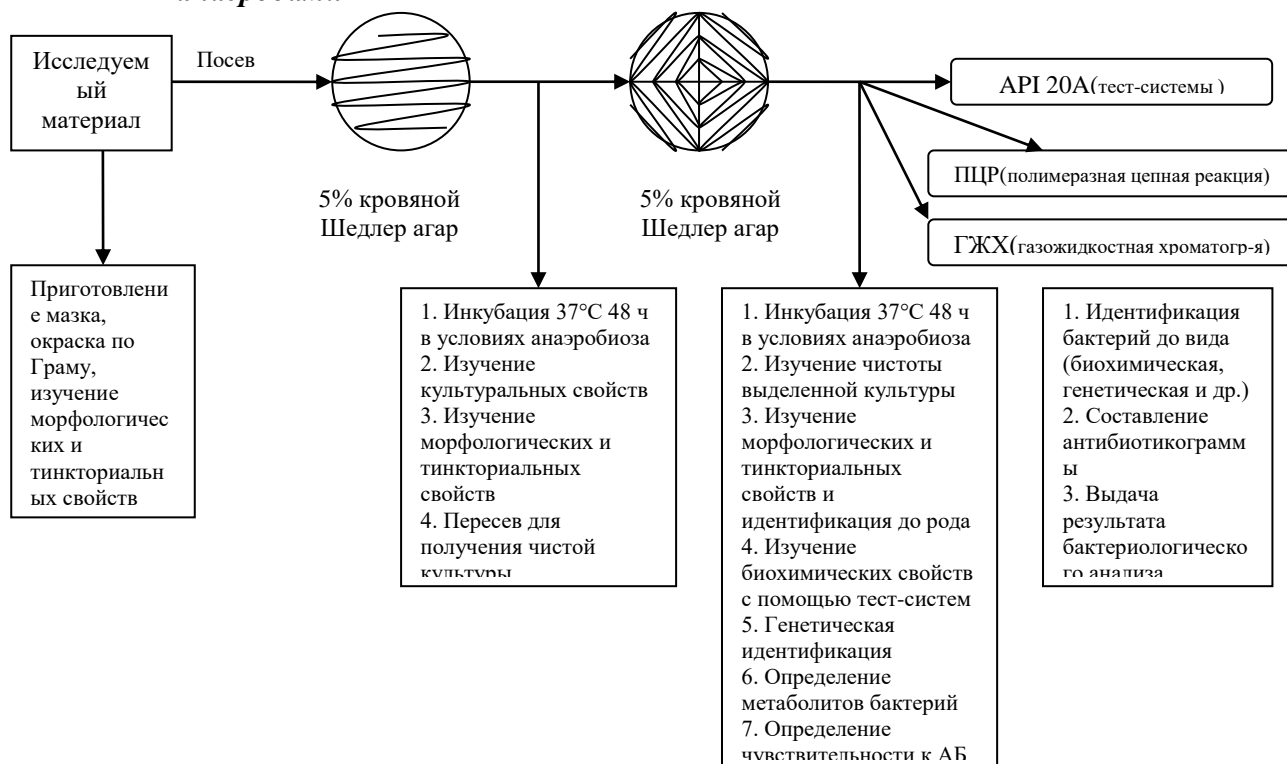
Микробиологическая диагностика инфекций, вызываемых неспорообразующими анаэробами

В качестве исследуемого материала используют гной из очага инфекции. На первом этапе проводят ориентировочную бактериоскопию: готовят мазок из исследуемого материала, окрашивают по Граму, микроскопируют с масляной иммерсией и изучают морфологические и тинкториальные свойства, которые позволяют поставить предварительный диагноз и определить дальнейшую тактику.

Посев исследуемого материала производят на специальные питательные среды с добавлением крови, гемина, витамина К (тиогликолевая среда, Шедлер агар и др.) и культивируют в условиях анаэробноза при температуре 37°C в течение 48 часов (табл. 10). Далее изучают культуральные свойства, делают мазки, изучают морфологические и тинкториальные свойства, которые позволяют произвести идентификацию до рода. С целью получения чистой культуры производят пересев материала с отдельных колоний и

культивирование в условиях анаэробноз. Через 24-48 часов оценивается чистота выделенной культуры макро-(визуально) и микроскопически (изучение морфологических и тинкториальных свойств). С целью идентификации до вида производят изучение биохимических свойств выделенных чистых культур с помощью тест-систем АРІ 20А и определение чувствительности к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом.

Таблица 10. Схема диагностики инфекций, вызываемых неспорообразующими анаэробами



I. План практической работы

1. Зарисовать по таблице возбудителей газовой анаэробной инфекции, столбняка и ботулизма, окрашенных по Граму и Ожешко, описать морфологические и тинкториальные свойства.

Одним из основных возбудителей газовой анаэробной инфекции является *Clostridium perfringens*: короткие, крупные палочки с обрубленными концами (0,6-1,0x1,0-1,5 мкм); грамположительны; образуют крупные овальные споры, расположенные центрально (у *C. perfringens* типа А — субтерминально); В тканях палочки образуют капсулу.

Clostridium tetani (возбудитель столбняка): грамположительные палочки с закругленными концами длиной 4-8 мкм и толщиной 0,3-0,8 мкм, расположенные одиночно или цепочками; споры круглые, реже овальные, расположены терминально; диаметр спор в 2-3 раза превышает толщину бактерий, придавая им форму «барабанных палочек».

Clostridium botulinum (возбудитель ботулизма): грамположительные палочки с закругленными концами длиной 4-8 мкм и толщиной 0,6-0,8 мкм, в мазках расположены одиночно или в виде коротких цепочек; подвижны, при неблагоприятных условиях окружающей среды образуют субтерминально расположенные эндоспоры, придающие бактериям форму «теннисных ракеток».

При окраске по Граму споры, имеющие толстую многослойную оболочку не окрашиваются и остаются в виде бесцветных зон овальной и округлой формы с соответствующим расположением (терминальное, субтерминальное, центральное), вегетативная форма окрашивается в фиолетовый цвет (клостридии — грамположительные бактерии).

Метод Ожешко относится к сложным и специальным (для выявления спор) методам окраски. Споры бактерий будут окрашиваться в красный цвет (как кислотоустойчивые бактерии), а вегетативные формы в синий цвет (как некислотоустойчивые бактерии).

2. Описать культуральные свойства анаэробов, выросших на средах: Китта-Тароци, Вильсона-Блера, высоком столбике сахарного МПА, молоке под маслом.

Среда Китта-Тароци состоит из питательного бульона, 0,5 % глюкозы и кусочков печени или мясного фарша для адсорбции кислорода. Среду прогревают кипячением в течение 10-15 минут на водяной бане для удаления кислорода и заливают небольшим слоем вазелинового масла. При культивировании анаэробов среда Китта-Тароци мутнеет, появляются пузырьки газа при встряхивании и края кусочков печени сглаживаются.

Среда Вильсон-Блера (железо-сульфитный агар) готовится из питательного агара, к которому добавляют глюкозу, Na_2SO_3 , FeCl_2 . Анаэробные клостридии на этой среде образуют колонии черного цвета за счет восстановления Na_2SO_3 в Na_2S , который соединяясь с хлоридом железа, дает осадок сульфида железа (Fe S) черного цвета.

Высокий столбик сахарного МПА: формирует колонии в виде «чечевичек» (R-формы), «пушинок» с плотным коричневым центром или «комочков ваты» (S-формы), возможны разрывы среды из-за газообразования.

При культивировании анаэробов в питательной среде *молоко под маслом* происходит створаживание молока с образованием губчатого крупноячеистого сгустка.

3. Зарисовать схему постановки реакции нейтрализации с учётом на белых мышях в диагностике газовой анаэробной инфекции.

Для серологической идентификации токсинов используется биопроба. Проводят реакцию нейтрализации токсина с учетом на лабораторных животных (белые мыши, морские свинки). С этой целью смесь исследуемого материала (токсина) с моновалентными антитоксическими сыворотками вводят подкожно лабораторным животным. В случае нейтрализации токсина животное выживает; при отрицательной реакции животное погибает через 30 мин — 4 часа после инъекции.

4. Микроскопировать окрашенные препараты бактериоидов, вейллонелл, пептококков, пептострептококков

В мазках из клинического материала бактериоиды представлены бледными полиморфными палочками с закругленными концами, по Граму окрашиваются неравномерно; спор не образуют; некоторые виды образуют капсулу. Типовой вид — *Bacteroides fragilis*.

Вейллонеллы — неподвижные грамотрицательные кокки диаметром 0,3-0,5 мкм; в мазках располагаются парами, беспорядочными скоплениями или короткими цепочками. Типовой вид — *Veillonella parvula*.

В мазках, окрашенных по Граму пептококки выглядят также как стафилококки — неправильные группы грамположительных кокков, напоминающие гроздь винограда; неподвижны, спор, капсул не образуют. Типовой (единственный) вид *Peptococcus niger*.

Пептострептококки — неподвижные грамположительными кокки, образующие короткие цепочки (анаэробные стрептококки); способны образовывать капсулу; спор не образуют. Типовой вид *Peptostreptococcus anaerobius*.

5. Решение ситуационных задач

III модуль «Кишечные инфекции»

Занятие № 1

ТЕМА: Микробиологическая диагностика колиэнтеритов и кишечного иерсиниоза

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: знать основные биологические свойства возбудителей колиэнтеритов, кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза, микробиологическую диагностику, методы профилактики и терапии заболеваний

уметь проводить микробиологическую диагностику, производить посеvy исследуемого материала, определять культуральные признаки, учитывать биохимические свойства кишечной палочки и реакцию агглютинации с живой и гретой культурой

Задание на дом

1. Вопросы для самоподготовки:

- 1) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики колиэнтеритов.
- 2) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики кишечного иерсиниоза.

Острые кишечные инфекции (ОКИ) характеризуются поражением пищеварительного тракта различной локализации, диареей и общей интоксикацией организма. Возбудитель выделяется с испражнениями и, в меньшей степени, с другими биологическими жидкостями. Основным механизмом заражения — алиментарный или фекально-оральный, т.е. попавший во внешнюю среду с испражнениями возбудитель проникает в ЖКТ здорового человека через рот. Существуют разные пути распространения кишечных инфекций — контактно-бытовой, пищевой, водный.

В этом разделе рассматриваются ОКИ бактериальной природы. Их возбудители относятся к различным семействам, но большинство входит в семейство Enterobacteriaceae. Семейство энтеробактерий включает более 20 родов, объединяющих более 100 видов бактерий, обитающих в почве, на растениях, входящих в состав микробных биоценозов кишечника животных и человека. Наибольшее значение для человека имеют рода *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio* и др. Для дифференциации родов используют в основном биохимические признаки, для классификации внутри родов и видов — изучение антигенной структуры (О-, Н-и К-антигенов).

О-антиген представлен липополисахаридами (ЛПС) наружной мембраны. Штаммы, лишенные О-антигена, образуют R-колонии и обычно авирулентны.

Н-антиген — термолabileльные жгутиковые белки, имеются только у подвижных (имеющих жгутики) видов.

К-антиген — термостабильные полисахариды капсулы и наружной оболочки.

Факторы патогенности энтеробактерий

Для возникновения и развития ОКИ необходимо, чтобы возбудители в достаточном количестве (инфицирующая доза) проникли в пищеварительный тракт, после чего:

- прикрепилась к чувствительным клеткам эпителия кишечника (адгезия) и интенсивно размножилась (колонизация);
- взаимодействовали с клетками эпителия тонкого или толстого кишечника, с макрофагами с последующим проникновением во внутреннюю среду организма;
- воздействовали на организм различными токсическими субстанциями, как высвобождающимися при разрушении бактерий возбудителей (эндотоксины) так и выделяемыми в процессе их жизнедеятельности (экзотоксины), а также некоторыми ферментами.

Адгезия. Прикрепление бактерий к чувствительным клеткам эпителия кишечника осуществляется по типу лиганд-рецепторного взаимодействия бактериальных адгезинов с комплементарными рецепторами на поверхности клеток при участии электростатических сил и сил гидрофобного взаимодействия. Функцию адгезинов у энтеробактерий выполняют фимбрии (пили) различных типов. У некоторых бактерий адгезинами являются специальные фибриллы, белки наружной мембраны и др.

Колонизация. Прикрепившиеся к эпителию (иногда к гликокаликсу) бактерии интенсивно размножаются, происходит колонизация и взаимодействие бактерий с чувствительными клетками эпителия кишечника. Имеются различные типы взаимодействия: некоторые возбудители не проникают внутрь клеток, оказывая преимущественно токсическое действие (энтеротоксигенные эшерихии, холерный вибрион), другие обладают инвазивностью, проникая внутрь клеток и разрушая их (шигеллы, энтероинвазивные эшерихии). Имеются бактерии (сальмонеллы, иерсинии), которые после фагоцитирования макрофагами не погибают, а размножаются в них и попадают в кровяное русло, вызывая генерализованную инфекцию.

Эндотоксин. При всех ОКИ проявляет свое действие эндотоксин. Он тесно связан с клеточной стенкой и представляет собой высокомолекулярный липополисахарид (ЛПС), образующий комплекс с белками. Эндотоксины различных энтеробактерий имеют сходное строение, незначительно отличаясь по химическому составу концевых участков полисахаридных цепей. В состав эндотоксина входит липид А — гетерополимер, содержащий глюкозамин и жирные кислоты. Токсические свойства определяются всей молекулой ЛПС, причем эндотоксины различных энтеробактерий обладают сходным патофизиологическим действием. Их основными характеристиками являются:

- иммуногенность
- стимуляция выработки физиологически активных веществ
- пирогенность
- антикомплементарная активность
- стимуляция освобождения макрофагальных лизосомных ферментов
- накопление органических кислот (метаболический ацидоз)
- повреждение эпителия сосудов микроциркуляторного русла
- нарушение в результате сосудистых реакций функций почек, печени, сердца, легких, мозга, а в тяжелых случаях — развитие инфекционно-токсического шока.

Эндотоксины энтеробактерий не оказывают повреждающего действия на кишечный эпителий.

Энтеротоксины и цитотоксины. Многие энтеробактерии — возбудители ОКИ, кроме эндотоксинов образуют экзотоксины. Они вырабатываются в процессе жизнедеятельности бактерий и имеют белковую природу. Это — энтеротоксины, которые могут быть термолabileными и термостабильными, и цитотоксины.

Термолabileные энтеротоксины (LT — токсины) усиливают активность находящейся в мембранах клеток кишечного эпителия аденилатциклазы, которая под действием простогландинов увеличивает образование циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Вследствие этого в просвет кишки секретруется большое количество жидкости, содержащей электролиты и бедной белком, в результате возникает диарея с обильным жидким, водянистым стулом.

Термостабильные энтеротоксины (ST-токсины) по такому же принципу и с тем же результатом воздействуют на гуанилатциклазную систему эпителиоцитов, при этом накапливается циклический гуанизинмонофосфат (цГМФ). В итоге организм больного теряет большое количество жидкости и электролитов, что нередко приводит к резкому обезвоживанию.

Цитотоксины разрушают мембраны эпителиоцитов, что способствует проникновению энтеробактерий в кишечную стенку и развитию воспалительного процесса, иногда с некрозом.

Таким образом, в развитии инфекционного процесса ОКИ имеется много общих закономерностей. Но в то же время, в зависимости от степени выраженности тех или иных патогенных свойств у различных энтеробактерий (токсигенности, инвазивности и др), вызываемые ими ОКИ имеют различия в патогенезе и клинике заболевания.

Принципы микробиологической диагностики ОКИ

В основе микробиологической диагностики острых кишечных инфекций лежит бактериологический метод, который заключается в выделении из исследуемого материала

чистой культуры возбудителя и его идентификации на основе изучения различных свойств. Кроме бактериологического, применяют и серологический метод, заключающийся в обнаружении специфических антител в сыворотке больного с помощью различных серологических реакций. Иногда применяются другие методы исследования.

Исследуемые материалы: выделения и биологические жидкости больного, некоторые субстраты внешней среды и др. (см. таблицу 11). При микробиологической диагностике инфекционных заболеваний необходимо соблюдать основное правило: материал, подлежащий исследованию, берут в зависимости от патогенеза данного заболевания, срока заболевания и путей выделения возбудителя из организма больного.

Таблица 11. Исследуемые материалы при ОКИ, вызываемых энтеробактериями

Наименование заболевания	Исследуемые материалы	Способ исследования	
Брюшной тиф, паратиф А, паратиф В	на 1-й неделе заболевания	Кровь	Бактериологический
	на 2-й неделе заболевания и далее	Сыворотка крови	Серологический
	на 3-й неделе заболевания и далее	Испражнения, желчь, соскоб с розеол, моча	Бактериологический
Сальмонеллезные пищевые токсикоинфекции	Рвотные массы, промывные воды желудка, остатки пищи, испражнения, желчь, моча	Бактериологический	
Генерализованные сальмонеллезы (у детей, реже у взрослых)	Испражнения, моча, желчь, кровь, ликвор, суставная жидкость, гной. Сыворотка крови	Бактериологический Серологический	
Кишечная коли-инфекция (кишечный эшерихиоз)	Испражнения, рвотные массы, дуоденальное содержимое, желчь. Сыворотка крови	Бактериологический Серологический	
Дизентерия (шигеллез)	Испражнения Сыворотка крови	Бактериологический Серологический	
Кишечный иерсиниоз	Испражнения, желчь, моча, пищевые продукты, кровь. Сыворотка крови	Бактериологический Серологический	

Исследуемые материалы для бактериологического исследования следует брать у больного до начала лечения антибактериальными препаратами (антибиотиками, химиопрепаратами, бактериофагами) или после прекращения их действия. При необходимости пробы для исследования берут повторно.

Материалы берут с помощью стерильных тампонов, ректальных трубок, специальных металлических петель, шприцов и т.п., помещают в стерильную посуду, которую тщательно закупоривают и доставляют в бактериологическую лабораторию. От момента взятия материала до посева должно пройти не более 2-х часов. Для продления этого срока необходимо поместить исследуемые пробы в консервирующие жидкости или в транспортные среды (особенно при выделении шигелл) с последующим хранением их в холодильнике при 0-2°C.

Диареегенные эшерихии — возбудители кишечной коли-инфекции

1. Таксономия и классификация

Эшерихии — наиболее распространенные аэробные бактерии кишечника, способные при определенных условиях вызывать обширную группу заболеваний человека, как кишечной (диарея), так и внекишечной (бактеремия, инфекции мочевыводящих путей и др.) локализации. Семейство *Enterobacteriaceae*, род *Escherichia*, основной вид — *E.coli* (кишечная палочка) — самый распространенный возбудитель инфекционных заболеваний, вызываемых энтеробактериями. Вид *E. coli* не является однородным, а подразделяется на подвиды. Различают непатогенные, условно-патогенные эшерихии и диареегенные, обладающие вирулентностью.

Непатогенные и условно-патогенные эшерихии входят у человека в состав микрофлоры кишечника и влагалища. *E. coli* является резидентом толстого кишечника и участвует в пищеварении, частично расщепляя клетчатку, синтезирует витамины В, Е, К, являются антагонистом патогенных микроорганизмов, блокируя их рецепторы и выделяя колицины (антибиотические вещества узкого спектра действия). С испражнениями выделяется в окружающую среду. Присутствие кишечной палочки в воде, почве, продуктах, предметах обихода является показателем фекального загрязнения, особенно воды. Коли — титр и коли — индекс часто использовали как санитарные показатели свежего фекального загрязнения.

2. Нозологические формы

Условно-патогенные *E. coli* способны вызывать эндогенные гнойно-воспалительные процессы различной локализации, называемые парентеральными эшерихиозами. Парентеральный эшерихиоз может протекать в виде сепсиса, нагноения ран, вторичной пневмонии, менингита, инфекции мочевыводящих путей. Часто возникают на фоне иммунодефицита.

Штаммы *E. coli*, вовлеченные в инфекционный процесс нижних отделов мочевыводящих путей, обладают специфическим О-антигеном, позволяющим им адгезироваться на поверхности эпителия мочевого пузыря. Те штаммы *E. coli*, которые вызывают инфекцию верхних отделов мочевыводящих путей (пиелонефрит), имеют особые Р-фимбрии, обладающие антигенными свойствами. Эти Р-фимбрии позволяют микробу адгезироваться на эпителии собирательных канальцев.

Подавляющее число (около 80 %) менингитов новорожденных вызваны *E. coli*, которая попадает при прохождении через родовые пути. *E. coli*, вызывающие неонатальный менингит, часто обладает микрокапсулой, состоящей из гомополимера сиаловой кислоты. Наличие микрокапсулы придает возбудителю антифагоцитарные свойства, так как микроб перестает опсонизироваться из-за потери способности активировать комплемент.

Из условно-патогенных *E. coli* могут формироваться полирезистентные к антибиотикам штаммы за счет приобретения R-плазмид, которые становятся возбудителями внутрибольничных инфекций.

Патогенные *E. coli*, которые являются возбудителями кишечного эшерихиоза, получили название диареогенных. Кишечный эшерихиоз — инфекционное заболевание ЖКТ, вызываемое патогенными серотипами кишечной палочки, характеризующееся возможностью поражения как тонкой, так и толстой кишки (энтероколиты).

3. Эпидемиология и пути передачи

Основной механизм распространения диареогенных кишечных палочек — фекально-оральный. Заражение может происходить через пищу, воду, при уходе за животными. Поскольку эшерихии обитают в кишечниках многих видов животных, конкретный источник заражения установить сложно. Контактный путь заражения может быть в закрытых заведениях. В течение нескольких месяцев сохраняются в воде и почве. Погибают при нагревании до 55°C в течение 60 мин, при 60 °C — в течение 15 мин. Эшерихии, находящиеся в окружающей среде способны переходить в некультивируемую форму.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

E. coli представлены прямыми грамтрицательными палочками, размером 0,4-0,6x2,0-6,0 мкм, подвижные за счет перитрихально расположенных жгутиков. Для некоторых характерно наличие микрокапсулы, построенной из гомополимера сиаловой кислоты; такие штаммы обозначаются как K⁺.

5. Питательные среды и культуральные свойства

На жидких средах *E. coli* дает диффузное помутнение, на плотных средах образует S-и R-формы колоний. На основной для эшерихий среде Эндо лактозоферментирующие кишечные палочки образуют интенсивно красные колонии с металлическим блеском, не ферментирующие — бледно-розовые или бесцветные колонии с более темным центром, на среде Плоскирева — красные с желтоватым оттенком, на среде Левина — темно-синие с металлическим блеском.

6. Антигенная структура

Какие-либо существенные морфологические различия между патогенными и непатогенными кишечными палочками не обнаружены. Их дифференциация основана на изучении антигенных свойств. *E. coli* обладает сложной антигенной структурой. Среди поверхностных антигенов выделяют полисахаридные соматические О-антигены, входящие в ЛПС клеточной стенки, термостабильные; жгутиковые Н-антигены из белка флагеллина жгутиков, термолабильные и капсульные полисахаридные К-антигены. Поверхностный К-антиген может быть представлен 3 фракциями: А, В и L, отличающимися по чувствительности к температуре и химическим веществам (L-и В-антигены — в разной степени термолабильные и А-антигены термостабильные). У эшерихий встречается более 97 разновидностей К-антигена, преимущественно В типа. К-антиген обладает способностью маскировать О-антиген, вызывая феномен О-инагглютинабельности. В этом случае О-антиген можно выявить только после разрушения К-антигена кипячением. Известно более 170 вариантов О-антигенов (это соответствует принадлежности возбудителя к определенной серогруппе) и 57 — Н-антигенов (принадлежность к серовару). В состав *диареегенных* (вызывающих диарею) кишечных палочек входят 43 О-группы и 57 ОН-вариантов.

По О-антигену (или по сочетанию ОК-антигенов) энтеропатогенные эшерихии разделены на серогруппы, по К-и Н-антигенам — на серовары. Антигенная формула диареегенных эшерихий обычно включает все три типа антигенов, например: O1:K55:H12, O55:K59:H6. Имеются штаммы, содержащие два типа антигенов, например: O124:K72, O75:H7. Антигенную характеристику (формулу) выделенных культур *E. coli* от больных энтеральными эшерихиозами используют при эпидемиологическом анализе. Кишечные коли-инфекции могут иметь различное клиническое течение и другие существенные отличия в зависимости от серогруппы и серовара, к которым относится возбудитель.

7. Биохимические свойства

Кишечная палочка обладает выраженной биохимической активностью и в большинстве случаев ферментирует углеводы (глюкозу, лактозу, маннит, арабинозу, галактозу и др.) с образованием кислоты и газа, образует индол, но не образует сероводород, не разжижает желатин.

8. Факторы патогенности диареегенных *E. coli*

У диареегенных эшерихий обнаружены факторы адгезии и колонизации, факторы инвазии, эндотоксин и экзотоксины. Причем, разные категории эшерихий отличаются по имеющимся у них факторам патогенности и их свойствам. Наиболее изучены следующие:

1. Факторы адгезии, колонизации и инвазии, связанные с пиллями, фимбриальными структурами, белками наружной мембраны. Они кодируются плазмидными генами и способствуют колонизации нижних отделов тонкой кишки.

2. Эндотоксин (липополисахарид). Все штаммы *E. coli* имеют эндотоксин, который обладает адгезивными свойствами и может быть причиной эндотоксикоза.

3. Экзотоксины: У диареегенных *E. coli* имеются экзотоксины, которые подразделяются на цитотонины и цитотоксины. Некоторые диареегенные *E. coli* синтезируют *гемоллизин*, для патогенных кишечных палочек характерна выработка бактериоцинов (колицинов).

Цитотонины или энтеротоксины (стимулируют гиперсекрецию клетками кишечника жидкости, нарушают водно-солевой обмен и способствуют развитию диареи). Они подразделяются на:

а) *Термолабильные энтеротоксины* — это белки с м.м. 60000-83000, обладают антигенными свойствами, имеют много сходных свойств с холерогенным токсином. Механизм действия токсинов идентичен механизму действия холерогена: токсин состоит из 5 субъединиц В (акцептор) и 1 субъединицы А (активатор), которая расщепляется после прикрепления на ганглиозидах эпителиоцитов на А1 и А2. А2 служит для связи с субъединицами В, а А1 является собственно токсином. Токсин А активизирует аденилатциклазную систему, в результате накапливается цАМФ. Это ведет к нарушению водно-электролитического баланса, изменяется активный транспорт ионов: в области крипт эпителиоциты усиленно выделяют анионы Cl, HCO, катионы Na, K. Затруднено всасывание

воды, за ионами из клеток выходит вода что дополнительно усиливает аденилатциклазу. Действие токсина приводит к обезвоживанию организма и к гипокалиемии.

б) *Термостабильный энтеротоксин* имеет м.м. 2000-10000, не обладает антигенными свойствами. По структуре сходен с LT-токсином. Действует на гуанилат-циклазную систему, что приводит также к нарушению водно-солевого обмена и к диарее, но диарея умеренная и более продолжительная.

Цитотоксины (шигоподобные токсины) действуют на клетки стенки кишечника и эндотелия капилляров. Эти токсины по антигенным свойствам идентичны токсину Шига возбудителей дизентерии и нейтрализуются антисывороткой к токсину Шига. Шигоподобные токсины вызывают нарушение синтеза белка в эпителиоцитах слизистой толстого кишечника, что приводит к их гибели, обладают также и нейротоксическим действием.

9. Патогенез

На основании различий в антигенных свойствах и факторах патогенности возбудителей, в особенностях патогенеза, локализации патологического процесса, клинических и эпидемиологических отличий у вызываемых ими заболеваний, диареегенные эшерихии делят на пять категорий: энтеротоксигенные, энтероинвазивные, энтеропатогенные, энтерогеморрагические, энтероадгезивные. Для каждой категории характерна принадлежность к определенным серогруппам (табл. 6).

Таблица 12. Серогруппы *E. coli*, наиболее часто вызывающие поражения у человека

Категория	Серогруппа
Энтеротоксигенные <i>E. coli</i> (ЭТЭ, ЕТЕС)	O6, O8, O20, O25, O63, O78, O80, O85, O115, O128ac, O139, O148, O153, O159, O167
Энтеропатогенные <i>E. coli</i> (ЭПЭ, ЕРЕС)	O55, O86, O1, O119, O125, O126, O127, O128ав, O142
Энтероинвазивные <i>E. coli</i> (ЭИЭ, ЕИЕС)	O26ac, O29, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167
Энтерогеморрагические <i>E. coli</i> (ЭГЭ, ЕНЕС)	O157, O26, O111, O145, O104
Энтероагрегирующие (энтероадгезивные) <i>E. coli</i> (ЭАгЭ, ЕА-gЕС)	Не выяснены

Энтеротоксигенные E. coli имеют высокомолекулярный термолабильный токсин, схожий по действию с холерным, вызывают холероподобную диарею (гастроэнтериты у детей младшего возраста, диарею путешественников и др.).

Энтероинвазивные кишечные палочки способны проникать и размножаться в клетках эпителия кишечника. Вызывают профузную диарею с примесью крови и большим количеством лейкоцитов (показатель инвазивного процесса) в испражнениях. Клинически напоминает дизентерию.

Энтеропатогенные E. coli — основные возбудители диареи у детей (сальмонеллезоподобные заболевания). В основе поражений — адгезия бактерий к эпителию кишечника с повреждением микроворсинок. Характерна водянистая диарея и выраженное обезвоживание.

Энтерогеморрагические кишечные палочки вызывают диарею с примесью крови (геморрагический колит), гемолитико-уремический синдром (гемолитическая анемия в сочетании с почечной недостаточностью).

Энтероадгезивные E. coli не образуют цитотоксины, слабо изучены.

Таблица 13. Заболевания, вызываемые диареегенными *E. coli*

Категория	Патогенез	Клинические проявления	Локализация
ЭТЭ Неинвазивные, не цитотоксические,	Прикрепляются к эпителию кишечника при помощи фимбрий и	Холероподобное течение: тошнота, рвота,	Тонкий кишечник

высоко энтеротоксигенные	колонируют его. Секретируемые энтеротоксины проникают в эпителиоциты и нарушают в них водно-электролитный баланс и вызывают обильную водянистую диарею «секреторного типа» с развитием обезвоживания организма. Повреждения и воспаления слизистой не происходит.	кишечные спазмы, водянистая диарея, обезвоживание организма. Болеют как дети (диарея новорожденных), так и взрослые (диарея путешественников)	
ЭПЭ цитотоксичные, ограничено инвазивные, иногда энтеротоксигенные	Адгезия и колонизация при помощи белков наружной мембраны, пилей и других адгезинов приводит к сглаживанию микроворсинок энтероцитов слизистой. Затем они захватываются энтероцитами и фагоцитируются в пейеровых бляшках. При разрушении выделяют эндотоксин, в результате чего развивается умеренное воспаление, нарушается всасывание воды и развивается диарея.	Коли-энтерит: диарея с высокой температурой, тошнотой, рвотой, стул без примеси крови. Чаще всего болеют новорожденные и дети первых 2-х лет жизни	Тонкий кишечник
ЭИЭ высоко инвазивные, цитотоксичные	Адгезия и колонизация на клетках слизистой, инвазия в эпителиоциты при помощи белков наружной мембраны в вакуоли, выход из вакуолей в цитоплазму и размножение в ней. Цитотоксические повреждения ведут к повреждению и гибели клеток эпителия. Развивается воспаление и изъязвление слизистой оболочки и диарея «инвазивного типа».	Дизентериеподобное течение: высокая температура, тенезмы, вначале водянистая диарея, затем в испражнениях примесь крови и слизи.	Нижний отдел подвздошной кишки и толстая кишка
ЭГЭ цитотоксичные	Адгезия и колонизация с помощью адгезинов. Продуцируемые шигаподобные цитотоксины нарушают синтез белка в эпителиоцитах, вызывают их гибель. Токсины действуют на клетки слизистой кишечника, клетки эндотелия капилляров, вызывая некроз стенок капилляров, образование тромбов, кровотечение, ишемию окружающей ткани. Оказывают также нейротоксическое действие.	Геморрагический колит: сильные спазмы кишечника Диарея с кровью. Часто наблюдается уремический синдром: острая почечная — недостаточность, тромбоцитопения, гемолитическая анемия	Толстый кишечник, особенно слепая кишка
ЭАГЭ неинвазивные, нецитотоксические	Адгезия на слизистой кишечника при помощи фимбрий, пилей и др. адгезинов ведет к агрегации клеток, что препятствует всасыванию жидкости из просвета кишечника с развитием диареи	Тошнота, рвота, водянистая диарея с длительным течением, приводящая к обезвоживанию организма	Тонкий кишечник

10. Иммуитет

Естественный иммунитет против коли-инфекции обеспечивается бифидобактериями и антителами грудного материнского молока. Грудное молоко стимулирует развитие бифидофлоры. Сывороточные антитела IgM против энтеропатогенных штаммов эшерихий не проходят через плаценту, поэтому маленькие дети легко заболевают колиэнтеритом при заражении энтеропатогенными штаммами. Сывороточные антитела против дизентериеподобного эшерихиоза передаётся ребёнку от матери антителами IgG, которые

проходят через плаценту, поэтому маленькие дети не восприимчивы к дизентериеподобному эшерихиозу (и к дизентерии).

Формирование местного иммунитета кишечника детей взрослых связано с секреторными SIgA, продуцируемыми лимфоидными клетками кишечника. После заболевания формируется группоспецифический слабо выраженный иммунитет. Возможны повторные заболевания.

11. Методы лабораторной диагностики

Лабораторная диагностика энтеральных эшерихиозов (кишечной коли-инфекции) проводится бактериологическим методом. Поиск патогенных вариантов E.coli в исследуемом материале (испражнения) чаще всего проводят на фоне обильного роста банальных E.coli, что весьма затрудняет выделение и идентификацию диареогенных E.coli. Основным подходом является выделение чистой культуры на дифференциально-диагностических средах и ее идентификация по антигенным свойствам. Ставят РА с набором поливалентных ОК (к О-и К-антигенам) сывороток, затем — адсорбированных О-сывороток и прогревают при 100 °С (для разрушения К-антигенов) культурами или латекс-агглютинацию.

Биохимическая дифференциация имеет дополнительное значение. Идентификация диареогенных типов возможна при выявлении специфических маркеров (энтерогеморрагические кишечные палочки не ферментируют сорбит, а серовар O157: H7 не проявляет бета — глюкуронидазной активности).

Этапы бактериологического исследования кишечной коли-инфекции — см. таблицу 13.

Таблица 13. Бактериологическое исследование кишечной коли-инфекции

Этап исследования	Ход исследования	Результат
1-й	Посев исследуемого материала на чашку Петри со средой Эндо	На среде Эндо рост лактозоположительных колоний
2-й	Постановка ориентировочной реакции агглютинации на стекле лак+ колоний с поливалентным препаратом ОК(ОВ)-сыворотки. Оставшуюся часть колонии, давшей положительную реакцию агглютинации засевают на скошенный агар для получения чистой культуры и в API 20 E тест-систему или др. тест-системы	При положительной реакции агглютинации отобранной колонии с ОК(ОВ)-сывороточным препаратом делают предварительное заключение о принадлежности колонии к ЭПЭ
3-й	Идентификации чистой культуры: а) изучение морфологических свойств в мазке окрашенном по Граму;; б) учет биохимического тестирования в) серологическая идентификация; 1. постановка реакции агглютинации на стекле с каждой адсорбированной ОК-сывороткой, входящей в состав поливалентной сыворотки, давшей реакцию агглютинации; 2. постановка реакции агглютинации на стекле с адсорбированными групповыми и факторными О-сыворотками.	а) в поле зрения видны грамтрицательные короткие палочки с закругленными концами, расположенные беспорядочно; б) биохимические свойства, характерные для E.coli: 1. культура агглютинируется ОК-коли-сывороткой, при этом определяется К-антиген; 2. культура дает положительную реакцию агглютинации с групповой, адсорбированной коли-сывороткой
4-й	Учет результатов идентификации и заключение по проведенному исследованию	Заключение: из испражнения больного выделена E.coli. серогруппы О, типичная по свойствам.

Исследуемый материал засевают на среду Эндо, предварительно разведя его физ. раствором. Через сутки изучают колонии, выросшие на среде. Кишечные палочки вырастают на среде Эндо в виде малиново-красных колоний с металлическим блеском или без него. При росте на этой среде кишечная палочка разлагает лактозу, образуются кислые продукты, восстанавливающие фуксин из бесцветного соединения в красный, и поэтому вырастают колонии, окрашенные в малиново-красный цвет. Отбор колоний патогенных кишечных палочек проводят с помощью ориентировочной реакции агглютинации с диагностической ОК(ОВ) сывороткой.

При отсутствии реакции агглютинации дают отрицательный ответ. При положительной реакции агглютинации необходимо подтвердить принадлежность выделенной культуры к роду кишечных палочек. Для этого культуру засевают на жидкие среды Гисса с лактозой, глюкозой, мальтозой, маннитом, сахарозой, в пробирку с МПБ для обнаружения индола и сероводорода, определяют подвижность.

Биохимические изменения на пестром ряду с посевом кишечной палочки

Лактоза	Глюкоза	Маннит	Мальтоза	Сахароза	МПБ	
					Индол	Сероводород
КГ	КГ	КГ	КГ	-	+	-

КГ — ферментация углевода с образованием кислоты и газа

Для окончательной идентификации выделенных эшерихий ставят развернутую реакцию агглютинации с типовой коли-ОК(ОВ)-сывороткой. Реакцию ставят с живой культурой для установления К-антигена и с гретой культурой для установления О-антигена. По результатам пестрого ряда и развернутой реакции агглютинации может быть дан окончательный ответ.

Серологическая диагностика при кишечных инфекциях используется для подтверждения этиологического значения выделенных эшерихий в качестве возбудителя заболевания, в научно-исследовательских целях для изучения патогенеза и иммунитета кишечных заболеваний.

Основана она на обнаружении антител в сыворотке крови. Обнаруживают О-антитела в реакции агглютинации, используя в качестве антигена культуру, выделенную от больного и кипяченую в течение 2 часов. Положительная реакция проявляется непостоянно, титр антител невысокий — ниже 1:100. В-антитела не обнаруживаются.

Можно использовать реакцию пассивной гемагглютинации, которая более чувствительна. В качестве диагностикума используют эритроциты барана, сенсibilизированные смывом 48-часовой культуры, кипяченой 2 часа. Следовательно, в РПГА также выявляют только О-антитела. Эта реакция позволяет отличить больных от людей, выделяющих энтеропатогенные кишечные палочки без клинических проявлений болезни, у последних антитела не обнаруживаются.

Ускоренные методы лабораторной диагностики. Классическое бактериологическое исследование длится 4-5 дней. Это не всегда устраивает и клиницистов и эпидемиологов, поэтому прилагается много усилий, чтобы сократить время исследования и ускорить ответ лаборатории. Для решения этой проблемы предложено использовать наиболее рациональные питательные среды, сокращать интервалы между исследованиями, а также применять методы, основанные на определении антигенной структуры кишечных палочек. Наиболее чувствительным и быстрым методом является метод иммунофлюоресценции, основанный на обнаружении специфического антигена кишечных палочек в исследуемом материале с помощью флюоресцирующих антител.

12. Лечение и профилактика.

Специфическая профилактика не разработана. Общегигиенические и санитарно-противоэпидемические меры. Учитывая, что наиболее часто эшерихиозы поражают новорожденных и дают вспышки в детских коллективах, необходимо проводить тщательный контроль за производством и продажей молочных смесей, детского питания, режимом работы столовых в детских садах, школах, интернатах, выявление больных и носителей, их изоляция и лечение. Необходимо также проводить сан-просвет-работу с матерями в

отношении сроков годности продуктов детского питания. Особенно при искусственном вскармливании.

Лечение: Основу химиотерапии эшерихиозов составляет назначение эффективных антимикробных средств (ампициллин, ко-тримоксазол, норфлоксацин, нитрофурановые препараты и др.). Также используются биологические препараты из микробов-антагонистов (бифидумбактерин, лактобактерин).

***Yersinia enterocolitica* — возбудитель кишечного иерсиниоза**

1. Таксономия классификация

Возбудитель *Yersinia enterocolitica* относится к семейству энтеробактерий. Род *Yersinia* включает подвижные и неподвижные споронеобразующие палочки (иногда коккобациллы), окрашивающиеся по Граму биполярно. У человека *Y. pestis* вызывает чуму, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* — гастроэнтериты, брыжеечный лимфаденит, хроническую диарею и тяжёлые септицемии.

2. Нозологические формы

Кишечный иерсиниоз — острое инфекционное сапронозное заболевание, вызываемое иерсиниями и характеризующееся поражением преимущественно тонкой кишки, лимфатического аппарата кишечника, развитием бактериемии и выраженной интоксикации. Протекает с явлениями гастроэнтероколита и лихорадкой.

3. Эпидемиология и пути передачи

Y. enterocolitica широко распространены в природе. Бактерии выделяют из кишечника членистоногих, моллюсков, птиц, грызунов и многих других животных. Кроме того, иерсинии часто встречаются в почве, воде, на растительных остатках, корнеплодах, где не только сохраняются, но способны размножаться, т.е. обладают свойствами сапронозов. Это связано с их психрофильностью и особенностями питания. Сохранение иерсиний в природе поддерживается некоторыми видами инфузорий, внутри которых они паразитируют.

Основные источники кишечного иерсиниоза — сельскохозяйственные животные (свиньи, крупный и мелкий рогатый скот, домашняя птица), а также грызуны, собаки и кошки. Механизм передачи возбудителя — фекально-оральный, путь — пищевой (заражение происходит при употреблении человеком инфицированных мясных продуктов, овощей, воды). В инфицированных продуктах: мясе, молоке, на овощах, хранящихся в холодильнике, иерсинии продолжают размножаться и могут накапливаться в большом количестве (кишечный иерсиниоз — "болезнь холодильников"). Иногда встречаются профессиональные заболевания у сельскохозяйственных рабочих. Роль человека, как источника инфекции, невелика, но возможно инфицирование при тесном кон-такте, а также внутрибольничные заражения. Заболевания регистрируются в виде вспышек или спорадических случаев, причем заболеваемость сельского населения выше, чем у городского. У практически здоровых лиц инфекционный процесс часто протекает бессимптомно, вызывая иммунный ответ.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Y. enterocolitica — полиморфные, чаще овоидные биполярно окрашенные грамтрицательные палочки, не образующие спор и капсул. Бактерии подвижны (перитрихи), однако подвижность наблюдают только в культурах, выращенных при 18–22 °С.

5. Питательный среды и культуральные свойства

Бактерии хорошо растут на простых питательных средах при температуре 20–26 °С., на плотных средах образуют мелкие блестящие, часто выпуклые S-колонии с голубоватым оттенком в проходящем свете. Образование R-колоний для бактерий нехарактерно. При культивировании на среде Эндо (48 ч при 37 °С) вырастают колонии розоватого оттенка. При культивировании в жидких питательных средах микроорганизм вызывает их помутнение.

6. Антигенная структура

У *Y. enterocolitica* выявлен О-Аг (эндотоксин), похожий на Аг многих грамтрицательных бактерий и токсичный для животных и человека и Н-Аг (жгутиковый). По структуре О-Аг выделяют 34 серовара. Подавляющее большинство поражений вызывают серовары О3 и О9, реже — О5–О8.

7. Биохимические свойства

Иерсинии хемоорганотрофы, оксидаза-отрицательны и каталаза-положительны. Расщепляют мочевины, ферментируют сахарозу, не ферментируют рамнозу, продуцируют орнитиндекарбоксилазу. По комплексу биохимических свойств вид *Y. enterocolitica* подразделяется на 5 биоваров, из них наибольшее значение в патологии имеют биовары 3 и 4.

8. Факторы патогенности

Yersinia enterocolitica является факультативным внутриклеточным паразитом, обладает выраженными адгезивными и инвазивными свойствами, имеет эндотоксин и термостабильный энтеротоксин. Патогенность их связана с инвазивными свойствами и действием токсинов, вирулентные штаммы обладают устойчивостью к фагоцитозу и бактерицидному действию сыворотки.

Факторы адгезии — комплекс белков наружной мембраны и фимбриальный гемагглютинин, все они контролируются плазмидными генами. Наружный мембранный белок — *инвазин* закодирован в хромосоме. Инвазин эффективно присоединяется к бета-интегринам плазматической мембраны эпителиоцитов, способствуя эндоцитозу, проникновению возбудителя внутрь клетки. У иерсиний имеются также специальные белки наружной мембраны, которые обуславливают выживание возбудителей внутри макрофагов, где иерсинии размножаются.

Образуемый *Yersinia enterocolitica* термостабильный энтеротоксин по своему действию аналогичен энтеротоксину эшерихий. Он нарушает функции гуанилатциклазной системы, что в конечном итоге приводит к развитию диареи.

Нужно отметить, что часть факторов патогенности образуется только при температуре 37°C, а не при оптимальной для иерсиний 22–28°C. Чтобы быть способными вызывать инфекцию, инфицированные продукты должны предварительно 3–4 дня находиться в холодильнике.

9. Патогенез

Попав вместе с пищей в ЖКТ, возбудители взаимодействуют с клетками эпителия илеоцекальной области кишечника, в чем принимают участие факторы адгезии и инвазии. Иерсинии начинают размножаться в слое слизи дистального отдела подвздошной кишки, затем внедряются в М-клетки пейеровых бляшек, размножаются в них, вызывая их повреждения (развивается энтероколит). Далее возбудители проникают в субэпителиальную ткань, захватываются макрофагами пейеровых бляшек, в которых размножаются.

Находясь внутри макрофагов, иерсиний по лимфатическим сосудам попадают в мезентериальные узлы, где продолжается их внутриклеточное размножение, которое сопровождается воспалением лимфоузлов. В воспалительный процесс может быть вовлечен червеобразный отросток. Одновременно с размножением часть бактерий гибнет, освобождая эндотоксин, который оказывает токсическое действие на различные системы и органы. В процессе развития инфекционного процесса накапливается также энтеротоксин, ответственный за возникновение диареи.

В зависимости от степени вирулентности возбудителя и состояния иммунной системы заразившегося человека, кишечный иерсиниоз может протекать бессимптомно, как непродолжительная диарея (энтерит) или принимать более тяжелое течение, вплоть до септической формы с развитием токсического гепатита, поражения мозговых оболочек, а также суставов. Но чаще всего болезнь протекает в виде гастроэнтероколита средней тяжести. Различают следующие клинические формы заболевания: гастроэнтероколитическую, аппендикулярную, септическую и бессимптомную.

Могут возникать осложнения, часто аллергического характера, в виде поражения суставов, развития узелковой эритемы, миокардита, гломерулонефрита.

Клиника: Инкубационный период 1–6 дней. Начало острое. Выраженная интоксикация, головная боль, озноб, тошнота, повышение температуры до 38–39°C, диспепсический синдром. Может появляться сыпь на 3–7-й день, полиморфная, с тенденцией к слиянию в области крупных суставов, на симметричных участках тела и конечностей. При разрешении сыпи остается шелушение и пигментация. Артралгический синдром. Проявления артритов

чаще со стороны крупных и средних суставов. Синдром желтухи встречается у 5-10% больных. Возможен гепатолиенальный синдром и лимфаденопатия.

10. Иммунитет

Изучен недостаточно. Известно, что острый период характеризуется снижением абсолютного числа Т-лимфоцитов и увеличением В-лимфоцитов. При полноценном иммунном ответе происходит постепенное нарастание количества Т-лимфоцитов с их нормализацией в периоде реконвалесценции. Низкий уровень Т-лимфоцитов является неблагоприятным прогностическим признаком, свидетельствующим о возможности рецидива или перехода в хроническую форму. В течение болезни накапливаются антитела к возбудителю, максимальный уровень которых наблюдается на 3-4 неделе болезни. Титр их в реакции агглютинации бывает не выше 1:800.

11. Методы лабораторной диагностики

Применяют бактериологический и серологический методы исследования, иногда кожно-аллергическую пробу или ПЦР. Из исследуемого материала (испражнения больного, кровь, гной, ликвор) выделяют культуру и ее идентифицируют.

Бактериологическое исследование проводят по "холодовой" методике Петерсона, учитывая психрофильность иерсиний. Взятый материал до отправки в лабораторию хранят в холодильнике при 3-4° С. Поступивший для исследования материал снова помещают в холодильник и сохраняют там до положительного результата посева (до 3-х недель). Материал высевают каждые 3-4 дня на среду Эндо и другие питательные среды, применяемые для выделения иерсиний. Чашки с посевами инкубируют в термостате при температуре 22-26° С. Со среды Эндо отбирают подозрительные колонии: мелкие, блестящие, выпуклые, бесцветные (лак-), типичные для иерсиний и засевают их на скошенный МПА для получения чистой культуры. Выросшую культуру идентифицируют, определяют ее принадлежность к определенному биовару, серовару и фаговару. Их определение помогает установить источник заражения (эпидемиологические маркеры). Продолжительность бактериологического исследования нередко достигает 2-3 недель и более.

Серологический метод имеет важное значение, т.к. дает возможность ускорить диагноз. Его проводят с целью обнаружения специфических антител в сыворотке больного, которые появляются на 5-7 день болезни. Ставят реакцию развернутой агглютинации, РПГА. Диагностический титр антител 1:200. Достоверность диагноза повышается, если при исследовании парных сывороток больного наблюдают прирост антител на менее чем в 4 раза.

В качестве *экспресс-метода* используют ИФА для определения антигенов в исследуемых материалах. Возможно применение ПЦР.

Аллергический метод. Уже в начале заболевания иерсиниозом формируется гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ), которая сохраняется длительное время. Наличие инфекционной аллергии выявляют с помощью кожных аллергических проб, которые ставят путем внутрикожного введения препаратов энтероиерсина.

12. Лечение и профилактика

Специфическая профилактика не разработана. Неспецифическая профилактика заключается в постоянном санитарном контроле за водоснабжением, технологическим режимом обработки и хранения пищевых продуктов, в борьбе с грызунами. Лечение больных кишечным иерсиниозом проводят антибиотиками (чаще назначают цефалоспорины, аминогликозиды, левомицетин) и сульфаниламидами. Патогенетическая терапия: детоксицирующие нестероидные противовоспалительные средства.

1. План самостоятельной работы:

1. Посев штрихами испражнений больного на питательные среды Эндо или Левина с целью получения изолированных колоний.

2. Изучить и описать культуральные свойства колоний *E. coli* на среде Эндо.

На среде Эндо кишечная палочка образует круглые, выпуклые, гладкие колонии малиново-красного цвета с металлическим блеском. Среда Эндо — это дифференциально-

диагностическая среда, которая кроме питательной основы, среда содержит 1% лактозу и насыщенный спиртовой раствор основного фуксина. Свежеприготовленная среда Эндо бесцветна или слегка розовая. При росте на этой среде кишечная палочка разлагает лактозу, образуются кислые продукты, они восстанавливают фуксин из бесцветного соединения в красный и поэтому вырастают колонии, окрашенные в малиново-красный цвет.

3. Изучить развёрнутую реакцию агглютинации с "живой" и "гретой" культурой при идентификации возбудителя колиэнтеритов.

Метод диагностики: бактериологический

Ингредиенты реакции: бактериальная суспензия (взвесь бактерий в физиологическом растворе), диагностические сыворотки, содержащие антитела к O55 и K11 антигенам, физиологический раствор.

Постановка: Диагностические сыворотки разводят в двух рядах, используя физиологический раствор. Для приготовления бактериальной суспензии добавить культуру с поверхности питательной среды в 3-5 мл физиологического раствора, разлить взвесь в 2 стерильные пробирки. Одну из них прогреть на водяной бане при 100°C в течение часа. В первый ряд добавляем несколько капель «живой» бактериальной суспензии, во второй ряд добавляем несколько капель бактериальной суспензии, «гретой» на водяной бане. Инкубируем в термостате 24 часа и учитываем результат.

Учет реакций агглютинации: Положительный результат — образование белого зонтика, отрицательный образование белой пуговки. Реакция считается положительной, если агглютинация с гретой культурой отмечается в разведении сыворотки не ниже половины титра сыворотки, а с живой не менее, чем 1:200 (диагностический титр реакции). Если реакция положительна, то выдают ответ в следующей формулировке "Выделена патогенная кишечная палочка серовара O55:K11.

4. Учесть биохимические свойства E. coli.

Ингредиенты: Среда Ресселя, которая содержит лактозу и глюкозу и пестрый ряд Гиса, состоящий из пяти углеводов. Кроме питательной основы и углевода к среде добавлен индикатор. Исходный цвет среды розовый, при образовании кислоты цвет среды становится синим. Газообразование улавливают с помощью поплавков-коротких стеклянных трубочек, запаянных с одного конца, помещенных в питательную среду, открытым концом вниз. Образование индола и сероводорода определено с помощью индикаторных бумажек. При образовании индола индикаторная бумажка, пропитанная насыщенным раствором щавелевой кислоты, розовеет. При образования сероводорода индикаторная бумажка, пропитанная уксуснокислым свинцом, чернеет.

Постановка: Пересев колоний со среды Ресселя на ряд Гиса и МПБ и инкубация 24 часа в термостате.

Биохимические изменения на пестром ряду с посевом кишечной палочки

Лактоза	Глюкоза	Маннит	Мальтоза	Сахароза	МПБ	
					Индол	Сероводород
До кислоты и газа	До кислоты и газа	До кислоты и газа	До кислоты и газа	-	+	-

Таким образом, для кишечной палочки характерна ферментация лактозы, глюкозы, мальтозы и маннита с образованием кислоты и газа, отсутствие ферментации сахарозы и образование индола.

5. Заполнить таблицу «Заболевания, вызываемые диареогенными E. coli».

6. Решение ситуационных задач

III модуль «Кишечные инфекции»

Занятие № 2

ТЕМА: Микробиологическая диагностика дизентерии, брюшного тифа, паратифов А и В, сальмонеллезных гастроэнтеритов

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: знать таксономию, основные свойства возбудителей, эпидемиологию, микробиологическую диагностику, принципы профилактики и лечения

уметь: учитывать характер роста на средах Эндо, Левина возбудителей дизентерии, ставить реакцию агглютинации на стекле, делать пересев на среду Ресселя, учитывать их биохимические свойства и реакцию агглютинации с парными сыворотками, реакцию Видаля

Задание на дом

1. Вопросы для самоподготовки:

- 1) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики дизентерии.
- 2) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики брюшного тифа, паратифов А и В.
- 3) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики сальмонеллезных гастроэнтеритов.

Шигеллы — возбудители дизентерии

1. Таксономия, классификация

Шигеллы — кишечные патогены человека и приматов, которые вызывают бактериальную дизентерию или шигеллезы. В соответствии со структурой О-антигена и биохимическими свойствами известные серотипы шигелл разделяют на четыре серогруппы — *S.dysenteriae* (серогруппа А), *S.flexneri* (серогруппа В), *S.boydii* (серогруппа С) и *S.sonnei* (серогруппа Д). Наибольшее распространение имеют *S. flexneri* и *S. sonnei*.

2. Нозологические формы

Дизентерия — острая кишечная инфекция, которая характеризуется поражением дистального отдела толстой кишки с развитием колитического синдрома и общей интоксикацией организма. Выделяют острую дизентерию, хроническую дизентерию, а также колитический или гастроэнтероколитический варианты течения.

3. Эпидемиология и пути передачи

Бактериальная дизентерия распространена повсеместно. В некоторых регионах шигеллез остаётся эндемичным и наиболее часто поражает детей в возрасте от 3 мес до 10 лет. Единственный природный резервуар шигелл и источник инфекции — человек с различными формами клинического проявления шигеллезов или бактерионоситель. Основные механизмы передачи — фекально-оральный и контактно-бытовой (через воду, пищевые продукты). Определённую роль играют насекомые-переносчики (мухи, тараканы и др.), переносящие возбудитель на пищевые продукты. Механизм заражения — фекально-оральный. Для различных видов шигелл характерны преобладающие пути передачи (контактно-бытовой — для *S.dysenteriae*, пищевой — для *S.sonnei*, водный — для *S.flexneri*). Для эпидемического процесса характерно изменение структуры циркулирующих популяций возбудителей — смена ведущих видов, биоваров, сероваров, что связано как с изменениями популяционного иммунитета, так и с изменениями свойств возбудителя, особенно с приобретением различных плазмид (R, F, Col и др.). Инфицирующая доза — порядка 200 — 300 шигелл. Более легкое течение имеет дизентерия, вызванная шигеллами Зонне. Дизентерию регистрируют в течение всего года с подъёмом заболеваемости в тёплый сезон. Шигеллы довольно устойчивы во внешней среде: на ткани и бумаге сохраняются до 1 мес, в высушенных испражнениях — до 5 мес, в почве — 3–4 мес, в воде — до 15 дней. На овощах и фруктах они остаются живыми не более 2 нед, в молоке и молочных продуктах — несколько недель. При 60°C погибают в течение 15–20 мин, при кипячении — мгновенно. Бактерии очень чувствительны к действию дезинфицирующих средств, содержащих хлор.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

По морфологическим признакам шигеллы не отличаются от остальных энтеробактерий. Это неподвижные, не имеющие жгутиков, факультативно-анаэробные небольшие грамтрицательные палочки с закругленными концами, расположенные беспорядочно. Капсул не имеют, спор не образуют. Имеют пили или фимбрии 1-го типа (отвечают за прикрепление к эпителиоцитам) и 2-го типа (участвуют в конъюгации).

5. Питательные среды и культуральные свойства

Не требовательны к питательным средам, чаще используют дифференциально-диагностические среды (Эндо, Левина, Плоскирева). На твердых средах чаще образуют гладкие (S-) или шероховатые (R-) колонии. S-колонии круглые, куполообразные, гладкие, полупрозрачные в проходящем свете. R-колонии неправильной формы, плоские, тусклые, с шероховатой поверхностью и неровными краями. В жидких средах S-формы дают равномерное помутнение, R-формы — придонный осадок, среда остаётся прозрачной.

Среда Плоскирева — дифференциально-диагностическая среда, используемая для первичного посева материала от больных дизентерией. Шигеллы образуют прозрачные бесцветные колонии, т.к. не разлагают лактозу.

6. Антигенная структура

Определение антигенной структуры проводят для окончательной идентификации бактерий. У шигелл имеются О-и К-антигены. О-антигены имеют эпитопы различной специфичности — от общих для семейства энтеробактерий до типоспецифических. В классификации учитывают только термостабильные групповые (четыре группы или вида — А, В, С и Д) и типоспецифические (деление на серотипы). К термолабильным антигенам относятся К-антигены (они имеются в группах А и С). Термолабильные Аг (включающие К-Аг, сходный с К-Аг эшерихий) обнаружены у всех шигелл (за исключением бактерий Флекснера и Зонне). Они способны маскировать О-Аг и тем самым блокировать агглютинацию бактерий О-антисыворотками (действие снимают кипячением в течение 1 ч). Термостабильные О-Аг разделяют на типовые и групповые. Соответственно шигеллы разделяют на подгруппы (виды). Серовары и подсеровары обозначают арабскими цифрами (к последним добавляют прописные латинские буквы); серовар-специфичные (типовые) Аг обозначают римскими (I–VI), групповые — арабскими цифрами. Например: S.flexneri, серовар 1-III.

7. Биохимические свойства

Шигеллы по сравнению с другими кишечными бактериями биохимически малоактивны. Не образуют сероводород, образуют индол, не ферментируют мочевины. Ферментируют глюкозу без газообразования. Шигеллы Зонне способны медленно в течение 48 часов ферментировать лактозу.

8. Факторы патогенности

Главная биологическая характеристика шигелл — способность внедряться в эпителиальные клетки, размножаться в них и вызывать их гибель. У шигелл имеются ряд факторов, определяющих их взаимодействие со слизистой оболочкой кишечника. Это ферменты гиалуронидаза, муциназа, нейраминидаза, повышающие проницаемость и способствующие достижению бактериями поверхности эпителиального слоя стенки кишки.

Шигеллы обладают факторами адгезии и колонизации. Их функцию выполняют фимбрии, белки наружной мембраны, ЛПС, с помощью которых шигеллы прикрепляются к гликокаликсу микроворсинок эпителия, где и происходит колонизация.

Шигеллы имеют *факторы инвазии*, представленные белками наружной мембраны, и контролируемые генами инвазивных плазмид. Инвазины способствуют проникновению шигелл внутрь клеток. Кроме того, у шигелл обнаружен фактор межклеточного распространения, обладающий гемолитическими свойствами. Это белок наружной мембраны, который обеспечивает переход шигелл из одной клетки в другую, вызывая лизис межклеточных мембран.

Все виды шигелл обладают эндотоксином, вызывающим общую интоксикации. У шигелл имеются термолабильные экзотоксины: Шига-токсин проявляет одновременно цитотоксические, нейротоксические и энтеротоксические свойства, обладая тропизмом как к

нервной системе, так и к слизистой толстого кишечника. Кроме того, Шига-токсин может вызывать гемолитический уремический синдром с развитием почечной недостаточности. Долгое время считалось, что экзотоксином обладает только *S. dysenteriae* серовар I (бактерии Григорьева-Шига), но оказалось, что способностью к продукции Шига-токсина обладают и другие серовары *S. dysenteriae*, а также остальные виды шигелл.

Шига-токсин имеет типичную АВ-структуру и состоит из субъединицы А и 5 субъединиц В. В-пентамер присоединяется к колоноцитам через специфические гликолипидные рецепторы и способствует проникновению субъединицы А внутрь клетки, где она распадается на А1 и А2. Субъединица А1 приводит к прекращению синтеза белка на уровне 60S субъединицы рибосомы, последующим цитопатическим изменениям и возможной гибели клетки.

Шигаподобный токсин несколько отличается по антигенным свойствам, имея с Шига-токсином 50-60% гомологии. Этот токсин вызывает нарушение синтеза белка, всасывания ионов натрия и воды, приток жидкости в очаг воспаления. Шигаподобный токсин образуют не только шигеллы, но и некоторые сальмонеллы и диареогенные эшерихии.

9. Патогенез

Взаимодействие шигелл со слизистой оболочкой кишечника начинается с адгезии и колонизации пристеночного слоя. Бактерии прикрепляются к рецепторам, имеющимся у эпителиоцитов толстой кишки, что вызывает уплотнение нитей актина и накопление миозина вокруг участка прикрепления. Формируются псевдоподии, происходит захват бактерий и они оказываются внутри фагосомы. Затем стенка фагосомы лизируется и шигеллы поступают в цитоплазму, где интенсивно размножаются. Они не обладают подвижностью, но во время размножения на конце бактерии образуется «хвост» из нитей актина, выполняющий роль пропеллера, который помогает бактериям переходить в соседние клетки. Мембраны этих клеток были предварительно лизированы, синтезированным в это же время фактором межклеточного распространения гемолизином. Такой процесс многократно повторяется, сопровождается гибелью колоноцитов и способствует распространению шигелл в ткани, развитию воспалительного процесса с изъязвлением эпителия. Воспаление усугубляется действием вырабатываемого шигеллами экзотоксина, обладающего цитотоксическими, нейротоксическими и энтеротоксическими свойствами. Его действие приводит к местной гиперсекреции жидкости и развитию диареи, блокирует синтез белка как в колоноцитах толстой кишки, так и в нервных клетках, что приводит к их цитопатическим изменениям. Важную роль в патогенезе дизентерии играет эндотоксин, вызывающий лихорадочное состояние, поражение сердечно-сосудистой системы, нервной системы, надпочечников, органов пищеварения. При дизентерийной инфекции часто развивается дисбактериоз, что отягощает ее течение.

Дизентерия антропонозная инфекция с фекально-оральным механизмом передачи. Заражение происходит от больных людей, чаще если у них легкая форма болезни или хроническая дизентерия, а также от бактерионосителей. Заболевание распространяется через грязные руки, загрязненные предметы, инфицированные продукты и воду. Это широко распространенное заболевание, болеют люди всех возрастов, но чаще дети первых лет жизни (1-2 года). Наиболее типичные признаки дизентерии — понос, *тенезмы* (болезненные спазмы прямой кишки) и частые позывы, общая интоксикация. Характер стула определяется степенью поражения толстого кишечника.

Инкубационный период от 1 до 7 дней. Начало острое. Клиника: повышение температуры до 38–39°C, слабость, головная боль, тошнота, рвота, снижение артериального давления; синдром интоксикации более выражен при колитических формах дизентерии. Стул частый (от 5 до 20 раз в сутки), при тяжелом течении — "без счета". Колитический вариант острой дизентерии характеризуется скудным стулом с примесью слизи и прожилками крови, иногда по типу "ректального плевка" — слизь с прожилками крови без каловых масс, а при наличии энтерита обильный; патологические примеси в стуле: слизь и прожилки крови (при катаральном проктосигмоидите крови в стуле нет). Боли в животе локализуются по ходу толстого кишечника, но чаще в области спазмированной сигмовидной кишки, носят спастический характер. При дизентерийном колите характерно наличие ложных позывов на дефекацию, тенезмов (болезненных сокращений ануса после акта дефекации). Синдром дегидратации развивается при

гастроэнтероколитическом и гастроэнтеритическом вариантах. Выраженной дегидратации не наступает. *Осложнения* встречаются преимущественно при тяжелом течении шигеллеза Флекснера в виде инфекционно-токсического шока, кишечного кровотечения, кишечной непроходимости. У абсолютного большинства больных развиваются нарушения микробной экологии кишечника (дисбактериозы).

10. Иммунитет

После заболевания отмечается развитие местного иммунитета — усиливается синтез лимфоидными клетками слизистой оболочки кишечника SIgA, которые покрывают слизистую оболочку и препятствуют адгезии и проникновению шигелл в эпителиальные клетки. АТ к Аг возбудителя возникают в 1-ю неделю заболевания, достигая максимального титра на 2-й неделе. Но напряженный иммунитет они не формируют. Иммунитет типоспецифический, нестойкий.

11. Методы лабораторной диагностики

Основной метод диагностики — бактериологический; применяют также серологический и молекулярно-генетический методы, аллергическую пробу.

Бактериологическое исследование. Исследуемый материал — испражнения, которые берут из судна, отбирая пробы, содержащие слизь и гной, в стерильную пробирку. Нередко материал берут непосредственно из верхнего отдела прямой кишки с помощью тампона, проволочной петли и ректальной трубки. Бактериологическое исследование необходимо проводить в кратчайший срок после взятия материала («у постели больного»), т.к. шигеллы в испражнениях быстро погибают. Обычно материал помещают в консервирующую смесь, содержащую физиологический раствор NaCl с глицерином, или в транспортную среду — селенитовую среду обогащения или среду с желчью (табл. 14). В результате срок исследования продлевается до 24 часов при условии хранения проб в холодильнике.

Таблица 14. Схема бактериологического исследования дизентерии

Этапы исследования	Ход исследования	Результат
Предварительный этап	Посев исследуемого материала на жидкую селенитовую среду	Среда помутнела
1-й	Посев исследуемого материала или пересев с селенитовой среды на чашки со средой Левина или Плоскирева для получения изолированных колоний	На среде выросли различные колонии, в том числе лактозонегативные
2-й	Пересев лактозонегативных колоний на комбинированную среду Клиглера или Ресселя уколом в столбик или штрихом по скошенной поверхности. Часть колоний засевают в Ари 20 Е тест-систему	Столбиковая часть комбинированной среды закислилась, скошенная поверхность имеет нейтральный или щелочной рН
3-й	Идентификация чистой культуры на основании изучения: 1. морфологии — окраска по Граму и препарат «раздавленная капля» 2. учет результатов биохимического тестирования 3. Серологическая идентификация: РА на стекле с поливалентными дизентерийными сыворотками Чувствительность к АБ методом бумажных дисков	1. культура неподвижна, в окрашенном препарате в поле зрения — небольшие грам-палочки с закругленными концами, расположенные беспорядочно 2. Биохимическая характеристика соответствует роду 3. При положительной реакции агглютинации культура относится к определенному роду и виду шигелл Учет чувствительности к АБ
4-й	Учет результатов идентификации по проведенному исследованию	Заключение: из исследуемого материала выделена культура чувствительная к таким-то АБ

Серологический метод. Его проводят с целью выявления антител в сыворотке больного при затянувшихся, хронических формах заболевания, а также для ретроспективной диагностики. Антитела можно выявить с помощью РНГА (реакция непрямой гемагглютинации) или развернутой реакции агглютинации («дизентерийный Видаль»). В последнее время рекомендуется в качестве основной серологической реакции использовать РСК (реакция связывания комплемента), ее используют также и для обнаружения антигенов.

Антигены шигелл определяют в испражнениях или исследуя колонии, выросшие на чашках с дифференциально-диагностическими средами, в реакциях: иммунофлюоресценции, непрямой гемагглютинации, иммуноферментного анализа, а также для экспресс-метода диагностики используют КОА (коаггутинация). Антигены *S. sonnei* обнаруживают в пищевых продуктах и в объектах внешней среды, используя «Шигелла-тест» — диагностическую систему для постановки ИФА.

В трудных для диагностики случаях заболевания иногда применяют молекулярно-генетические методы исследования: ПЦР или генное зондирование.

В качестве дополнительного экспресс-метода диагностики у детей, особенно при стертых и субклинических формах дизентерии, может быть использована внутрикожная аллергическая проба с дизентерином.

12. Лечение и профилактика

Важное значение имеют общие санитарно-гигиенические мероприятия: контроль за источниками водоснабжения, системой общественного питания, производством молока, мяса, магазинами, рынками и т.п. Для специфической профилактики в стадии разработки находится химическая дизентерийная вакцина. В эпидемических очагах можно применять специфический бактериофаг. Лечение проводят антибиотиками широкого спектра действия — тетрациклины и левомицетин при обязательном определении чувствительности, так как распространены антибиотикорезистентные и антибиотикозависимые штаммы. Высокоэффективны химиопрепараты — сульфаниламиды (сульгин, фталазол) и фторхинолоны (ципрофлоксацин, норфлоксацин, ломефлоксацин). Также в большинстве случаев необходимы симптоматическая терапия, восполнение потерь жидкости и электролитов.

Сальмонеллы — возбудители брюшного тифа, паратифа А и паратифа В

1. Таксономия и классификация

Несмотря на значительные различия сальмонелл по антигенным характеристикам, биохимическим свойствам, вызываемым ими заболеваниями, по современной, но недостаточно удобной и совершенной классификации выделяют два вида — *S. bongori* и *S. enteritica*. Последний разделен на подвиды, из которых наибольшее значение имеют подвиды *choleraesuis* и *salamae*. Подвид *choleraesuis* включает наибольшую часть известных сероваров сальмонелл (около 1400 из примерно 2400). Для удобства изложения будет использована не совсем корректная, но исторически сложившаяся таксономия бактерий, рассматривающая серовары как виды (например, *S. typhi* вместо *Salmonella enterica* подвид *choleraesuis* серовар *typhi*). Брюшной тиф, паратиф А и паратиф В антропонозные ОКИ вызываемые соответственно *S. typhi*, *S. paratyphi A* и *S. paratyphi B (S. schottmuelleri)*.

2. Нозологические формы

Сальмонеллы — большая группа энтеробактерий, среди которых различные серотипы — возбудители брюшного тифа, паратифов А, В и С и наиболее распространенных пищевых токсикоинфекций — сальмонеллезов. По признаку патогенности для человека сальмонеллы разделяют на патогенные для человека-антропонозы (вызывают брюшной тиф и паратифы А и В) и патогенные для человека и животных — зоонозы (вызывают сальмонеллезы).

3. Эпидемиология и пути передачи

Характерно повсеместное распространение. Основные резервуары сальмонелл — человек (возбудители брюшного тифа и паратифа А) или бактерионосители и различные животные (остальные серотипы сальмонелл). Основные возбудители отличаются полипатогенностью. Основные источники заражения — мясные и молочные продукты, яйца, птице-и рыбопродукты. Механизм передачи возбудителя — фекально-оральный. Основные

пути передачи — пищевой и водный, реже — контактный. Характерна чрезвычайная множественность резервуаров и возможных источников инфекции. Основное значение имеют сельскохозяйственные животные и птицы.

Сальмонеллы долго сохраняют жизнеспособность во внешней среде: в воде открытых водоёмов и питьевой воде живут 11–120 сут, в морской воде — 15–27 сут, в почве — 1–9 мес, в комнатной пыли — 80–547 сут, в колбасных изделиях — 60–130 сут, в замороженном мясе — 6–13 мес, в яйцах — до 13 мес, в яичном порошке — до 9 мес, на замороженных овощах и фруктах — 0,5–2,5 мес. Наиболее устойчива *S. typhimurium*, остающаяся жизнеспособной на тканях и на бумаге до 1 года. Кипячение убивает сальмонелл мгновенно, но присутствие в воде белковых веществ увеличивает термоустойчивость сальмонелл. При замораживании они могут оставаться жизнеспособными длительное время. Осветлённый 0,3% раствор хлорной извести при 30-минутной экспозиции убивает сальмонеллы через 1 ч. Хлорирование сточных вод снижает их загрязнённость сальмонеллами в 6 раз.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Подвижны благодаря наличию перитрихально расположенных жгутиков. Род *Salmonella* представлен мелкими бактериями вытянутой формы с закруглёнными концами. Это прямые грамотрицательные палочки размером 2–4 x 0,5 мкм. Капсул бактерии не имеют. Большинство изолятов подвижно (перитрихи), но существуют неподвижные мутанты и серовары.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Сальмонеллы хемоорганотрофы, температурный оптимум составляет 35–37 °С, оптимум pH — 7,2–7,4. Факультативные анаэробы, хорошо растут на простых питательных средах. Рост сальмонелл подавляют или ограничивают высокие концентрации хлорида натрия и сахара. На питательных средах сальмонеллы образуют типичные для большинства энтеробактерий мелкие (2–4 мм) прозрачные S-колонии. Также они формируют шероховатые и сухие R-колонии. Для выделения используют дифференциально — диагностические среды (висмут — сульфит агар, среды Эндо, Плоскирева, SS агар) и среды обогащения (селенитовый бульон, желчный бульон, среда Раппопорта). На агаре Эндо образуют мелкие (от 1 до 4 мм) S-колонии розоватые и прозрачные, на агаре Плоскирева — бесцветные и выглядят более плотными и мутноватыми, на висмут-сульфитном агаре — чёрно-коричневые, с металлическим блеском, окружены чёрным ободком, среда под колониями окрашивается в чёрный цвет. Исключение составляют *S. paratyphi A*, *S. choleraesuis* и некоторые другие, образующие на висмут-сульфитном агаре коричнево-зеленоватые колонии. На бульоне S-формы дают равномерное помутнение среды; R-формы — осадок.

6. Антигенная структура

Антигенная структура сальмонелл и принципы их классификации — схема Кауфмана-Уайта. Для бактерий рода *Salmonella* характерно наличие следующих антигенов: O-антигена, называемого соматическим, H-антигена (жгутикового) и K-антигена (оболочечного).

O-антиген термостабилен, расположен в клеточной стенке, по своей природе является полисахаридно-белково-липидным комплексом. Антигенная специфичность O-антигена связана с полисахаридом, который неоднороден и у сальмонелл одного вида состоит из нескольких антигенных рецепторов. Антигенные рецепторы обозначаются цифрами 1,2,3,4...и т.д.

Оболочечные *K-антигены* термолabileны, находятся в клеточной стенке более поверхностно, чем O-антиген. У сальмонелл обнаружены относящиеся к K-антигенам Vi-Ag (антигены вирулентности). Благодаря более поверхностному расположению (чем O-антигены) Vi-антиген может препятствовать агглютинации культур сальмонелл O-специфической сывороткой (экранирование).

H-антиген термолabileн, по химической природе является белком (флагеллин), располагается в жгутиках. У бактерий одного и того же вида H-антиген может состоять из двух антигенных комплексов, отличающихся по серологической специфичности. Такие бактерии называются двухфазными и могут существовать в двух фазах, для каждой из которых характерно наличие соответствующих антигенных комплексов. Антигены 1-й фазы (или

специфической), как правило, обозначаются малыми буквами латинского алфавита: a, b, c, d ... и т.д., а антигены 2-й фазы (неспецифической) цифрами: 1, 2, 3, 4 ... и т.д.

Кауфман и Уайт на основе антигенной структуры разделили всех представителей рода *Salmonella* на серологические группы, составленные по признаку общности О-антигенов. Каждая группа характеризуется наличием определенного антигенного рецептора, который отсутствует у представителей других групп. В соответствии со структурой О-антигенов сальмонеллы подразделяют на *О-группы* (67 серогрупп), в каждую из которых входят *серологические типы*, отличающиеся строением Н-антигенов. Принадлежность сальмонелл к определенному серовару устанавливают при изучении антигенной структуры в соответствии со схемой Кауфманна — Уайта. Примеры: серотип *S.paratyphi A* относится к серогруппе А, *S.paratyphi B* — к серогруппе В, *S.paratyphi C* — к группе С, *S.typhi* — к серогруппе D.

7. Биохимические свойства

Метаболизм — окислительный и бродильный. Сальмонеллы ферментируют глюкозу и другие углеводы с образованием кислоты и газа (серотип *Salmonella typhi* газообразования не вызывает). Обычно не ферментируют лактозу (на средах с этим углеводом — безцветные колонии), сахарозу. Оксидаза — отрицательны, каталаза — положительны. Реакция Фогеса — Проскауэра отрицательна.

Характерные признаки сальмонелл — образование сероводорода, отсутствие продукции индола и аэробность (табл. 15).

Таблица 15. Биохимические свойства тифозных и паратифозных бактерий

Виды возбудителей						Образование	
	Лактоза	Глюкоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза	индола	H ₂ S
<i>S.typhi</i>	-	к	к	к	-	-	+
Другие сальмонеллы	-	кг	кг	кг	-	-	+

8. Факторы патогенности

1. Факторы адгезии и колонизации. Адгезию к клеткам эпителия обеспечивают пили 1-го (манноза-чувствительные), 3-го (агглютинируют эритроциты, обработанные таннином) и 4-го типов. В отличие от шигелл, сальмонеллы не могут самостоятельно проникать в эпителиальные клетки ЖКТ, а попадают в них посредством эндоцитоза.

2. Способность к внутриклеточному паразитированию, препятствовать фагоцитозу, размножаться в клетках лимфоидной ткани выражены у возбудителей брюшного тифа, паратифов А и В, способствуя хроническому носительству.

3. Эндотоксин (ЛПС), освобождающийся при разрушении бактерий.

4. Термолабильные и термостабильные энтеротоксины.

Термолабильный LT-токсин, сходный с энтеротоксином эшерихий и холерогеном возбудителя холеры, увеличивает содержание цАМФ.

Термостабильный ST-токсин напоминает цитотоксин шигелл и нарушает синтез белков и активирует образование простагландинов.

5. Цитотоксины.

6. Существенное значение имеют плазмиды вирулентности и R-плазмиды.

7. Vi-антиген ингибирует действие сывороточных и фагоцитарных бактериоцидных факторов. Это высокомолекулярный полимер, который состоит из соединенных между собой остатков N-ацетилгалактозаминуриновой кислоты. С наличием Vi-антигена связывают повышенную вирулентность брюшнотифозных бактерий. Содержащие Vi-антиген культуры *S.typhi* (обычно это штаммы, свежeweыделенные от больных) называются V-формой, не имеющие его — W-формой. Культуры в V-форме агглютинируются анти-Vi-сывороткой и не агглютинируются анти-O-сывороткой, так как O-антиген "маскирован" более поверхностно расположенным Vi-антигеном. После прогревания бактерий при 100°C в течение 30 минут O-агглютинабельность восстанавливается вследствие разрушения Vi-антигена. Этот антиген является рецептором для брюшнотифозных Vi-фагов, на чем основано фаготипирование *S.typhi*.

Основными факторами патогенности сальмонелл является их способность проникать в макрофаги и размножаться в лимфоидных образованиях собственно слизистого слоя тонкого кишечника (пейеровы бляшки, солитарные фолликулы), а также продукция эндотоксина.

У возбудителей брюшного тифа и паратифов обнаружены *факторы адгезии и колонизации*. У них имеются *факторы инвазии*. Важной особенностью возбудителей является *способность размножаться в макрофагах*, что способствует их выживанию и распространению по всему организму.

9. Патогенез

Различия клинических форм заболеваний, вызываемых сальмонеллами, зависит от вирулентности и дозы возбудителя и состояния иммунной системы организма. Обычная доза, вызывающая клинические проявления — $10^6 - 10^9$ бактерий, меньшая доза достаточна при иммунодефицитах, гипохлоридрии и других заболеваниях желудочно-кишечного тракта.

Выделяют следующие основные формы сальмонеллезной инфекции: гастроинтестинальную, генерализованную (тифоподобный и септикопиемический варианты), бактерионосительство (острое, хроническое, транзиторное).

Существенные патогенетические особенности инфекционного процесса, вызываемого серотипами *S.typhi*, *S.paratyphi A,B*, являются основанием для выделения тифо-паратифозных заболеваний в самостоятельную нозологическую группу. Каждой фазе патогенеза соответствует клинический период заболевания и своя тактика лабораторного обследования. Основные фазы — внедрения возбудителя (соответствует инкубационному периоду), первичной локализации возбудителя (продромальный период), бактеремии (первая неделя заболевания), вторичной локализации сальмонелл (разгар заболевания — 2-3 недели), выделительно-аллергическая (реконвалесценция — 4 неделя заболевания).

Проникшие через рот сальмонеллы попадают в эпителиальные клетки двенадцатиперстной и тонкой кишки посредством эндоцитоза. Они легко проникают в эпителиальные клетки, но не размножаются здесь, а проходят и размножаются в лимфатическом аппарате тонкого кишечника. Сальмонеллы размножаются преимущественно в *lamina propria* (первичная локализация), что сопровождается местной воспалительной реакцией слизистой оболочки, притоком жидкости в очаг поражения и развитием диарейного синдрома (гастроэнтерит). Энтеротоксины повышают уровень циклического аденомонофосфата (цАМФ), происходит повышение уровня гистамина и других биологически активных веществ, проницаемости сосудов. Наблюдаются водно-электролитные нарушения, развиваются гипоксия и ацидоз, которые усугубляют патологический процесс с преобладанием сосудистых расстройств. Происходит разрушение части сальмонелл с выделением эндотоксина, сенсбилизация (ГЗТ) лимфатического аппарата тонкого кишечника.

Из слизистой оболочки сальмонеллы могут попадать в лимфу и далее в кровоток, вызывая бактеремию. В большинстве случаев она носит транзиторный характер, т.к. сальмонеллы элиминируются фагоцитами.

В отличие от других сальмонелл, возбудители брюшного тифа и паратифов, проникнув в кровоток, способны выживать и размножаться в фагоцитах. Они могут размножаться в мезентериальных лимфоузлах, печени и селезенке и вызывать генерализацию процесса. После гибели фагоцитов сальмонеллы вновь поступают в кровь. При этом Vi-антиген ингибирует бактерицидные факторы.

При гибели сальмонелл освобождается эндотоксин, угнетающий деятельность центральной нервной системы (тиф — от греч. *typhos* — туман, спутанное сознание) и вызывающий длительную лихорадку. Действие эндотоксина может вызвать миокардит, миокардиодистрофию, инфекционно — токсический шок.

В результате бактеремии происходит генерализованное инфицирование желчного пузыря, почек, печени, костного мозга, твердых мозговых оболочек (вторичная локализация

сальмонелл). Происходит вторичная инвазия эпителия кишечника, особенно пейеровых бляшек. В сенсibilизированной сальмонеллами стенке развивается аллергическое воспаление с образованием основного грозного осложнения — брюшнотифозных язв. Наблюдается длительное носительство сальмонелл в желчном пузыре с выделением возбудителя с испражнениями, пиелонефриты, кровотечения и перфорации кишечника при поражении пейеровых бляшек. Затем происходит формирование постинфекционного иммунитета, элиминация возбудителя и заживление язв или формирование бактерионосительства.

Таким образом, в течение 1-ой недели заболевания у всех больных имеется бактериемия, которая при дальнейшем течении болезни постепенно прекращается. Часть возбудителей с кровью заносится в паренхиматозные органы, и в костный мозг, где продолжается их размножение в макрофагах, а также гибель, при которой высвобождаются новые порции эндотоксина. С конца 1-ой — начала 2-ой недели заболевания возникают защитные реакции: образуются специфические антитела, активизируется фагоцитоз, однако преобладают проявления гуморального иммунитета. Организм больного в значительной степени освобождается от возбудителей, уменьшается интоксикация, но нарастает воспалительный процесс в лимфатическом аппарате тонкого кишечника. Этому способствует вторичный занос в просвет тонкого кишечника из желчного пузыря и инвазия возбудителей в лимфатические элементы. В желчном пузыре бактерии находятся в благоприятных условиях и защищены от воздействия антител, что способствует их длительному сохранению. Начиная с конца 2-ой — начала 3-ей недели возбудители вместе с некротическими массами поступают в просвет тонкой кишки и выделяются с испражнениями обычно вплоть до клинического выздоровления. Иногда бактериовыделение затягивается и может перейти в хроническое бактерионосительство (у 3-5% переболевших).

10. Иммунитет

Иммунитет после перенесенного заболевания напряженный и длительный. Вырабатываются иммуноглобулины, обладающие протективными свойствами. Они активируют фагоцитарную реакцию организма, способствуют лизису бактерий. Титр АТ начинает возрастать со 2 недели — используется в серодиагностике. Протективный иммунный ответ обеспечивается синергичным действием клеточного иммунного ответа, в котором ведущая роль принадлежит активированным макрофагам.

Гуморальный иммунитет самостоятельно не обладает протективной активностью, а является свидетелем инфекционного процесса. Причем первыми к концу 1-й недели заболевания появляются антитела к О-антигену, которые максимальных титров достигают к разгару заболевания, а затем исчезают. Антитела к Н-антигену появляются в период реконвалесценции и у привитых лиц и длительно сохраняются. У бактерионосителей брюшного тифа обнаруживаются антитела к Vi-антигену. Возникновение бактерионосительства связано с функциональной недостаточностью макрофагов.

11. Методы лабораторной диагностики

На основании знания патогенеза брюшного тифа и паратифов проводят лабораторное исследование: на 1-й неделе заболевания выделяют гемокультуру, а начиная с 3-й недели — копрокультуру. Серологическое исследование с целью обнаружения специфических антител в сыворотке больного проводят, начиная со 2-й недели заболевания с помощью различных серологических реакций.

Таким образом, основными методами лабораторной диагностики являются бактериологический и серологический.

Основной метод — бактериологический. Исходя из патогенеза оптимальным сроком бактериологических исследований при гастроинтестинальных формах являются первые дни, при генерализованных формах — конец второй — начало третьей недели заболевания. При исследовании различных материалов (испражнения, кровь, моча, желчь, рвотные массы, пищевые остатки) наибольшая частота положительных результатов отмечается при исследовании испражнений, для возбудителя брюшного тифа и паратифов — крови (гемокультура).

Бактериологическую диагностику проводят поэтапно, как указано в таблице 16.

На 1-й неделе заболевания исследуют кровь с целью выделения возбудителя. Гемокультуру выделяют в 100% случаев заболевания. Примерно у 40% заболевших удается выделить гемокультуру и на 2-й неделе заболевания при условии посева 15-20 мл крови. Кровь берут из локтевой вены в объеме 10 мл и засевают в колбу со 100 мл жидкой питательной среды (среды обогащения для "чистого" материала — среда Раппопорт или желчный бульон). Следует соблюдать соотношение крови и питательной среды не менее 1:10, чтобы не проявилось бактерицидное действие крови. Далее делают высеv со среды обогащения на чашку со средой Эндо, где в положительном случае вырастают лактозонегативные (лак-) колонии — бесцветные или бледно-розовые полупрозрачные колонии. Колонии засевают в комбинированные дифференциально-диагностические среды (Клиглера, Ресселя и др.). Выделенную лактозонегативную культуру идентифицируют на основании изучения биохимических и антигенных свойств. Биохимическое тестирование проводят на различных дифференциально-диагностических средах или более совершенными методами — в системе API 20 E, с помощью энтеротестов, Enterotube и др. Для идентификации культур в РА используют поливалентные и моновалентные O-, H- и Vi-антисыворотки. Сначала используют поливалентные адсорбированные O- и H-сыворотки, а затем при положительном результате — соответствующие моновалентные O- и H-сыворотки. Для идентификации возбудителей брюшного тифа и паратифов используют антитела к антигену O2 (*S.paratyphi A*), O4 (*S.paratyphi B*), O9 (*S.typhi*). Если культура не агглютинируется O-сывороткой, ее нужно исследовать с Vi-сывороткой. Для быстрого выявления сальмонелл используют поливалентные люминесцентные сыворотки.

С 3-й недели заболевания (нередко с конца 2-й) проводят повторные высеvы возбудителя из испражнений. Со 2-й недели заболевания возможно выделить возбудителя также из мочи, желчи, соскоба из розеол, костного мозга, но, практически, это делают редко. Бактериологическое исследование испражнений несколько отличается от исследования крови, поскольку этот материал содержит постороннюю микрофлору. Пробу испражнений разводят в десять раз физиологическим раствором NaCl и далее надосадочную жидкость в соотношении 1:5 засевают на среды обогащения (среды, предназначенные для посева загрязненных материалов — селенитовый бульон или среду Мюллера). Затем делают пересев на чашки со средами Эндо, Плоскирева или висмут-сульфит агаром. На двух последних значительно подавляется рост посторонней микрофлоры, что способствует выделению возбудителя.

Как правило, одновременно с посевом на среды обогащения, пробу испражнений засевают непосредственно на чашки со средами Плоскирева или висмут-сульфит агара. Если на них вырастают колонии возбудителя, срок бактериологического диагноза становится на сутки короче. Выросшие подозрительные колонии — лактозонегативные на средах Эндо и Плоскирева и черные или коричневые на висмут-сульфит агаре — отсевают на комбинированные среды Клиглера, Ресселя и др., т.е. дальнейшее выделение чистой культуры возбудителя и его идентификация проводится так же, как и при исследовании крови.

Таблица 16. Бактериологическое исследование крови больного при брюшном тифе, паратифе А и паратифе В на 1-й неделе заболевания (выделение гемокультуры)

Этап исследования	Ход исследования	Результат
Предварительный этап	Посев крови больного в колбу со средой Раппопорт	Среда Раппопорт помутнела, покраснела
1-й день	Высев со среды Раппопорт на чашки со средой Эндо для получения изолированных колоний	На среде Эндо выросли изолированные бесцветные колонии — лактозонегативные
2-й день	Пересев лак-колонии на комбинированную среду Ресселя или Клиглера — уколом в столбик, штрихом по скошенной поверхности среды Часть колонии засевают на тест-систему API 20 E (приготовив предварительно суспензию)	Столбиковая часть комбинированной среды окислилась, скошенная поверхность имеет нейтральный или щелочной pH. В столбике могут

		быть пузырьки газа. При образовании H ₂ S среда Клиггера чернеет.
3-й день	Идентификация выделенной чистой культуры: 1. Изучение морфологических свойств в мазке, окрашенном по Граму; 2. Учет результатов биохимического тестирования; 3. Серологическая идентификация: -Реакция агглютинации на стекле с поливалентной сальмонеллезной О-сывороткой (рецепторы 2,4,9); -Реакция агглютинации на стекле с монорецепторными О-сыворотками (сыворотки О-2, О-4, О-9) для определения серогруппы; -Реакция агглютинации на стекле с монорецепторными Н-сыворотками для определения вида (серовара). -Постановка опыта фаготипирования -проверка чувствительности культуры к антибиотикам методом бумажных дисков.	1. В поле зрения — беспорядочно расположенные небольшие грамтрицательные палочки с закругленным концом; 2. Биохимическая характеристика выделенной культуры соответствует.... А. При положительной реакции — культура относится к роду <i>Salmonella</i> (серогруппе А, В или D); Б. При положительной реакции с О-сывороткой — культура относится к ... серогруппе В. При положительной реакции с Н-сывороткой культура относится к виду... 4. Культура относится к фаготипу 5. Учет чувствительности к антибиотикам
4-й день	Учет результатов идентификации и заключение по проведенному исследованию.	Заключение: из крови больного выделена культура..... типичная по свойствам и чувствительная к антибиотикам

Серологические исследования проводят для диагностики, а также выявления и дифференциации различных форм носительства. Применяют РА (реакцию Видаля) с О- и Н-диагностикумами и РПГА с применением поливалентных эритроцитарных диагностикумов, содержащих полисахаридные антигены серогрупп А, В, С, Д и Е и Vi-антиген.

Серологическая идентификация сальмонелл проводится в реакции агглютинации на стекле с агглютинирующими адсорбированными сальмонеллезными О- и Н-сыворотками. Такие сыворотки получают методом адсорбции антител по Кастеллани из видовых иммунных сывороток (путем насыщения сыворотки родственными бактериями, на которых адсорбируются группоспецифические антитела). Агглютинирующие адсорбированные сальмонеллезные сыворотки могут быть поливалентными и монорецепторными, т.е. содержать несколько различных антител (рецепторов) или только один.

Последовательность серологической идентификации выделенной культуры:

Для установления принадлежности культуры к роду *Salmonella*, а именно к наиболее распространенным серогруппам — А, В, С, D, Е — культуру испытывают в реакции агглютинации с адсорбированной поливалентной О-сывороткой, содержащей антитела против антигенных рецепторов 2, 4, 7, 9, 3, 10. При необходимости используют монорецепторные О-сыворотки против редких серогрупп. При диагностике брюшного тифа, паратифа А и паратифа В можно использовать смесь О-сывороток, содержащих антитела к рецепторам 2, 4, 9.

При положительном результате для определения принадлежности испытуемой культуры к определенной серологической группе ставят реакцию агглютинации отдельно с каждой монорецепторной О-сывороткой, входившей в состав поливалентной: рецептор 2 (серогруппа А), рецептор 4 (серогруппа В), рецептор 7 (серогруппа С), рецептор 9 (серогруппа D) и т.д.

После установления серогруппы, к которой относится культура, определяют ее видовую принадлежность (серовариант) с помощью реакции агглютинации с адсорбированными

монорецепторными Н-сыворотками против Н-антигенов 1 - и фазы сальмонелл, входящих в состав данной серогруппы. Далее проводят реакцию агглютинации с адсорбированными Н-сыворотками против Н-антигенов 2-й фазы и окончательно устанавливают антигенную формулу испытуемой культуры.

12. Лечение и профилактика

Специфическая профилактика может применяться преимущественно в отношении брюшного тифа. Применяют химическую сорбированную брюшнотифозную моновакцину. Вакцинацию в настоящее время применяют преимущественно по эпидемическим показаниям. Плановые прививки (независимо от эпидемической обстановки в населенном пункте) проводят: переселенцам, приезжающим в район, неблагополучный по тифопаратифозным заболеваниям; рабочем новостроек; лицам, выезжающим на сезонные работы; работникам канализации и предприятий по очистке; медицинским работникам инфекционных больниц и бактериологических лабораторий; лицам в окружении хронических носителей возбудителей брюшного тифа.

Химическая сорбированная тифо-паратифозно-столбнячной вакцина ТАВте содержит выделенные из брюшнотифозной, паратифозных Аи В бактерий, антигены и очищенный столбнячный анатоксин, адсорбированные на гидроксид алюминия. Вакцина применяется для профилактики брюшного тифа, паратифов и столбняка лицам в возрасте от 15 до 50 лет, вводят ее строго подкожно.

Также применяют поливалентный брюшнотифозный бактериофаг. Бактериофаг выпускают в жидком виде и в таблетках. Применяют бактериофаг при массовой профилактике заболевания лиц, находящихся в условиях массового риска заражения, а также в очагах для предупреждения повторных случаев болезни. Применяют препарат внутрь через рот.

Неспецифическая профилактика включает: санитарно-бактериологический контроль за системами водоснабжения, соблюдение санитарно-гигиенических правил при приготовлении пищи, выявление бактерионосителей среди работников пищеблоков, торговли, своевременное выявление и изоляцию больных.

Лечение: препарат выбора — левомецетин в течение всего лихорадочного периода и 10 последующих дней нормальной температуры (во избежание рецидива); применяются в случаях резистентности возбудителя к левомецетину, ампицилину — фторхинолоновые производные и др. Так как часто выявляют резистентные к антибиотикам штаммы, то необходимо определять антибиотикорезистентность выделенных культур. Патогенетическая терапия — препараты с целью дезинтоксикации. Симптоматические средства. При осложнениях: противошоковая терапия, гемостатическая терапия, при перфорации кишечника — хирургическое лечение. *Выписка больных* при получении 3-х отрицательных результатов посевов кала, мочи, однократно желчи на *S.typhi* не ранее 21 дня нормальной температуры. В 3-5% случаев формируется хроническое бактерионосительство, базирующееся на внутриклеточной персистенции возбудителя в клетках МФС в виде L-форм. Процесс носит пожизненный характер, протекает в виде двух последовательно сменяющих друг друга стадий — латенции и выделения.

Сальмонеллы — возбудители пищевых токсикоинфекций

Возбудителями сальмонеллезов являются другие серотипы сальмонелл, патогенные для человека и животных (*S.typhimurium*, *S.enteritidis*, *S.heldelberg*, *S.newport* и другие). В основе патогенеза сальмонеллезов — действие самого возбудителя (его взаимодействия с организмом хозяина) и эндотоксина, накапливающегося в пищевых продуктах, инфицированных сальмонеллами. В классическом варианте сальмонеллезная токсикоинфекция — гастроэнтерит. Однако при прорыве лимфатического барьера кишечника могут развиваться генерализованные и внекишечные формы сальмонеллезов (менингит, плеврит, эндокардит, артрит, абсцессы печени и селезенки, пиелонефрит и др.). Увеличение генерализованных и внекишечных форм сальмонеллезов связано с увеличением количества иммунодефицитных состояний, что имеет особое значение при ВИЧ-инфекции.

Отдельную проблему представляют госпитальные штаммы сальмонелл (чаще отдельные фаговары *S.typhimurium*), вызывающие вспышки внутрибольничных инфекций преимущественно среди новорожденных и ослабленных детей. Они передаются преимущественно контактно-бытовым путем от больных детей и бактерионосителей, обладают высокой инвазивной активностью, часто вызывая бактеремию и сепсис. Эпидемические штаммы характеризуются множественной лекарственной устойчивостью (R-плазмиды), высокой резистентностью, в том числе к действию высоких температур.

Сальмонеллезные пищевые токсикоинфекции возникают после употребления пищевых продуктов, обильно обсемененных сальмонеллами (инфицирующая доза должна быть массивной). Заболевание развивается через несколько часов после приема недоброкачественной пищи по типу гастроэнтерита с поносом, рвотой и сопровождается выраженной интоксикацией (иногда очень тяжелой). Заболевание продолжается 3-7 дней. Бактерии выделяются во время заболевания и некоторое время после клинического выздоровления. После перенесенного заболевания может сформироваться бактерионосительство, особенно, если возбудитель попал в печень (желчные протоки, желчный пузырь).

Пищевые токсикоинфекции чаще всего вызываются сальмонеллами, входящими в серогруппы В, С, D, Е. Все они имеют резервуар среди животных и птиц, т.е. эти заболевания являются зооантропонозными. Наиболее распространены следующие возбудители ПТИ:

- *S.typhimurium* (группа В) — источником инфекции могут быть мыши, голуби, домашние птицы и их яйца. Вторично могут быть заражены другие продукты.

- *S.choleraesuis* (группа С) — источник инфекции — свиньи.

- *S.enteritidis* (группа D) — источник инфекции — крупный рогатый скот.

Сальмонеллез характеризуется эпидемиологическими особенностями. Первая особенность — это полипатогенность возбудителей, что обуславливает необычайное множество резервуаров и возможных источников инфекции. К ним относится крупный рогатый скот, телята, поросята, цыплята, утки, гуси, грызуны — красы, мыши. У животных сальмонеллы могут формировать бессимптомную или клинически выраженную инфекцию.

Вторая эпидемиологическая особенность — это множественность путей и факторов передачи. Основным путем заражения при сальмонеллезе является алиментарный, а факторами передачи — различные пищевые продукты животного происхождения (мясо, мясные продукты, яйца, яичные продукты, молоко и молочные продукты). В качестве прямого или опосредованного фактора может служить вода. Люди заражаются от больных животных при уходе за ними.

Третья особенность — изменился характер возникновения эпидемических вспышек сальмонеллеза, возникающих в результате поступления в торговую сеть обсемененных сальмонеллами различных пищевых продуктов, в следствии чего их эпидемиологическая расшифровка затруднена.

Следующая эпидемиологическая особенность-это полиэтиологичность. С каждым годом возрастает число серологических вариантов сальмонелл, выделяемых от людей и животных.

Факторы патогенности.

Сальмонеллы обладают факторами адгезии и колонизации, факторами инвазии. У них имеется эндотоксин с широким спектром действия, многие сальмонеллы обладают энтеротоксинами (LT и /или ST токсины), которые нарушают соответственно функции аденилат-и гуанилатциклазной систем энтероцитов, что приводит к нарушению водно-солевого обмена и развитию диареи. У некоторых сальмонелл обнаружен цитотоксин, нарушающий синтез белка в энтероцитах, что вызывает гиперсекрецию и нарушение энтеросорбции жидкости в тонком кишечнике и, как следствие, развивается диарея.

Патогенез

В патогенезе пищевых токсикоинфекции важное значение имеет попадание с пищей большого количества возбудителей и их эндотоксина. Прикрепившись к эпителию кишечника, сальмонеллы начинают размножаться, проникают в подслизистое пространство и

в лимфатические образования в стенке кишечника, где происходит их дальнейшее размножение и гибель с высвобождением эндотоксина. Массивное накопление эндотоксина (вместе с эндотоксином, попавшим извне) приводит к интоксикации, часто тяжелой с лихорадочным состоянием, нарушениями со стороны нервной и сосудистой систем, вплоть до коллапса и диареи.

При меньшем количестве сальмонелл, попавших в организм с пищей, заболевание может протекать в виде гастроэнтерита с диареей, но без выраженной интоксикации и без подъема температуры.

Переболевшие сальмонеллёзом не приобретают напряжённого иммунитета, возможно длительное бактерионосительство и повторные заболевания. Местный иммунитет характеризуется повышением накопления SIgA. Иммуитет вариантоспецифический.

Сальмонеллезы с генерализацией инфекционного процесса. Это ОКИ с длительным, тяжелым течением по типу тифоидной или токсико-септической инфекции (с развитием вторичных гнойных очагов в различных органах). Такая форма заболевания характерна для детей раннего возраста, но иногда бывает у взрослых людей с ослабленной иммунной системой. Заражение происходит не только через пищевые продукты (достаточно небольшой инфицирующей дозы), но и от бактерионосителей контактно-бытовым путем. Наиболее часто выделяемый возбудитель *S.typhimurium*.

Нередко сальмонеллезы, в том числе и генерализованные, возникают в условиях стационара как внутрибольничные инфекции. Основными возбудителями генерализованной сальмонеллезной инфекции являются госпитальные штаммы *S.typhimurium*, адаптировавшиеся к организму человека. Им присущи все факторы патогенности, характерные для *S.typhimurium*, но как госпитальные штаммы, они отличаются повышенной вирулентностью, длительным сохранением на объектах внешней среды и обладают резистентностью ко многим антибиотикам.

Лабораторный диагноз сальмонеллезных инфекций проводят аналогично микробиологической диагностике брюшного тифа и паратифов А и В.

При пищевых токсикоинфекциях основной способ диагностики — бактериологический, причем параллельно с материалами от больного исследуют и пищевые продукты, послужившие предполагаемой причиной заболевания. При генерализованном сальмонеллезе проводят как бактериологическое (с выделением гемокультуры), так и серологическое исследование.

I. План самостоятельной работы:

1. Изучить и описать культуральные свойства колоний возбудителей дизентерии на средах Эндо и Левина.

На дифференциально-диагностических средах Эндо, Левина и Плоскирева, шигеллы образуют бесцветные (лактозонегативные) прозрачные круглые, слегка выпуклые, гладкие, блестящие колонии с ровными краями. Среда Эндо относится к дифференциально-диагностическим средам. В ее состав кроме питательной основы входят лактоза и индикатор-основной фуксин. Шигеллы образуют прозрачные бесцветные колонии, т.к. не разлагают лактозу.

2. Поставить реакцию агглютинации на стекле с колонией, подозрительной на колонию возбудителя дизентерии с диагностическими дизентерийными сыворотками Зонне и Флекснера.

Постановка: Для постановки реакции нанесите каплю сыворотки, содержащей антитела к шигеллам Флекснера, на одно предметное стекло, а на другое предметное стекло каплю сыворотки с антителами к шигеллам Зонне. Петлю прожигать после каждой сыворотки. В обе капли внести исследуемую культуру и размешать. При положительной реакции через несколько минут в одной из сывороток происходит агглютинация (капля просветляется и в ней видны зерна агглютината).

3. Произвести посев агглютинабельной колонии на среду Ресселя (уколом и по поверхности).

Среда Ресселя представляет собой комбинированную среду. Она относится к дифференциально-диагностическим средам и содержит кроме питательной основы 1% лактозу, 0,1% глюкозу, индикатор. Среду готовят таким образом, чтобы она была в виде столбика, а верхняя часть имела скошенную поверхность. Исследуемую культуру засевают уколом в столбик и на поверхность среды. При посеве на среду Ресселя культуры шигелл, разлагается только глюкоза, поэтому столбик окрасится в желтый цвет, а скошенная часть останется зеленого цвета.

4. Произвести учёт и дать заключение РПГА в серодиагностике дизентерии с эритроцитарными дизентерийными диагностикумами Зонне и Флекснера.

Ингредиенты: исследуемая сыворотка, эритроцитарные диагностикумы Зонне и Флекснера, физиологический раствор. Эритроцитарный диагностикум представляет собой взвесь сенсibilизированных антигенами из шигелл эритроцитов барана или человека.

Постановка: В лунках полистироловых пластин готовят два ряда последовательных разведений исследуемой сыворотки и вносят эритроцитарные диагностикумы Флекснера и Зонне. Пластины помещают на 2-2,5 часа в термостат при 37°C. Обязательно ставят контроль диагностикума в физиологическом растворе.

Учет результатов: положительная реакция — красный зонтик, отрицательная реакция — красная пуговка. Сопоставляют титр реакции с диагностическим титром, который составляет 1/200.

5. Произвести учёт роста возбудителя дизентерии на среде Ресселя и биохимических свойств шигелл.

Ингредиенты: Среда Ресселя, которая содержит лактозу и глюкозу и пестрый ряд Гиса, состоящий из пяти углеводов. Кроме питательной основы и углевода к среде добавлен индикатор. Исходный цвет среды розовый, при образовании кислоты цвет среды становится синим. Газообразование улавливают с помощью поплавков-коротких стеклянных трубочек, запаянных с одного конца, помещенных в питательную среду, открытым концом вниз. Образование индола и сероводорода определено с помощью индикаторных бумажек. При образовании индола индикаторная бумажка, пропитанная насыщенным раствором щавелевой кислоты, розовеет. При образования сероводорода индикаторная бумажка, пропитанная уксуснокислым свинцом, чернеет.

Постановка: Пересев колоний со среды Ресселя на ряд Гиса и МПБ и инкубация 24 часа в термостате.

Биохимические изменения на пестром ряду с посевом шигелл

Лактоза	Глюкоза	Маннит	Мальтоза	Сахароза	МПБ	
					Индол	H ₂ S
- (До кислоты через 2-3 дня у S.sonnei)	+ До кислоты	+ До кислоты	+ До кислоты	-	-	-

Таким образом, для шигелл характерна ферментация глюкозы, мальтозы и маннита с образованием кислоты, отсутствие ферментации лактозы и сахарозы, отрицательные пробы на индол и сероводород.

6. Учесть и дать заключение по реакции Видалья в диагностике брюшного тифа и паратифов А и В.

Ингредиенты реакции: исследуемая сыворотка, 4 диагностикума (О-брюшнотифозный, Н-брюшнотифозный, ОН-паратифозным А и ОН-паратифозным В), физиологический раствор.

Постановка: Учитывая, что по клинической картине нельзя отличить тиф от паратифов, реакцию ставят с четырьмя диагностикумами: двумя брюшнотифозными, паратифозным А и В, готовя для каждого антигена ряд разведений исследуемой сыворотки. В рабочие разведения первого ряда внести по 2 капли О-брюшнотифозного диагностикума, в рабочие разведения второго ряда внести по 2 капли Н-брюшнотифозного диагностикума, в рабочие разведения третьего ряда внести по 2 капли ОН-паратифозного А диагностикума, а в

четвертый ряд ОН-паратифозного В диагностикума. Ставят в термостат на 2 часа или до суток при комнатной температуре, после чего учитывают результат:

Учет: положительная реакция белый зонтик, отрицательная белая пуговка. Если агглютинация положительна, значит в сыворотке есть антитела, а возбудителем считается тот микроорганизм, диагностикум из которого агглютинируется антителами сыворотки больного. Диагностическим считают титр реакции 1:200.

7. Решение ситуационных задач.

III модуль «Кишечные инфекции»

Занятие № 3

ТЕМА: Микробиологическая диагностика холеры.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: знать таксономию, биологические свойства, патогенез, микробиологическую диагностику, биопрепараты для специфической профилактики и этиотропного лечения холеры

уметь дать заключение по диагностике дизентерии; распознавать возбудителей по морфологическим, культуральным, биохимическим признакам, дифференцировать биотипы холерного вибриона.

Задание на дом

1. Вопросы для самоподготовки:

1) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики холеры.

Холерный вибрион (*Vibrio cholerae*) — возбудитель холеры

1. Таксономия и классификация

Холера — особо опасная (карантинная) ОКИ, характеризующаяся поражением тонкого кишечника с нарушением водно-солевого обмена, профузной водянистой диареей и рвотой с последующим обезвоживанием организма.

Возбудителями холеры являются биологические варианты *Vibrio cholerae*: *V. cholerae*, биовар *cholerae* (классический), *V. cholerae*, биовар *eltor* и *V. cholerae*, серовар 139 (Bengal). Вид *V. cholerae* делят на *биотипы*, *серогруппы* и *серовары*. Основные биотипы — классический (*V. cholerae asiaticae*) и Эль — Тор (*V. cholerae eltor*). Серогруппы выделяют по структуре О-антигенов, в основной О1 группе холерных вибрионов выделяют серовары Огава, Инаба и Хикоджима.

2. Нозологические формы

Возбудитель холеры *Vibrio cholerae* впервые был выделен из испражнений больных и трупов погибших от холеры и изучен Р. Кохом в 1882 г. В Египте. Ф. Готшлих в 1906 г. на карантинной станции Эль-Тор (в Египте) выделил из кишечника паломников вибрион, отличающийся от вибриона Коха гемолитическими свойствами. Как впоследствии оказалось *Vibrio eltor* также вызывает холеру. В начале 1993 г. появились сообщения о вспышках холеры в юго-восточной Азии, вызванных вибрионами ранее неизвестной серогруппы, обозначенных как серовар О139 (Бенгал).

Холера периодически распространяется по земному шару. До 1960 года было 6 эпидемий, которые вызывал классический биовар *V. cholerae*, 7-я эпидемия охватила 39 стран мира, в том числе европейские. Заболевания были вызваны вибрионом Эль-Тор. Наибольшее число больных, более 170 тыс., было зарегистрировано в 1971 г. Вспышки холеры периодически регистрируются в нашей стране.

Эпидемический очаг холеры до сих пор существует в бассейнах рек Ганга и Брахмапутры в Индии, где ежегодно регистрируются несколько тысяч больных. Циркуляция возбудителя среди населения поддерживается наличием стертых форм болезни и носительством, а также сохранением вибрионов в окружающей среде.

3. Эпидемиология и пути передачи

Холера — антропонозная кишечная инфекция. Холера относится к особо опасным инфекциям в связи с возможностью эпидемий (особенно при водном пути заражения) и тяжестью заболевания. Основным источником — человек (больной или вибрионоситель, в организме которого возбудители могут долго находиться, выделяясь с испражнениями во внешнюю среду), загрязненная вода. Заражение человека холерными вибрионами происходит алиментарным путем с инфицированной водой или пищевыми продуктами, реже контактно-бытовым путем. Индивидуальная восприимчивость к холере чрезвычайно переменчива. Характерно большое количество скрытых (стертых) форм, вибрионосительство. Обнаружение возбудителя в воде напрямую связано с наличием больных или бактерионосителей. Холерные вибрионы О1 группы могут длительно находиться в водных экосистемах в виде *некультивируемых форм*.

Биотопом холерных вибрионов является кишечник человека. Здесь они живут, размножаются и выделяются с испражнениями в окружающую среду, где могут оставаться жизнеспособными при температуре 1-4°C не менее 4-6 нед. Вибрионы чувствительны к повышенной температуре: при 56°C гибнут через 30 мин, при кипячении — мгновенно. Высокочувствительны к кислотам, спирту, к 3% раствору карболовой кислоты. Не выдерживают высушивания и солнечного света. Более устойчивы к действию факторов окружающей среды вибрионы Эль-Тор (например, в фекалиях, замороженных во льду, сохраняют жизнеспособность несколько месяцев).

4. Морфология и тинкториальные свойства

Холерные вибрионы имеют форму изогнутой палочки, напоминающей запятую (*запятая Коха*), размерами 0.5-3.0x0.5 мкм. Склонны к полиморфизму. Спор и капсул не образуют. Один полярно расположенный жгутик обеспечивает холерному вибриону в жидкой среде активную подвижность (определяют микроскопией по методу висячей или раздавленной капли), а в организме человека — доставку микроорганизма к эпителиальным клеткам тонкой кишки. Морфологически изменчивы. Хорошо окрашиваются водным фуксином Пфейффера и карболовым фуксином Циля.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Факультативный анаэроб. Холерный вибрион неприхотлив к питательным средам. Хорошо размножается на 1% щелочной (рН 8,6-9,0) пептонной воде, опережая бактерии кишечной группы (среда обогащения), образует нежную голубоватую пленку и муть.

При составлении элективных питательных сред для холерных вибрионов используются следующие свойства: хорошо расти на щелочных средах (рН 7,4-9,6), с концентрацией NaCl до 2%, переносить умеренные концентрации желчи и желчных кислот, теллурита К, способность разлагать сахарозу, маннозу, крахмал, разжижать желатину, а также лецитиназная активность.

На плотных средах холерный вибрион образует гладкие стекловидные, прозрачные с голубоватым оттенком дисковидные колонии вязкой консистенции. Используют щелочной агар, желчно-солевой агар, щелочной агар с кровью, наилучшей является TCBS-агар (агар с тиосульфатом, цитратом, солями желчных кислот и сахарозой), среда Клигlera, лактозо-сахарозная среда по типу среды Ресселя

На агаре с тиосульфатом, цитратом, солями жёлчных кислот и сахарозой (TCBS-агар) *V. cholerae* ферментирует последнюю и образует жёлтые колонии. При посеве уколом в желатину через 48–72 ч микроорганизм даёт воронкообразное разжижение, верхняя часть которого при просматривании сбоку представляется пузырьком воздуха. Позднее разжижение увеличивается, полость заполняется белёсой массой вибрионов.

6. Антигенная структура

У *V. cholerae* имеются следующие типы антигенов:

1. О-антиген, типоспецифический, входящий в ЛПС клеточной стенки, термостабильный. По О-антигену род *Vibrio* разделен на 139 серогрупп. Возбудители холеры относятся к 2-м серогруппам: O1 (*V. cholerae*, биовар *cholerae* и *V. cholerae*, биовар *eltor*) и O139 (*V. cholerae* Bengal).

O1 антиген неоднороден, состоит из общего А-компонента и двух типоспецифических — В и С компонентов и делится на 3 серовара по сочетанию этих компонентов: Огава (А,В), Инаба (А,С), Гикошима (А,В,С). От одного больного могут выделяться холерные вибрионы разных сероваров.

2. Н-антиген, жгутиковый, термолабильный, общий для всех возбудителей холеры.

3. Капсульный полисахаридный антиген имеется у *V. cholerae* Bengal.

Протективными антигенами холерных вибрионов считаются: О-Аг, Н-Аг, холероген, белки наружной мембраны, капсульный антиген для серогруппы O139.

V. cholerae и *V. eltor* — возбудители холеры — относятся к серогруппе O1. От больных с диареей и здоровых лиц выделяются вибрионы, лишенные O1-антигена, но имеющие общий с холерными вибрионами Н-антиген. Такие вибрионы называются

неагглютинирующимися (НАГ). Они вызывают гастроэнтериты, которые могут сопровождаться интоксикацией разной степени выраженности.

7. Биохимические свойства

Холерный вибрион сбраживает с образованием кислоты без газа многие углеводы (глюкозу, сахарозу, маннозу, маннит, лактозу, левулезу, гликоген, крахмал). По отношению к трем сахарам (*триада Хейберга*) — сахарозе, маннозе и арабинозе вибрионы делят на восемь биохимических групп, холерный вибрион относится к первой группе (разлагает сахарозу и маннозу). Бактерии этой группы обладают плазмокоагулирующим (свёртывают плазму кролика) и фибринолитическим (разжижают свёрнутую сыворотку по Лёффлеру) свойствами.

Холерный вибрион разлагает желатин, казеин, свертывает молоко и разлагает белковые препараты до индола и аммиака, H₂S не образуют, разжижают желатину и гидролизуют казеин, восстанавливают нитраты в нитриты.

На основании биохимических и биологических различий (табл. 17) холерные вибрионы разделяют на два биовара — классический (*V. cholerae* биовар *cholerae*) и Эль-Тор (*V. cholerae* биовар *eltor*). Бактерии серовара Бенгал устойчивы к полимиксину и не проявляют гемолитической активности.

Таблица 17. Дифференциальные признаки возбудителей холеры

Признак	<i>V. cholerae</i> , биовар <i>cholerae</i>	<i>V. cholerae</i> , биовар <i>eltor</i>	<i>V. cholerae</i> O139 (Bengal)
Реакция Фогеса-Проскауэра	± (чаще -)	± (чаще +)	± (чаще +)
Чувствительность к полимиксину В	+	-	-
Гемолиз эритроцитов барана	-	+	-
Агглютинация куриных эритроцитов	-	± (чаще +)	± (чаще +)
Чувствительность к классическому монофагу «С»	+	-	-
Чувствительность к монофагу <i>eltor</i>	-	+	-
Гексаминовый тест	-	+	-

8. Факторы патогенности

1. *Подвижность* (жгутики) и *хемотаксис*. Возбудители холеры обладают адгезинами и факторами колонизации, связанными с фимбриями. Имеют активную подвижность благодаря наличию мощного жгутика, что помогает его проникновению к поверхности эпителия тонкой кишки.

2. *Ферменты* способствуют адгезии и колонизации, взаимодействию с эпителиальными клетками-муциназа (разжижает слизь), нейтаминидаза (взаимодействие с микроворсинками, создание посадочной площадки), лецитиназа и другие.

3. *Эндотоксин* — термостабильный липополисахарид, схожий по структуре и свойствам с другими эндотоксинами грамотрицательных бактерий. Освобождается при распаде вибрионов.

4. *Экзотоксин* — *холероген* — главный фактор патогенности, термолабильный белок. Синтез холерогена — важнейшее, генетически детерминированное свойство холерного вибриона. Молекула холерогена состоит из двух фрагментов А и В. Собственно токсическую функцию выполняет пептид А₁ фрагмента А. Молекула холерогена распознает рецептор энтероцита, проникает в мембрану клетки, активирует аденилатциклазную систему, накапливающийся циклический АМФ вызывает гиперсекрецию жидкости, Na⁺, HCO₃⁻, K⁺, Cl⁻ из энтероцитов. Это приводит к характерной для холеры диарее, обезвоживанию и обессоливанию организма.

5. У многих вибрионов, в т.ч. не относящихся к O1 группе, имеются различные *энтеротоксины*.

6. В патогенезе проявлений холеры имеет значение также фактор, повышающий проницаемость капилляров.

9. Патогенез холеры

Попад в желудок, вибрионы могут погибнуть, так как кислотность желудочного сока для них является непреодолимым барьером. Установлено, что у здорового человека при нормальной кислотности желудочного сока заболевание не развивается при введении такого огромного количества вибрионов, как 10^{11} клеток. Но после нейтрализации кислоты желудочного сока половина здоровых людей заболевают от введения им 10^6 клеток холерного вибриона. Поэтому при снижении кислотности (во время приема пищи, особенно воды, а также при гипоацидозе) часть вибрионов проникает в тонкую кишку, где находят благоприятные условия для размножения вследствие щелочной реакции среды.

Важный этап патогенеза холеры — колонизация слизистой оболочки кишечника. Ее обеспечивают: движение вибрионов в направлении слизистой оболочки вследствие создания градиентов хемоаттрактантов, пенетрация через гель слизистой оболочки, адгезия к поверхности краевых щетинок эпителиальных клеток тонкой кишки. Вибрионы преодолевают слой слизи, чему способствует их подвижность, хемотаксис, выделяемые ферменты и соприкасаются с поверхностью эпителиальных клеток, где происходит адгезия и колонизация. При этом вибрионы остаются на поверхности клеток, не проникая внутрь, вызывая незначительную воспалительную реакцию. Высвободившийся при распаде вибрионов эндотоксин не играет существенной роли в развитии инфекционного процесса. Прикрепление вибрионов к эпителиальным клеткам обеспечивает им возможность размножаться, не быть выведенными из организма человека.

Основное значение в патогенезе принадлежит холерогену, продуцируемому вибрионами в большом количестве. Как указано выше, холероген, взаимодействуя с энтероцитами, нарушает функции аденилатциклазной системы, что приводит к накоплению цАМФ. В процессе участвуют мембранные фосфолипазы и простогландины, также способствующие накоплению цАМФ. Все это приводит к нарушению водно-электролитного обмена: клетки эпителия тонкой кишки выделяют большое количество жидкости, содержащей ионы Na^+ , Cl^- , CO_2^- , одновременно нарушается всасывание ионов K^+ . Жидкость не успевает всасываться в толстом кишечнике и возникает обильная водянистая диарея, характерная для холеры.

Организм теряет много жидкости и электролитов, вследствие чего наступает обезвоживание — дегидротация, а также деминерализация организма больного. Если теряется 9–10% жидкости и более, развивается декомпенсированная дегидротация и состояние больного становится опасным для жизни. Уменьшается объем циркулирующей крови (гиповолемия), падает артериальное давление, нарушается микроциркуляция, возникает гипоксия тканей, развивается острая почечная недостаточность, нарастает интоксикация, возможен гиповолемический шок. Потеря электролитов и, особенно K^+ , приводит к нарушению функции миокарда. Таким образом, степень и скорость обезвоживания и деминерализации определяет тяжесть течения холеры.

10. Иммуитет

В течение заболевания формируется антимикробные антитела и антитоксины, нейтрализующие холероген. Существенна роль и местного иммунитета — образующиеся секреторные IgA препятствуют адгезии холерных вибрионов на микроворсинках эпителиоцитов тонкой кишки. Таким образом, после перенесенного заболевания остается напряженный видоспецифический иммунитет.

11. Методы лабораторной диагностики

Лабораторная диагностика проводится бактериологическим, серологическим и молекулярно-генетическим методами.

Основной метод диагностики — бактериологический. Материал для исследования — испражнения и рвотные массы, секционные материалы от погибших, пробы воды и смывы с объектов окружающей среды, пищевые остатки. Исследование начинают с предварительного этапа: испражнения засевают на среду обогащения — щелочную пептонную воду, при отсутствии видимого роста пересевают на 2-ю пептонную воду. Далее делают посев с пептонной воды на чашки с селективными средами для получения роста колоний (см. таблицу 18).

Таблица 18. Бактериологическое исследование испражнений больного при подозрении на холеру

Этапы и часы исследования	Ход исследования	Результат
Предварительный этап 4-6 часов 8-12 часов	1. Посев испражнений на 1-ю ПВ, мазок по Граму и «висячая капля» 2. Пересев с 1-ой ПВ на 2-ю ПВ, мазок и «висячая капля», реакция агглютинации на стекле с поливалентной холерной О1 сывороткой	Нежная пленка на поверхности среды, грамотрицательные вибрионы, активно подвижные, агглютинируются поливалентной холерной О1 сывороткой
1-й 12-18 часов	1. Пересев Пленки с ПВ на чашки с элективными средами для получения изолированных колоний Посев исходного материала на чашки с такими же средами	Рост гладких прозрачных колоний
2-й 18-24 часа	Изучение подозрительных колоний: мазок по Граму и «висячая капля», оксидазный тест. РА на стекле с поливалентной холерной О1 сывороткой. Пересев колоний на среду Клиглера, на лактозо-сахарозную среду по типу Ресселя для выделения чистой культуры. Посев колоний в Ари 20 Е тест-систему	Грамотрицательные вибрионы, активно подвижные. Оксидаза «+». Положительная РА с поливалентной холерной О1 сывороткой. На скошенной среде lac-, sac+ колонии предварительный ответ
3-й 24-36 часов	Идентификация выделенной культуры на основании изучения: 1. морфологии — окраска по граму и «висячая капля» 2. культуральных свойств — рост на элективных средах 3. ферментативных свойств: триада Хейберга, плазмокоагулаза, фибринолизин, свертывание молока, нитрозо-индоловая проба РА с поливалентной холерной О1 сывороткой и с адсорбированными типоспецифическими сыворотками Огава и Инаба Фаготипирование с типовыми бактериофагами — классическим и эль-тор Чувствительность к антибиотикам	1. активно подвижный грамотрицательный вибрион 2. типичный рост холерного вибриона 3. триада Хейберга: map+, sac+, aga-; плазмокоагулаза+, фибринолизин+, свертывание молока+, нитрозо-индоловая проба+. РА положительная с поливалентной холерной сывороткой О1 и типоспецифическими сыворотками Антибиотикограмма 1-й окончательный ответ
4-й 36-48 часов	Учет результатов идентификации по проведенному исследованию	2-й окончательный ответ: из испражнений больного выделен возбудитель холеры.....

Одновременно засевают исходный исследуемый материал непосредственно на чашки с теми же средами, т.е. проводят сразу 1-й этап исследования. Если на чашках вырастают колонии вибрионов, то длительность бактериологического исследования сокращается на 6-8 часов. Это очень важно, т.к. исследование проводится круглосуточно, по часам для наиболее быстрого получения результата.

Серологический метод диагностики проводится с сывороткой больного для выявления антител к холерогену (наиболее ранние АТ), агглютининов и вибриоцидных АТ. Используются реакция непрямой гемагглютинации, реакция агглютинации, реакция бактериолиза и др. Серологические методы являются дополнительными, используются для выявления переболевших, установления напряженности иммунитета у вакцинированных.

Молекулярно-генетический метод: ставится ПЦР для обнаружения следующих генов в ДНК возбудителей *tor*-и *act*-гены, кодирующие факторы адгезии и колонизации и *ctxA*-и *ctxB*-гены (*Vet*-гены), кодирующие субъединицы А и В холерогена.

Ускоренные методы диагностики при холере имеют лишь ориентировочное значение. Ответ с их помощью можно получить как через 3-5 мин, так и в течение 3-5 часов. Применяются следующие методы:

- Метод иммуофлюоресценции позволяет подтвердить диагноз через 1,5 —2 часа при условии концентрации вибрионов в фекалиях 10^6 - 10^7 мкл./мг;
- Метод иммобилизации вибрионов. Микроскопия в темном поле зрения или в фазово-контрастном микроскопе нативного материала с добавлением специфической холерной О-сыворотки позволяет обнаружить холерный вибрион в течение 3-5 мин при концентрации последнего свыше 10^5 мкл./мл;
- Реакция микроагглютинации с нативным материалом и холерной агглютинирующей О-сывороткой дает ответ через 5-10 мин.; Реакция макроагглютинации с подрачиванием нативного материала в ПВ с холерной О-сывороткой дает результат через 3-4 часа;

12. Лечение и профилактика Специфическая профилактика. Имеются различные вакцины — корпускулярная убитая из сероваров Инаба и Огава, анатоксин холерогена, химическая бивалентная вакцина и живая для применения per os. Вакцины применяют только по эпидпоказаниям (низкая иммуногенность). Может проводиться антибиотикопрофилактика (превентивная терапия) тетрациклином и другими антибиотиками.

Вакцину вводят строго подкожно взрослым и детям (старше 2 лет) для профилактики холеры двукратно с интервалом 7-10 дней. При проведении плановой массовой вакцинации прививку проводят в первую очередь лицам, вероятность заражения которых очень высокая: медицинские работники, участвующие в проведении работ по борьбе с холерой, работники очистных и канализационных сооружений; лица, занятые сбором мусора, работники новостроек, переселенцы и сезонные рабочие, проживающие в неудовлетворительных бытовых условиях. Иммуитет на вакцину развивается в течение 30 дней после второго введения препарата, сохраняется до 6 месяцев, постепенно угасая. Это должно учитываться при определении сроков плановой вакцинации с учетом предполагаемого подъема заболеваемости.

Холероген-анатоксин представляет собой препарат, полученный из холерного экзотоксина, обезвреженного формалином. Используется в профилактике холеры для создания антитоксического иммунитета. Вводят вакцину подкожно по эпидемическим показаниям.

Лечение: восполнение потери жидкости и электролитов, также проводят антибактериальную терапию препаратами тетрациклинового ряда.

I. План самостоятельной работы:

1. Произвести учёт роста холерного вибриона на щелочном МПБ. Описать рост:

Холерные вибрионы к средам неприхотливы, щелочелюбивы. Элективной для них средой является щелочной МПБ, на которой уже через 3-6 часов наблюдается рост культуры на поверхности среды в виде нежной голубоватой пленки, бульон остается прозрачным, в более поздние сроки появляется диффузное помутнение.

2. Произвести учёт биологических свойств классического холерного вибриона и вибриона Эль-Тор.

Для установления биоваров холерных вибрионов — классические вибрионы или Эль-Тор проводят реакцию агглютинации бараньих эритроцитов, гексаминовый тест, реакцию Фогес-Проскауэра, ставят полимиксиновую пробу и определяют чувствительность к диагностическим холерным фагам С и Эль-Тор II. Эти реакции не абсолютны, поэтому их ставят и учитывают в комплексе.

Используемые тесты	Биовары	
	Классический вибрион	Вибрион Эль-Тор
Гемолиз эритроцитов барана	-	+
Гексаминовый тест	-	+

Реакция Фогес-Проскауэра	-	+
Чувствительность к полимиксину	+	-
Лизабельность фагом С	+	-
Лизабельность фагом Эль-Тор II	-	+

3. Произвести учёт развёрнутой реакции агглютинации с парными сыворотками.

Метод диагностики: серологический

Ингредиенты: парные сыворотки (первая взята на первой неделе заболевания, вторая на 3-4 неделе), холерный диагностикум, физиологический раствор

Постановка: Титруем парные сыворотки в двух рядах, используя физиологический раствор. Антигеном в реакции служит холерный диагностикум, который по две капли вносят в пробирки с приготовленными разведениями. Реакцию на 2 часа помещают в термостат при температуре 37°C и 18-20 часов выдерживают при комнатной температуре.

Учет: положительный результат — белый зонтик, отрицательный — белая пуговка. Результат считается положительным при увеличении титра антител в парных сыворотках в 4 и более раз.

4. Заполнить таблицу: «Исследуемые материалы при кишечных инфекциях, вызываемых энтеробактериями».

5. Решение ситуационных задач

Теоретические вопросы для рубежного контроля знаний

1. Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики колиэнтеритов.
2. Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики кишечного иерсиниоза.
3. Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики дизентерии.
4. Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики брюшного тифа, паратифов А и В.
5. Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики сальмонеллёзных гастроэнтеритов.
6. Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики холеры.

Перечень практических навыков

1. Описать культуральные свойства колоний, выросших на средах Плоскирева и Эндо при подозрении на дизентерию и колиэнтерит.
2. Произвести учёт и дать заключение по биохимической активности выделенной чистой культуры энтеробактерий.
3. Учесть характер роста возбудителей кишечных инфекций на среде Ресселя.
4. Произвести дифференцировку биовариантов холерного вибриона по биологическим свойствам (чувствительность к полимиксину, чувствительность к специфическому бактериофагу, реакция Фогес-Проскауэра, гексаминовый тест, гемолиз эритроцитов барана).
5. Поставить и учесть РА на стекле выделенной чистой культуры с противодизентерийными сыворотками.
6. Произвести учёт развёрнутой РА в пробирках с “живой” и “гретой” культурой кишечной палочки в диагностике колиэнтеритов.
7. Учесть результаты реакции Видаля в диагностике брюшного тифа, паратифов А и В.
8. Учесть и дать заключение по развёрнутой реакции агглютинации с парными сыворотками в диагностике холеры.
9. Учесть результаты РПГА с парными сыворотками в диагностике дизентерии.
10. Учесть результаты РПГА с эритроцитарными диагностикумами из шигелл Зонне и Флекснера.

Модуль IV «Воздушно-капельные инфекции»

ТЕМА: Микробиологическая диагностика воздушно-капельных инфекций: туберкулез, дифтерия

Цель занятия: знать классификацию и основные биологические свойства, факторы патогенности возбудителей, методы микробиологической диагностики, биопрепараты для этиотропной терапии и специфической профилактики указанных инфекций

уметь: микроскопировать с масляной иммерсией микропрепараты, описывать морфологические и тинкториальные свойства бактерий; описывать культуральные свойства бактерий; определять токсигенность дифтерийных палочек

Задание на дом:

I. Вопросы для самоподготовки:

- 1) Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителей туберкулеза
- 2) Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителей дифтерии

II. Базовый текст

Возбудители туберкулеза

1. Классификация и таксономия

Туберкулез — хроническое гранулематозное инфекционное заболевание, при котором чаще всего поражаются легкие. Но бывают и внелегочные формы заболевания — туберкулез кожи, костей и суставов, мочеполовой системы, кишечника, центральной нервной системы и др.

Основным возбудителем туберкулеза является *Mycobacterium tuberculosis*, который относится к домену *Bacteria*, типу *Actinomyceteeae*, классу *Actinobacteria*, семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium* (старое название ВК — бацилла Коха).

По классификации Раньона различают четыре группы:

1. фотохромогенные микобактерии, приобретающие темно-оранжевую окраску при выращивании на свету. В полной темноте они не образуют пигмента. Основной представитель — *M. kansasii*;

2. фотохромогенные микобактерии, приобретающие ярко-оранжевую окраску независимо от выращивания на свету или в темноте. Основные представители — *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. agave* и др.;

3. нефотохромогенные микобактерии, могут быть неокрашенными или иметь желтовато-оранжевые оттенки. Однако пигментация не зависит от экспозиции на свету. Основные представители — *M. intracellulare*, *M. battey*;

4. быстрорастущие микобактерии образуют колонии в течение недели при 25°C и 37°C. Представители — *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*.

2. Нозологические формы

К патогенным видам принадлежат:

M. tuberculosis вызывает туберкулез у человека в ≈ 92% случаев.

M. bovis вызывает туберкулез у крупного рогатого скота, свиней, овец, коз, верблюдов, буйволов, оленей, маралов, собак, кошек и других видов животных, а также человека в ≈ 5% случаев.

M. avium вызывает туберкулез в основном у птиц, кроликов, белых мышей, свиней; могут вызывать патологические изменения в органах у человека.

M. africanum вызывает туберкулез у людей в тропической Африке в ≈ 3% случаев.

M. paratuberculosis вызывает туберкулез у крупного рогатого скота, коз, верблюдов, овец, северных оленей.

К потенциально патогенным видам для людей принадлежат:

M. chelonae вызывают проходящие поражения у мышей, морских свинок, хомяков и кроликов, у человека — патологические изменения в синовиальной ткани коленного сустава и поражения в ягодичной части, подобно абсцессам.

M. xenopi выделены от жабы. Потенциально патогенны для человека.

M. ulcerans выделены из кожных поражений людей в Австралии, Мексике, Новой Гвинее, Африке и Малайских островах.

Остальные более 16 видов микобактерий — не патогенны для человека.

3. Эпидемиология и пути передачи

Для современного периода характерно увеличение заболеваемости, особенно среди заключенных и бомжей, повышение тяжести течения туберкулеза и смертности, распространение форм возбудителей, обладающих повышенной вирулентностью и множественной устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам.

Благодаря особому химическому строению оболочки, связанному с наличием большого количества липидов и липидсодержащих соединений, микобактерии туберкулеза обладают значительной устойчивостью к физическим и химическим агентам. Во влажной мокроте микобактерии выдерживают нагревание в течение 30 мин при 75 °С, при кипячении погибают через 5 мин. В выделенной мокроте микобактерии (МБТ) погибают при 100° С через 45 мин. В воде палочки выживают не менее 150 дней. МБТ выдерживают процессы гниения и могут несколько месяцев сохраняться в погребенных трупах. Препараты хлора и йода эффективно действуют на микобактерии.

Основными путями заражения являются воздушно — капельный и воздушно — пылевой. Основным источником заражения является больной туберкулезом человек. Способ передачи заболевания обусловлен развитием гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), которая способствует распаду тканей, образованию полостей (каверн), из которых некротические массы, содержащие множество туберкулезных микобактерий, попадают в бронхи и выделяются с мокротой при кашле во внешнюю среду, инфицируя окружающих людей. Прорыв туберкулезных гранул в кровь может привести к распространению туберкулезного процесса на другие ткани и органы. При запущенных формах вторичного туберкулеза прогноз неблагоприятен.

4. Морфология и тинкториальные свойства

Микобактерии туберкулеза (МБТ) были открыты Р. Кохом в мокроте больного туберкулезом. Это тонкие, слегка изогнутые, гомогенные или зернистые палочки длиной от 0,8 до 3-5 мкм и шириной от 0,3 до 0,5 мкм. Величина палочек зависит от возраста микроба и условий его обитания. В казеозных массах палочки располагаются неровными кучами по 2—3 и более. В различных условиях пребывания в организме палочки могут проявлять полиморфизм — образовать нитевидные, ветвящиеся формы с булавовидными образованиями на концах нитей.

При применении наиболее распространенного способа окраски (Циль-Нильсен) в палочках отмечаются более яркие красные или фиолетовые гранулы. Исследование в электронном микроскопе позволило установить сложное строение их стенки из 3 слоев, а также наличие в цитоплазме гранул. В препаратах из культур, особенно на жидких средах, вирулентные МБТ располагаются в виде жгутов. В препаратах почти всегда имеются разной степени окраски округлые тельца (зерна). Это вегетативные формы, которые получают в результате размножения микроба поперечным делением. Доказано существование неокислостойчивых культур МБТ, которые названы L-формами. Эти формы способны расти на обычных средах и трансформироваться в бактерии.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Микобактерии туберкулеза вне организма растут в чистых культурах на плотных и жидких средах с хорошим доступом воздуха. Используются глицериновые, белковые (яичные, сывороточные, картофельные) и синтетические. Они должны содержать факторы роста, такие как витамины группы В, биотин, никотин, рибофлавин. На твердых средах рост туберкулезных микобактерий появляется на 14-20 сутки в виде светло-кремового морщинистого или суховаточешуйчатого налета, колонии с неровными краями (R-формы), по мере роста приобретают бородавчатый вид, напоминающий «цветную капусту».

1. Среда Левенштейн-Йенсена содержит суспензию свежих куриных яиц, глицерин, аспарагин, крахмал, минеральные соли, раствор малахитовой зелени. Свертывают среду в пробирках в наклонном положении при 85°С 30-45 минут.

2. *Среда Финна II* содержит суспензию свежих куриных яиц, глицерин, натрия глутамат, минеральные соли, раствор малахитовой зелени. Свертывают среду по 4-5 мл в пробирках в наклонном положении при 85°C 30-45 минут.

3. *Картофельно-глицериновая среда*. Куски тщательно вымытого сырого картофеля вымачивают сутки в растворе бикарбоната натрия, а затем 2 суток в 6% растворе глицерина. Кладут приготовленные куски картофеля в широкие пробирки или пробирки с перетяжкой, наливают немного раствора глицерина, стерилизуют.

4. *Среда Сотона* — жидкая синтетическая среда содержит аспарагин, глицерин, лимонную кислоту, гидрофосфат калия, сульфат магния, дигидрофосфат натрия, цитрат аммиачного железа.

6. Антигенная структура

Микобактерии туберкулеза имеют сложный и мозаичный набор антигенов. Вирулентность туберкулезных микобактерий в значительной степени обусловлена строением их трехслойных клеточных стенок, представленных жирными кислотами, восками, сульфолипидами, а главное — миколовыми кислотами и их производными. Миколовые кислоты обуславливают кислотоустойчивость микобактерии, участвуют в формировании комплекса **пептидогликан-арабиногалактат-миколовая кислота**. Этот комплекс образует прочный каркас клеточной стенки микобактерии. При нахождении микобактерии внутри клеток (они являются факультативными внутриклеточными паразитами) они покрываются защитным восковым налетом. У микобактерий обнаружена полисахаридная микрокапсула.

МБТ выделяют токсины и эндотоксин.

7. Биохимические свойства

Микобактерии туберкулеза имеют достаточно выраженную биохимическую активность. Ферменты эстераза и липаза расщепляют жиры; дегидраза — органические кислоты, в том числе аминокислоты; уреазы — мочевины, перигалоза — углеводы, каталаза — перексид водорода; протеолитические ферменты (протеазы) — белок. Микобактерии ферментируют алкоголь, глицерин и многочисленные углеводы, лецитин, фосфатиды. У молодых культур микобактерий туберкулеза сильно выражены редуцирующие свойства, что, в частности, проявляется в их способности восстанавливать теллурит.

8. Факторы патогенности

А. Липидные фракции, входящие в состав клеточной стенки.

1. **Корд-фактор** — основной фактор патогенности. Это токсический гликолипид — эфир трегалозы и 2-х остатков миколовой кислоты (трегалоза-6,6-димиколат). Корд-фактор является фактором адгезии и колонизации, антифагоцитарным фактором, оказывает токсическое действие на митохондрии после проникновения в клетки хозяина, нарушает окислительные процессы в тканях. Корд-фактор содержат только вирулентные бактерии. Он расположен на поверхности клеточной стенки туберкулезных микобактерий, способствуя их гидрофобности, тесному склеиванию между собой, расположению в виде "жгутов". Выявляется при микрокультивировании по методу Прайса.

2. **Воск Д** — пептидогликолипид, содержащий миколовые кислоты, является антифагоцитарным фактором.

3. **Сульфолипиды** — располагаются в наружном слое клеточной стенки и в сочетании с димикоцерозат-фтиоцеролом (**воск С**) рассматриваются как фактор патогенности, так как способствует выживанию микобактерий внутри макрофагов, угнетают выделение лизосомальных ферментов.

4. **Ацетонрастворимые липиды** — усиливают иммунодепрессивные свойства микобактерий, при участии туберкулина способны модифицировать мембраны клеток организма таким образом, что иммунные силы организма принимают эти клетки за инфицированные и разрушают их (вместо того, чтобы направлять свое действие на инфицированные туберкулезными микобактериями клетки).

Б. Белковые факторы микобактерий туберкулеза.

5. **Туберкулин** — комплекс веществ, высвобождающихся при распаде туберкулезных микобактерий. Туберкулин не токсичен для здоровых людей. Он состоит из нескольких

белковых фракций и содержит высокомолекулярные полисахариды. Это основной антиген, против которого направлен иммунный ответ инфицированного организма. Туберкулин обладает выраженными свойствами аллергена и токсичен только для инфицированных и больных туберкулезом людей и животных, у которых развилось состояние гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), как форма клеточного иммунного ответа. По своим антигенным свойствам туберкулин имеет сходство с антигенами главного комплекса гистосовместимости человека (HLA). Это сходство у разных людей выражено в разной степени. Чем такое сходство больше, тем более человек восприимчив к туберкулезной инфекции, тем менее выражен иммунный ответ, ГЗТ не развивается. Таким образом, имеется генетическая предрасположенность к туберкулезной инфекции и ее хроническому течению.

9. Патогенез

В патогенезе заболевания различают два периода: *первичный* и *вторичный*. Туберкулезные микобактерии проникают аэрогенным путем в дыхательный тракт, вплоть до альвеол, где они фагоцитируются альвеолярными макрофагами, в которых долго остаются жизнеспособными. Незавершенный фагоцитоз связан с наличием у микобактерий антифагоцитарных факторов. Основной из них — корд-фактор, который повреждает мембраны митохондрий макрофагов, нарушает процесс слияния фагосом с лизосомами, а также оказывает токсическое действие на полиморфноядерные фагоциты. Таким образом, часто первая линия защиты — фагоцитоз — оказывается несостоятельной и развивается *первичный туберкулез*. Он характеризуется формированием специфического туберкулезного воспалительного очага или мелких очажков — туберкулезных гранулем, имеющих сходное строение. Воспаление распространяется на отходящие лимфатические пути и региональный лимфатический узел, образуя *первичный комплекс*: гранулематозный воспалительный очаг + лимфангоит + лимфаденит. Воспалительный туберкулезный очаг (гранулема) содержит характерные элементы: в центре формируется творожистый некроз, окруженный эпителиоидными клетками (образуются из гистиоцитов и макрофагов) и клетками Пирогова-Лангерганса. (образующиеся из эпителиоидных клеток при их слиянии или при пролиферации макрофагов). Туберкулезные микобактерии находятся в воспалительном очаге как внеклеточно, так и внутри клеток. Очаг (гранулема) содержит также лимфоидные клетки и нейтрофилы, располагающиеся ближе к периферии. При заживлении воспалительного очага творожистые массы кальцинируются, вокруг очага образуется капсула из соединительной ткани, но внутри могут остаться жизнеспособные микобактерии, часто в виде L-форм. Такие зажившие очаги называются очагами Гона. Они формируются в легочной ткани и внутригрудных лимфоузлах. На этом первичный период может закончиться, но бывает и менее благоприятное течение. Воспалительные очаги в легких и лимфоузлах могут приобретать более распространенный характер, захватывать бронхи и плевру. Вследствие лимфо-и гематогенного заноса возбудителей в другие ткани и органы в них тоже возможно формирование постпервичных гранулематозных очагов. При достаточной напряженности иммунитета первичный период часто заканчивается клиническим выздоровлением и заболевание больше не возобновляется. Этому способствует своевременно проведенная, полноценная химиотерапия.

Реже отмечается возврат болезни с развитием *вторичного туберкулеза*. Вторичный период легочного туберкулеза может возникать через различные сроки после первичного туберкулеза и рассматривается как эндогенная инфекция. При этом происходит реактивация старых очагов на фоне сниженного иммунитета. Преимущественно заболевают люди зрелого и пожилого возраста. Для вторичного туберкулеза характерно хроническое волнообразное течение болезни с периодами обострения и улучшения состояния. При отсутствии или недостаточности лечения развиваются множественные воспалительные очаги в легких, бронхах, внутригрудных лимфоузлах, в процесс может вовлекаться плевра.

10. Иммунитет

Человек обладает определенной естественной резистентностью к туберкулезной инфекции. Часто возбудители туберкулеза, попав в организм еще в детском возрасте, не вызывают видимых проявлений инфекции, за исключением выража туберкулиновой пробы.

Тем не менее, возникает приобретенный иммунитет, развивается ГЗТ. Сходная картина наблюдается и после иммунизации живой вакциной BCG /БЦЖ.

Иммунитет при туберкулезе носит преимущественно *клеточный характер*, имеют значение и антитела. Фагоцитоз, ГЗТ и антитела осуществляют комплексное защитное действие. Каждый из этих механизмов в отдельности не может обеспечить состояние иммунитета. Фагоцитоз возбудителей, осуществляемый макрофагами, является незавершенным. С развитием ГЗТ и появлением специфических антител эффективность фагоцитоза повышается. Иммунные лимфоциты также участвуют в разрушении туберкулезных микобактерий: Т-лимфоциты при участии белков главной системы гистосовместимости класса I распознают клетки, инфицированные микобактериями туберкулеза, атакуют и разрушают их.

Иммунитет при туберкулезе считается *нестерильным*, т.е. для поддержания состояния иммунитета необходимо присутствие живых туберкулезных микобактерий (вирулентных или вакцинного штамма BCG).

11. Методы лабораторной диагностики

Применяют микроскопический, бактериологический (основной), биологический, серологический методы, кожные аллергические пробы, ПЦР.

Исследуемые материалы многообразны и зависят от локализации туберкулезных поражений, а именно: мокрота, бронхо-легочные аспираты, плевральная жидкость, ликвор, моча, костный мозг, гной, кровь и др. В данном пособии лабораторная диагностика разбирается на примере исследования мокроты.

А. Микроскопическое исследование является предварительным, так как не дает возможности надежно дифференцировать возбудителей туберкулеза от других микобактерий. Существует несколько вариантов микроскопического исследования.

Прямая микроскопия исследуемого материала. Готовят мазки, растирая гнойный комочек мокроты между предметными стеклами, и окрашивают их по способу Циля-Нильсена. При микроскопии хорошо видны рубиново-красные кислотоустойчивые микобактерии на общем голубом фоне мокроты, неокислотоустойчивые бактерии и форменные элементы имеют синий цвет. Для положительного заключения необходимо просмотреть 100 полей зрения, указав количество обнаруженных в них кислотоустойчивых бактерий. Прямая микроскопия — это сравнительно малочувствительный метод, позволяющий обнаружить микобактерии при их содержании в мокроте не менее 100000 клеток/мл.

Непрямая микроскопия предварительно обогащенного материала. Методы обогащения основаны на принципе извлечения микобактерии из мокроты и их концентрации в малом объеме.

а) **Гомогенизация.** В банку с мокротой, собранной в течение суток, добавляют 1 % раствор NaOH и энергично встряхивают в шюттель-аппарате. Гомогенизированную мокроту центрифугируют при 3000 об/мин, осадок нейтрализуют, добавив 1-2 капли 10% раствора HCl. Мазки из осадка окрашивают по Цилю-Нильсену.

б) **Флотация.** Гомогенизированную мокроту помещают в колбу, добавляют 1-2 мл ксилола (или бензола) и встряхивают в течение 10 минут, доливают дистиллированную воду до горлышка колбы и дают отстояться. В горлышке колбы образуется сливообразный слой, состоящий из всплывших мельчайших капелек ксилола с сорбированными на них микобактериями. Из этого слоя готовят мазки на предметном стекле путем повторного наслаивания и окрашивают их по Цилю-Нильсену.

Методы обогащения повышают вероятность обнаружения микобактерии на 10%.

Люминесцентная микроскопия. Основана на способности липидов микобактерий поглощать люминесцентные красители и светиться в люминесцентном микроскопе. Мазки, приготовленные из осадка гомогенизированной мокроты (или флотационные мазки), окрашивают водным раствором флюоресцентных красителей — аурумин + родамин С — и микроскопируют в люминесцентном микроскопе с объективом x40, x90, x100. Туберкулезные микобактерии светятся золотисто-желтым светом на темно-зеленом фоне,

нетуберкулезные микобактерии дают зеленое свечение. Люминесцентная микроскопия повышает вероятность выявления микобактерии на 17%, т.е. наиболее чувствительна из микроскопических методов.

Б. Микрокультивирование — метод Прайса. Ускоренный метод, сочетающий микроскопическое исследование с элементами бактериологического метода (предварительное микрокультивирование). Дает возможность выявить туберкулезные микобактерии при их малом содержании, а также наличие у них корд-фактора и тем самым доказать их вирулентность. Этапы микрокультивирования микобактерий туберкулеза по методу Прайса:

1. приготовление мазка из осадка (центрифугата) гомогенизированной мокроты или флотационного слоя;
2. обработка мазков серной кислотой для уничтожения посторонней микрофлоры;
3. промывают мазки стерильной дистиллированной водой;
4. инкубация нескольких стекол с мазками в пробирке с жидкой синтетической питательной средой (или разведенной цитратной кровью);
5. ежедневное окрашивание по одному мазку способом Циля-Нильсена.

При проведении иммерсионной микроскопии вирулентные туберкулезные микобактерии, содержащие корд-фактор, образуют микроколонии из тесно склеенных между собой рубиново-красных палочек в виде изогнутых «жгутов» или «кос». Микроколонии невирулентных туберкулезных микобактерий представляют собой беспорядочные рыхлые скопления бактериальных клеток.

В. Бактериологическое исследование является основным методом, позволяющим получить чистую культуру возбудителя туберкулеза, идентифицировать ее и определить лекарственную устойчивость (степень ее чувствительности) к химиотерапевтическим противотуберкулезным препаратам. Бактериологическим методом удается выделять микобактерий при их концентрации от 20-100 живых бактерий в 1 мл клинического материала. Основной недостаток — длительность исследования.

Исследуемый материал подвергают предварительной обработке (обогащению) для концентрации микобактерий и уничтожения посторонней микрофлоры. Мокроту обрабатывают щелочью (2% раствор NaCl) или кислотой (10% раствор H₂SO₄) подвергая встряхиванию, затем центрифугируют. Полученный осадок нейтрализуют и засевают в несколько пробирок с яичной средой Левенштейна-Йенсена. Используют и другие среды — яичную среду Финна II, картофельно-глицериновую, жидкую среду Сотона. Засеянные пробирки плотно укупоривают во избежание высыхания и инкубируют при 37°C до 2-3 месяцев, еженедельно просматривая. Видимый рост появляется, начиная с 10-12-14 дней и позже.

Ниациновая проба — ценный тест, с помощью которого *M.tuberculosis* дифференцируют от *M.bovis* и нетуберкулезных микобактерий. Только *M.tuberculosis* способны синтезировать никотиновую кислоту (ниацин) при культивировании на яичных средах. Для выявления ниацина к выросшей культуре добавляют растворы 10% цианистого бромида и 4% анилина. В положительном случае появляется ярко-желтое окрашивание.

Кроме того, у чистой культуры изучают скорость роста, образование пигмента (на свету или в темноте), способность к росту при 20-25°C и к росту на простых питательных средах, наличие каталазы и пероксидазной активности и некоторые другие биологические пробы. Эти пробы позволяют дифференцировать возбудителей туберкулеза.

У выделенных культур туберкулезных микобактерий в обязательном порядке определяют степень лекарственной устойчивости к противотуберкулезным химиопрепаратам. Для этой цели культуру засевают в пробирки со средой Левенштейна-Йенсена, в которые перед свертыванием были внесены различные концентрации химиопрепаратов. Окончательную оценку проводят после 3-х недель инкубации. Учитывают отсутствие роста или степень его интенсивности в присутствии различных концентраций химиопрепаратов. Полученные результаты используют для назначения рациональной химиотерапии.

Г. Биологический метод в настоящее время применяют редко в диагностике туберкулеза легких, чаще всего при диагностике туберкулеза почек. Материалом от больного заражают лабораторных животных (морских свинок, чувствительных к *M.tuberculosis*, кроликов, восприимчивых к *M.bovis*), Наблюдают за животными в течение 1-2 месяцев до их гибели. С 5-10 дня после заражения можно исследовать пунктат лимфатических узлов.

Д. Серологический метод проводят для выявления антител в сыворотках больных туберкулезом или микобактериозом, а также для обнаружения антигенов микобактерий в исследуемом материале. С этой целью используют различные серологические реакции, такие как РСК, РИГА, РИА, ИФА.

Е. Кожно-аллергическая проба (туберкулинодиагностика) выявляет ГЗТ, развивающуюся у вакцинированных вакциной БЦЖ, инфицированных и больных туберкулезом. Осуществляется с помощью препаратов туберкулина, который вводят накожно или внутрикожно.

Проба Манту — внутрикожная проба — применяется как основной метод туберкулинодиагностики при массовых ежегодных обследованиях. Ее назначение:

- отбор контингентов лиц для ревакцинации БЦЖ;
- перед первичной вакцинацией детей в возрасте 2 месяцев и более;
- для диагностики туберкулеза, в том числе для раннего выявления начальных и локальных форм туберкулеза у детей и подростков;
- для определения инфицирования микобактериями туберкулеза.

При постановке пробы Манту туберкулин вводят на внутреннюю поверхность предплечья строго внутрикожно. Учитывают реакцию через 72 часа. Гиперемия учитывается только в случае отсутствия инфильтрата.

Проба Манту считается отрицательной при наличии только уколочной реакции (**0-1** мм), сомнительной при гиперемии без папулы или наличии папулы диаметром **2-4** мм; положительной — при папуле диаметром **5** мм и более.

12. Лечение и профилактика

Специфическая профилактика осуществляется вакциной БЦЖ (BCG — *Bacillus Calmette-Guérin*). Вакцина БЦЖ и БЦЖ-М (со сниженной антигенной нагрузкой) содержит живые, ослабленные микобактерии вакцинного штамма БЦЖ-1, лиофильно высушенные в 1,5% растворе натрия глютамината. Вакцина была получена А.Кальметтом и М.Гереном из штамма *M.bovis* длительным пассированием (230 пересевов в течение 13 лет) на картофельно-глицериновой среде с добавлением желчи (метод аттенуации). Штамм сохранил остаточную вирулентность.

Вакцинацию проводят всем новорожденным на 5-6 день в роддоме внутрикожно. Ревакцинацию проводят в 7 лет и далее с интервалом в 5 лет до 30 летнего возраста при отрицательных туберкулиновых пробах.

Лечение туберкулеза проводится химиопрепаратами (антибиотиками и синтетическими препаратами). Их подразделяют на препараты первого ряда (изониазид, этамбутол, стрептомицин, пипразинамид, рифампицин и др.) и альтернативные (канамицин, циклосерин, ПАСК, этионамид и др.)

Возбудители дифтерии

1. Классификация и таксономия

Дифтерия — острое инфекционное заболевание, характеризующееся фибринозным воспалением на месте входных ворот (чаще всего глотки) и тяжелой интоксикацией организма с преимущественным поражением сердца, почек и нервной системы.

Возбудителем дифтерии является *Corynebacterium diphtheriae*, который относится к домену *Bacteria*, типу *Actinomyceteeae*, порядку *Actinomycetales*, классу *Actinobacteria*, семейству *Corynebacteriaceae*, отделу *Firmicutes*, роду *Corynebacterium* (старое название VL — бацилла Леффлера).

2. Нозологические формы

Дифтерия как заболевание выделена в самостоятельную нозологическую форму.

Клиническая классификация дифтерии подразделяет заболевание на следующие формы с вариантами течения заболевания:

1. Дифтерия ротоглотки: дифтерия ротоглотки локализованная с катаральным, островчатым и плёнчатый вариантами; дифтерия ротоглотки распространённая; дифтерия ротоглотки субтоксическая; дифтерия ротоглотки токсическая (I, II и III степеней); дифтерия ротоглотки гипертоксическая.
2. Дифтерийный круп: дифтерия гортани (дифтерийный круп локализованный); дифтерия гортани и трахеи (круп распространённый); дифтерия гортани, трахеи и бронхов (нисходящий круп).
3. Дифтерия носа.
4. Дифтерия половых органов.
5. Дифтерия глаз.
6. Дифтерия кожи.
7. Комбинированные формы с одновременным поражением нескольких органов.

3. Эпидемиология и пути передачи

Источником инфекции при дифтерии является человек (больной, реконвалесцент, бактерионоситель); наибольшую эпидемическую опасность представляют больные лица. Реконвалесценты выделяют дифтерийную палочку в течение 15-20 суток. Основной путь передачи дифтерийной палочки — воздушно-капельный; также возможно заражение через предметы, используемые больным, и инфицированные пищевые продукты (обычно молоко).

4. Морфология и тинкториальные свойства

Возбудитель дифтерии *Corynebacterium diphtheriae* — это палочки, с колбовидными вздутиями на концах, что придает микробу сходство с булавой, длиной 1-6 мкм, толщиной 0,3-0,8 мкм. Отличительные признаки: наличие включений волютина на концах клеток (*тельца Бабеша-Эрнста*) и расположение бактерий в микропрепарате под углом — в виде латинских букв V, Y, L, «растопыренных пальцев». Живые микробы неподвижны, жгутиков не имеют, спор не образуют, характеризуются наличием пили и микрокапсулы. Грамположительны.

У *Corynebacterium diphtheriae* выделяют три биовара — *gravis*, *mitis* и *intermedius*. Бактерии биовара дифтерии *gravis* — короткие неправильной формы, с небольшим количеством метакроматических гранул. Биовар дифтерии *mitis* образуют длинные изогнутые полиморфные палочки, содержащие много волютиновых зёрен (*тельца Бабеша-Эрнста*). Бактерии биовара дифтерии *intermedius* наиболее крупные, с бочковидными очертаниями; для них характерны поперечные перегородки, разделяющие клетку на несколько сегментов. В настоящее время биовар дифтерии *intermedius* относят в группу *gravis*.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Бактерии хорошо развиваются при свободном доступе кислорода, при температуре от 15 до 40°C. Могут расти на обычных питательных средах, но лучше и с характерной морфологией развиваются на средах, содержащих кровь или сыворотку любого вида животного.

Среды должны содержать в качестве источников азота аминокислоты: β-аланин, цистин, метионин, валин и др. Дифтерийная палочка способна восстанавливать металлический теллур из его солей. Теллуриды калия являются ингибитором микрофлоры, встречающейся в зеве.

1. *Кровяной теллуридовый агар (КТА)* состоит из питательного агара, 2% раствора теллурида калия и дефибринированной или гемолизированной лошадиной или бычьей крови (10%). Колонии *C.diphtheriae* появляются через 18-24 часа черного цвета или серого с черным центром.

2. *Среда Клауберга II* состоит из питательного агара, 2% раствора теллурида калия, глицерина, гемолизированной крови. Через 24 часа вырастают матово-черные, неслившиеся плоские колонии, Через 48-72 часа возможна их дифференциация на биотипы. Тип *gravis* образует серовато-черные колонии с несколько изрезанными краями, колонии типа *mitis* растут в виде мелких блестящих серовато-черных колоний с ровными краями.

3. *Свернутая сыворотка — среда Ру* — представляет собой чистую сыворотку крови любого происхождения. Ее разливают по 3 мл в пробирки и в наклонном положении пробирки нагревают в течение 1 часа при 80°C для свертывания. Колонии на среде Ру вырастают через 12-18 часов мелкие, диаметром 0,5-1,0 мм, круглые, суховатые, кремово-желтого цвета, не сливающиеся даже при сплошном посева.

6. *Антигенная структура*

Дифтерийные бактерии имеют довольно сложную антигенную структуру и серологически неоднородны. Выделяют О-и К-антигены. Полисахаридные компоненты О-антигенов клеточной стенки обладают межродовыми свойствами, обуславливая неспецифические перекрестные реакции с микобактериями, актиномицетами (нокардиями). Поверхностные К-антигены — капсульные белки, обладают видовой специфичностью и иммуногенностью.

7. *Биохимические свойства*

Дифтерийная палочка вырабатывает кислоту без газообразования в средах с глюкозой, мальтозой и галактозой, но не с лактозой, сахарозой и маннитом. Сбраживание крахмала и гликогена считают характерной особенностью типа *gravis*. Многие штаммы дают гемолиз на кровяном агаре и лизируют эритроциты, добавленные к культуре.

Дифтерию вызывают только токсичные штаммы, обладающие способностью продуцировать *экзотоксины*. Степень токсичности дифтерийных микробов может быть различной. *Единицей измерения* силы токсина служит минимальная смертельная доза (DLM) — наименьшее количество токсина, убивающее морскую свинку массой 250 г в течение 3-4 суток. Кроме экзотоксина дифтерийная палочка продуцирует *дермонекротоксин, гемолизин, нейраминидазу и гиалуронидазу*.

Синтез дифтерийного токсина микробными клетками детерминирован специальным геном *tox*, локализуемым в ДНК лизогенного фага. Токсин продуцируют крупных размеров особи возбудителя, в которых отмечается спонтанная продукция фага. Генетические структуры, управляющие синтезом дифтерийного токсина, функционируют независимо от всех органоидов, обеспечивающих жизнедеятельность микробов. В связи с этим коринебактерии могут терять ген *tox*, и, собственно, патогенные свойства.

8. *Факторы патогенности*

1. *Факторы адгезии и колонизации*, которые до настоящего времени не идентифицированы. Возможно, эти функции выполняют: пили, микрокапсула, компоненты клеточной стенки, с помощью которых *S.diphtheriae* прикрепляются к эпителиоцитам слизистой и колонизируют их.
2. *Инвазивные свойства* связаны с гиалуронидазой, нейраминидазой и гемолизином, которые участвуют в развитии некротических процессов слизистой оболочки и разжижении основного вещества соединительной ткани.
3. *Дифтерийный токсин (гистотоксин)* — основной фактор патогенности. Подобно многим бактериальным токсинам, он состоит из фрагментов А и В, выполняющих, соответственно ферментативную и рецепторную функции. Фрагмент В связывается с белковыми рецепторами на клетке-мишени, способствуя проникновению в нее фрагмента А, который обладает НАД-гликогидролазной и АДФ-рибозилтрансферазной активностью. Действуя внутриклеточно, фрагмент А расщепляет НАД и инактивирует фактор элонгации-2, который отвечает за построение пептидных цепей на рибосомах в эукариотических клетках. В результате прекращается биосинтез белка и наступает гибель клеток.
4. *Корд-фактор (димиколат трегалозы)* нарушает процессы дыхания в митохондриях эукариотических клеток, прежде всего в фагоцитах, обладает антифагоцитарной активностью.

9. *Патогенез*

Входные ворота инфекции — слизистые оболочки носоглотки, гортани, в редких случаях слизистая оболочка глаза, поврежденная кожа. В подавляющем большинстве

случаев входными воротами является слизистая оболочка глотки и развивается дифтерия зева. При дифтерии зева процесс может распространиться на нижележащие дыхательные пути или пойти вверх, поражая слизистые оболочки носа и среднего уха. В зависимости от тяжести заболевания, различают три формы этой инфекции: локализованную, распространенную и токсическую.

S.diphtheriae прикрепляются к поверхности эпителия миндалин и окружающих тканей мягкого неба (адгезия) и, колонизируя эту область, продуцируют дифтерийный гистотоксин и другие факторы патогенности, что приводит к развитию фибринозно-некротического фарингита и общей интоксикации организма больного.

Дифтерийный токсин вызывает гибель клеток эпителия, подавляет фагоцитоз, повреждает эндотелий сосудов субэпителиальной ткани. Происходит обильная экссудация плазмы на поверхность некротизированного эпителия, где содержащийся в плазме фибриноген превращается в фибрин. Образуется толстая серовато-белая пленка (псевдомембрана), тесно спаянная с подлежащей тканью. Такой тип воспаления называют *дифтеритическим*. Пленка состоит из сгустков фибрина, некротизированной ткани, содержит множества дифтерийных бактерий, которые здесь защищены от воздействий факторов иммунитета и имеют прекрасные условия для размножения и выработки токсина.

Развитию процессов некротизации эпителия способствуют ферменты, вырабатываемые *S.diphtheriae*.

10. Иммунитет

Иммунитет после перенесенной дифтерии отличается значительной стойкостью, носит преимущественно антитоксический характер. В последнее время уделяется внимание и антибактериальному иммунитету, его роли в предотвращении развития инфекции на начальном этапе и в противодействии формированию бактерионосительства.

11. Методы лабораторной диагностики

Основной метод диагностики дифтерии — бактериологический, обычно с предварительной бактериоскопией. Серологический метод используют для определения токсигенности возбудителя и, значительно реже, для выявления антитоксинов в сыворотке крови больного.

Материалы для исследования: пленки или слизь из зева, носа, глаза и других областей в зависимости от локализации поражений. Клинический материал берут сухим тампоном, пленки отделяют пинцетом. Материал для микроскопии и посева берут отдельными тампонами. Бактериологическое исследование рекомендуется начать не позднее чем через 3 часа после взятия материала.

Бактериоскопии подвергаются микропрепараты, приготовленные с тампона и окрашенные по Граму, Леффлеру, Нейссеру. При обнаружении палочек с морфологией и расположением, характерным для *S.diphtheriae* (зерна волютина на полюсах клеток), дают предварительный ответ: "обнаружены палочки, подозрительные на дифтерийные; исследование продолжается".

Бактериологическое исследование. Производят посев инфицированным тампоном на чашки с теллуритовым кровяным агаром (среда Клауберга и др.), на которых могут вырасти радиально исчерченные колонии серого цвета (*бивар gravis*) или черные гладкие колонии несколько меньшего размера (*бивар mitis*). Потемнение колоний *S.diphtheriae* происходит вследствие их способности восстанавливать теллур из теллурита калия, (теллурит калия включают в среду для подавления роста грамотрицательной микрофлоры). Колонии отсевают на скошенные среды — сывороточный агар или свернутую лошадиную сыворотку. Выделенную культуру идентифицируют на основании изучения ее морфологических, культуральных, биохимических свойств и определения токсигенности. *S.diphtheriae* ферментирует глюкозу, галактозу, цистеин, не расщепляет сахарозу и мочевины (см. табл 19).

Таблица 19. Дифференциальные признаки *S.diphtheriae* и некоторых других видов коринебактерий, выделяемых со слизистых дыхательных путей человека

Виды	Токси-	Цистиназа	Уреаза	Углеводы	Агглютина-бельность
------	--------	-----------	--------	----------	---------------------

	генность	(проба Пизу)		Глюкоза	Сахароза	Крахмал	поливалентной сывороткой
<i>C.diphtheriae</i>	+	+	-	+	-	+	+
<i>C.xerosis</i>	-	-	-	+	+	-	-
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	-	-	+	-	-	-	-

Определение токсигенности — очень важный тест при идентификации выделенной культуры коринебактерий, так как продуцировать экзотоксин способны только патогенные штаммы *C.diphtheriae* и именно они являются возбудителями дифтерии.

Токсигенность определяют с помощью двойной диффузии в геле (метод Оухтерлони). Можно определять токсигенность у выделенных культур *C.diphtheriae* также при помощи вариантов реакции непрямой гемагглютинации — РОНГА и РНАТ. Эти реакции позволяют получать результат в день исследования (нередко через 1-2 часа) и отличаются высокой чувствительностью.

12. Лечение и профилактика

- 1) *Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая (АКДС — вакцина)* — применяется для плановой вакцинации детей от 3 мес. до 3 лет. Содержит взвесь убитых коклюшных микробов и очищенных дифтерийного и столбнячного анатоксинов, сорбированных на алюминия гидроксиде (20 млрд. микробных клеток коклюшных бактерий/мл); 30 флокулирующих доз (Lf) дифтерийного и 10 антитоксинсвязывающих столбнячного анатоксина в 1 мл.
- 2) *Тетракок (Франция)*. Содержит 30 ЕС дифтерийного анатоксина, 60 ЕС столбнячного анатоксина, адсорбированных на гидроокиси алюминия, взвесь убитых коклюшных бактерий и инактивированную полиомиелитную вакцину 1, 2 и 3 типов. Предназначен для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка и полиомиелита. Обладает более высокой реактогенностью, чем АКДС вакцина.
- 3) *Анатоксин дифтерийно-столбнячный очищенный адсорбированный (АДС)*. Содержит в 1 мл 60 Lf дифтерийного и 20 ЕС столбнячного анатоксина, очищенных и сорбированных на алюминия гидроксиде. Предназначен для профилактики дифтерии и столбняка у детей до 6 лет.
- 4) *Анатоксин дифтерийно-столбнячный очищенный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов — АДС-М-анатоксин*, препарат содержит в 1 мл 10 Lf дифтерийного и 10 ЕС столбнячного анатоксинов. Применяют у детей с 6 летнего возраста, у подростков и взрослых. У ослабленных детей и непереносимости АКДС-вакцины применяют АДС-М-анатоксин в более раннем возрасте.
- 5) *Анатоксин дифтерийный очищенный адсорбированный с уменьшенным, содержанием антигена жидкий — АД-М-анатоксин* Препарат содержит в 1 мл 10 Lf дифтерийного анатоксина, сорбирован на алюминия гидроксиде. Предназначен для профилактики дифтерии у детей с 6-летнего возраста, подростков.
- 6) *Сыворотка противодифтерийная лошадиная очищенная концентрированная жидкая* — белковая фракция сыворотки крови лошадей, гипериммунизированных дифтерийным анатоксином, содержащая антитела — дифтерийные антитоксины (не менее 1500 МЕ/мл). Препарат применяют для лечения дифтерии в дозах от 10 000 до 100 000 МЕ в зависимости от тяжести заболевания. Антитела сыворотки нейтрализуют только не связанный с чувствительными клетками токсин, поэтому специфическое лечение следует начинать в первые дни болезни.

Для воздействия на возбудителя дифтерии применяют антибиотики эритромицин, клиндамицин, рифампицин и др.

I. План практической работы

1. Приготовить мазок из "мокроты больного туберкулёзом", окрасить по Цилю-Нильсену, микроскопировать с иммерсией, зарисовать, дать заключение.

Этапы приготовления мазка и порядок проведения иммерсионной микроскопии см. с.19.

Этапы окраски

- 1) на фиксированный мазок нанести карболовый раствор фуксина Циля через полоску фильтровальной бумаги;
- 2) подогреть препарат в пламени горелки до появления паров (повторить 3-4 раза);
- 3) снять бумагу, промыть мазок водой;
- 4) для дифференцирования нанести 5% раствор серной кислоты на 5 секунд;
- 5) промыть водой;
- 6) нанести водный раствор метиленового синего и докрасить 3-5 мин;
- 7) промыть водой;
- 8) высушить.

2. Описать культуральные свойства колоний микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена.

Среда Левенштейн-Йенсена содержит суспензию свежих куриных яиц, глицерин, аспарагин, крахмал, минеральные соли, раствор малахитовой зелени. Свертывают среду в пробирках в наклонном положении при температуре 85°C 45 минут.

Рост туберкулезных микобактерий появляется на 14-20 сутки в виде светло-кремового морщинистого или суховато-чешуйчатого налета, крупные колонии с неровными краями гомогенной структуры, по мере роста приобретают бородавчатый вид, напоминающий «цветную капусту».

3. Заполнить таблицу: «Факторы патогенности *M.tuberculosis*».

4. Изучить и описать методы обогащения мокроты:

- а) метод гомогенизации (см. в МУ по частной микробиологии с.77)
- б) метод флотации (см. в МУ по частной микробиологии с. 77)

5. Изучить и описать метод микрокультивирования микобактерий по Прайсу.

Этапы микрокультивирования микобактерий туберкулеза по методу Прайса с целью выявления вирулентности возбудителя:

1. готовят мазки из осадка (центрифугата) гомогенизированной мокроты или флотационного слоя;
2. выдерживают мазки 15 минут в 2% растворе H₂SO₄ для уничтожения посторонней микрофлоры
3. промывают мазки стерильной дистиллированной водой;
4. несколько стекол с мазками помещают в широкую пробирку с жидкой синтетической питательной средой (или разведенной цитратной кровью) и инкубируют при 37°C;
5. через каждые 3-5 дней, последовательно, вынимают по одному мазку и окрашивают способом Циля-Нильсена. Обычно через 6-10 дней на стеклах наблюдается рост микроколоний, в виде «жгутов» и «кос», выявляемых при микроскопии;
6. по окончании культивирования материал окрашивают по Цилю-Нильсену.

При проведении иммерсионной микроскопии вирулентные туберкулезные микобактерии, содержащие корд-фактор, образуют микроколонии из тесно склеенных между собой рубиново-красных палочек в виде изогнутых жгутов или кос.

Микроколонии невирулентных туберкулезных микобактерии представляют собой беспорядочные рыхлые скопления бактериальных клеток.

6. Микроскопировать с масляной иммерсией мазок чистой культуры коринебактерий, окрашенный по Леффлеру, зарисовать, дать заключение.

Метод Леффлера относится к простым методам окраски и используется для выявления зерен волютина (цитоплазматических включений полифосфатов) у возбудителя дифтерии (*C.diphtheriae*), располагающихся по полюсам клетки. Фиксированный мазок окрашивают уксуснокислым метиленовым синим в течение 5 минут. Зерна волютина обладают свойством *метахромазии* и более интенсивно накапливают краситель — цитоплазма бактерий окрашена в голубой цвет, зерна волютина — в темно-синий. При иммерсионной микроскопии возбудитель имеет характерное расположение в мазке: в виде латинских букв V, Y, L или «растопыренных пальцев».

7. Изучить характер роста дифтерийной палочки на среде Клауберга. Описать культуральные свойства колоний, зарисовать.

Среда Клауберга предназначена для культивирования *C. diphtheriae* и состоит из питательного агара, раствора теллурида калия, глицерина, гемолизированной крови. Через 24 часа инкубации на плотной питательной среде вырастают матово-черные, неслившиеся плоские колонии. Через 48-72 часа возможна их дифференциация на биотипы. Тип *gravis* образует матовые серовато-черные крупные колонии с несколько изрезанными краями («цветы маргаритки»), колонии типа *mitis* растут в виде мелких блестящих серовато-черных колоний с ровными краями.

8. Заполнить таблицу: «Дифференциальные признаки *C. diphtheriae* и некоторых других видов коринебактерий, выделяемых со слизистых дыхательных путей человека».

9. Изучить технику постановки и учесть реакцию преципитации (РП) в геле с целью определения токсигенности дифтерийной палочки (РН токсина антитоксической сывороткой).

Токсигенность определяют с помощью двойной диффузии в геле (метод Оухтерлони). Для постановки реакции преципитации в геле по Оухтерлони берут чашки Петри с фосфатно-пептонным агаром. На поверхность питательной среды помещают стерильную полоску фильтровальной бумаги (2,0x8 см), смоченную стандартной антитоксической противодифтерийной сывороткой, содержащей 500 МЕ/мл. По обеим сторонам бумажки на расстоянии 0,5-1 см от нее симметрично засевают испытуемые дифтерийные культуры бляшками или штрихами. Контроли: посев заведомо нетоксигенной и токсигенной культур. Результаты учитывают через 24, 48 и 72 часа инкубации при 37°C. Если культура токсигенна, то между полоской бумаги и ростом культуры образуются белые линии преципитации в результате встречной диффузии антитоксина и токсина. Образующиеся дугообразные линии вокруг исследуемой колонии, совпадающие с линией преципитата контрольной токсигенной культуры, являются положительным результатом реакции.

10. Решение ситуационных задач.

Ситуационная задача

В больницу поступил ребенок 8-и лет с температурой 39°C, болью в горле и удушьем. Во время осмотра в области зева отмечается налет в виде плохо отслаивающейся пленки желтоватого оттенка. При микробиологическом исследовании пленки выявлены прямые грамположительные палочки с утолщением на концах, располагающиеся под углом к другу; спор и капсул не образуют. На среде Клауберга микроорганизмы растут в виде крупных сухих, серых колоний с изрезанными краями («цветы маргаритки»). Обладает выраженной биохимической активностью: ферментирует глюкозу, мальтозу, крахмал, гликоген, продуцируют цистиназу.

1. Какие из перечисленных микроорганизмов выделены от больного:

1. *Corynebacterium diphtheriae mitis*
2. *Corynebacterium diphtheriae gravis*
3. *Mycobacterium tuberculosis*
4. *Bordetella pertussis*
5. *Clostridium perfringens*

2. Какие методы следует использовать для окрашивания выделенного возбудителя:

1. Циля-Нильсена
2. *Нейссера*
3. *Леффлера*
4. Ожешко
5. Бурри-Гинса

3. Токсигенность дифтерийной палочки определяют с помощью реакции:

1. Агглютинации
2. *Преципитации*
3. Связывания комплемента
4. ИФА
5. ПЦР

Модуль IV «Воздушно-капельные инфекции»

Тема 2: Микробиологическая диагностика воздушно-капельных инфекций: менингококковая инфекция, коклюш

Цель занятия: знать классификацию и основные биологические свойства, факторы патогенности возбудителей, методы микробиологической диагностики, биопрепараты для этиотропной терапии и специфической профилактики указанных инфекций.

уметь микроскопировать с масляной иммерсией микропрепараты, описывать морфологические и тинкториальные свойства бактерий; учитывать результаты РПГА с парными сыворотками; учитывать результаты РСК.

Задание на дом:

I. Вопросы для самоподготовки:

- 1) Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителей менингококковой инфекции
- 2) Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителей коклюша

II. Базовый текст

Возбудители менингита

1. Классификация и таксономия

Менингококковая инфекция — острая респираторная инфекция, вызываемая менингококком - *Neisseria meningitidis*. Клинически характеризуется поражением слизистой оболочки носоглотки (назофарингит), генерализацией в форме специфической септицемии (менингококцемия) и воспалением мягких мозговых оболочек (менингит).

Neisseria meningitidis относится к домену Bacteria, типу *Proteobacteria*, классу *Betaproteobacteria*, порядку Neisseriales, семейству *Neisseriaceae*, роду *Neisseria*.

2. Нозологические формы

N. meningitidis вызывает менингококковый менингит (эпидемический цереброспинальный менингит).

Остальные представители этого рода (кроме *N. gonorrhoeae*) являются резидентной флорой слизистых оболочек.

3. Эпидемиология и пути передачи

Менингококковая инфекция — строгий антропоноз с воздушно-капельной передачей возбудителя. Основным источником менингококков — носители, но наиболее опасны больные с признаками генерализованных поражений. Менингококковая инфекция распространена повсеместно. Распространение возбудителя на территории, где заболевание ранее не регистрировали (например, регионы Крайнего Севера), приводит к преобладанию генерализованных форм, охватывающих все возрастные группы.

Природный резервуар менингококка — носоглотка человека. *N. meningitidis* выделяют у 3-30% здоровых людей. Одновременно с ростом числа носителей, невосприимчивых к менингококкам, увеличивается количество людей, выполняющих роль резервуара возбудителя. Во время эпидемии уровень носительства приближается к 95%, однако заболевание развивается у менее 1% инфицированных лиц.

На слизистой оболочке носоглотки обнаруживаются непатогенные представители рода — *N. catarrhalis*, *N. sicca*.

4. Морфология и тинкториальные свойства

Менингококки — мелкие (0,6—0,8 мкм) диплококки. Для них характерно расположение в виде пары кофейных зерен, обращенных вогнутыми поверхностями друг к другу. Менингококки неподвижны, спор не образуют, имеют пили, граммотрицательны, в мазках из патологического материала выявляется нежная капсула.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Менингококки выращиваются в аэробных условиях, на средах, содержащих нативный белок животного или человеческого происхождения. На плотной среде (сывороточный агар, кровяной агар и др.) менингококки образуют мелкие прозрачные колонии с ровными краями, вязкой консистенции. Растут на искусственных питательных средах, содержащих спе-

циальный набор аминокислот. Элективная среда должна содержать ристомицин — кровяной агар с ристомицином — питательный агар на основе бульона Хоттингера + 20% сыворотки крови (лошадиной или бычьей) + раствор мальтозы + раствор водного голубого + ристомицин (150 ед/мл среды). Рост колоний наблюдается через 48 часов. Колонии мелкие, с булавочную головку, с ровными краями, прозрачные, голубоватого оттенка. Повышенная концентрация CO₂ в атмосфере стимулирует рост менингококков. Они очень требовательны к условиям культивирования: температурный оптимум 37°C (повышение до 39°C или снижение до 14°C вызывает гибель).

6. Антигенная структура

Менингококки содержат протеиновый антиген, общий для всего вида, и полисахарид, различная структура которого дала возможность подразделять их на серогруппы и серовары. На основе группоспецифических полисахаридных капсульных антигенов выделяют 13 серогрупп. Наиболее часто вызывают менингококковую инфекцию представители серогрупп А, В, С, Х, Y и W-135.

7. Биохимические свойства

Менингококки ферментируют с образованием кислых продуктов только глюкозу и мальтозу, что служит дифференциально-диагностическим признаком.

8. Факторы патогенности

Менингококки обладают адгезивными, токсическими, инвазивными и антифагоцитарными свойствами.

1. *Факторы адгезии* — пили и белки наружной мембраны клеточной стенки.

2. *Инвазию* менингококков обуславливают ферменты — гиалуронидаза, протеаза, фибринолизин, нейраминидаза. Протеаза разрушает sIgA, обеспечивающий местный иммунитет на слизистый носоглотки.

3. *Основной токсический фактор* — это эндотоксин, освобождающийся при гибели менингококков и обладающий пирогенным, некротическим и летальным действием. Некоторые штаммы менингококков продуцируют гемолизин.

4. *Антифагоцитарный фактор* — это полисахаридная капсула менингококков, которая защищает *N.meningitidis* от гибели в вакуолях фагоцитов, где менингококки беспрепятственно размножаются, как в "инкубаторе", вызывая генерализацию процесса при последующем разрушении фагоцитов. Плазмокоагулаза, вырабатываемая менингококками, также обладает антифагоцитарной активностью.

9. Патогенез

Входные ворота инфекции — слизистая оболочка заднего отдела носоглотки. Менингококки имеют пили, посредством которых они взаимодействуют со специфическими рецепторами эпителия, наступает адгезия и последующая колонизация цилиндрического эпителия, сопровождающаяся воспалительной реакцией.

При прорыве защитного барьера слизистой оболочки, чему способствуют ферменты гиалуронидаза и нейраминидаза, возбудитель проникает в лимфатические сосуды и далее в кровь. Развивается менингококцемия. Происходит массовая гибель менингококков с освобождением большого количества эндотоксина. Эндотоксин поражает эндотелий кровеносных сосудов, возникают множественные кровоизлияния в различные ткани и органы, на коже появляется геморрагическая сыпь.

Может развиваться инфекционно-токсический шок, сопровождающийся расстройством гемодинамики, тромбозом и диссеминированной внутрисосудистой коагуляцией, резкими изменениями в электролитном и гормональном гомеостазе. Такие тяжелые поражения возникают при молниеносной менингококцемии, нередко заканчивающейся гибелью больного.

При прорыве гематоэнцефалического барьера менингококки гематогенным путем попадают в субарахноидальное пространство, где они размножаются, вызывая серозно-гнойное, переходящее в гнойное, воспаление мягких мозговых оболочек — менингит. Иногда в воспалительный процесс вовлекается мозговое вещество — развивается менингоэнцефалит.

Различают следующие клинические формы менингококковой инфекции:

1. локализованные: менингококконосительство, острый назофарингит;
2. генерализованные:

- а) менингококцемия (типичная, молниеносная, хроническая);
- б) менингит;
- в) менингоэнцефалит;
- г) смешанная (менингококцемия + менингит, в 25-50% случаев);
- д) редкие формы (эндокардит, артрит, пневмония, иридоциклит и др.)

Многообразие клинических форм обусловлено, по-видимому, степенью вирулентности штаммов *N.meningitidis* и резистентностью организма человека. Действие β -лактамов лекарственных препаратов на менингококки приводит к формированию L-форм возбудителя, теряющих специфические морфологические, физиологические и антигенные особенности, присущие исходным клеткам. Выделяют L-формы из ликвора больных.

10. Иммунитет

Антитела к менингококковым антигенам появляются на 5-й день болезни, их пик выявляется на 2-3-й неделе от начала заболевания. Постинфекционный иммунитет — напряженный, длительный, повторные заболевания и рецидивы возникают редко. Иммунитет носит гуморальный характер. Антитела вырабатываются к различным антигенам микробной клетки (полисахаридам и белкам). Полисахаридные антигены сероваров А и С обладают высокой иммуногенностью, полисахарид серовара В почти неиммуногенен.

Противоменингококковые антитела передаются трансплацентарно от матери плоду и сохраняются на протяжении 2-5 месяцев после рождения ребенка.

11. Методы лабораторной диагностики

Осуществляется бактериоскопическим, бактериологическим, серологическим методами. Применяются и экспресс-методы диагностики.

Материалы для исследования: слизь из носоглотки, спинномозговая жидкость (ликвор), кровь. Ликвор получают с помощью спинномозговой пункции. При менингите ликвор вытекает из иглы струей (а не каплями, как в норме) и обычно бывает мутным. Носоглоточную слизь берут с задней стенки глотки специальным заднеглоточным тампоном на длинной изогнутой проволоке, не касаясь слизистой полости рта, языка и зубов.

Менингококки во взятых материалах быстро погибают, особенно при охлаждении, поэтому исследуемые материалы хранят до посева не более 2-3 часов при 37°C.

1. Бактериоскопическому исследованию подвергают ликвор (лучше брать осадок после центрифугирования) и секционный материал (оболочки мозга). Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают метиленовым синим или методом Грама. При положительном результате в поле зрения видны лейкоциты и диплококки в виде "кофейных зерен", расположенные как внеклеточно, так и внутри лейкоцитов. По Граму менингококки окрашиваются в розовый цвет, т.к. они грамотрицательны.

2. Бактериологический метод диагностики является основным. Он заключается в выделении и последующей идентификации возбудителя из носоглоточной слизи, ликвора, крови, геморрагических высыпаний. Посевы осуществляют на плотные питательные среды, которые готовятся на основе бульона Хоттингера (или другого высококачественного бульона) с добавлением крови, сыворотки крови или асцитической жидкости. В среду добавляют для подавления роста сопутствующей микрофлоры антибиотик ристомицин, к которому менингококки устойчивы.

Исследуемую кровь в объеме 5-10 мл сначала засевают в колбу с 50 мл 0,1% МПА (полужидким) и инкубируют при 37°C 24 часа, затем пересевают на плотную питательную среду.

Далее проводят макро-и микроскопическое исследование выросших колоний и выделяют чистую культуру на скошенном сывороточном или кровяном агаре (параллельно колонии засевают на обычный скошенный агар, на котором менингококки не должны расти).

Идентификация проводится по антигенным свойствам (в реакции агглютинации на стекле) для определения серогруппы и биохимической активности (*N.meningitidis* биохимически малоактивна, разлагает с образованием кислоты без газа глюкозу и мальтозу, не ферментирует леулузу, сахарозу, лактозу, не образует индол и H₂S).

3. Серологический метод используют как для выявления менингококкового антигена в исследуемых материалах, так и для обнаружения противоменингококковых антител в сыворотке

крови больного. Применяют следующие серологические реакции — РИГА, РСК, ИФА. РИФ, встречный иммуноэлектрофорез.

4. Экспресс-диагностику проводят с помощью реакций коагутинации и латекс-агглютинации. Обе реакции применяют для выявления как *N. meningitidis* (в том числе и нежизнеспособных), так и их антигенов.

В реакции *коагутинации* специфические противоменингококковые антитела сорбированы на клетках стафилококков, содержащих А-белок, который обладает способностью присоединять Fc-фрагмент IgG антител.

В реакции *латекс-агглютинации* специфические антитела связаны с частицами латекса.

И коагутинацию, и латекс-агглютинацию ставят на предметных стеклах, добавляя исследуемый материал (чаще всего ликвор) к специфическим противоменингококковым сывороткам. Видимый результат — агглютинация — наступает через 15-30 минут в виде образования хлопьев.

Латекс-агглютинацию можно ставить и для обнаружения противоменингококковых антител в исследуемых сыворотках. В этом случае используются частицы латекса с сорбированным на них менингококковым антигеном.

12. Лечение и профилактика

Осуществляется инактивированной химической вакциной, содержащей высокоочищенные капсульные полисахариды серогрупп А, С, У, W-135, каждый из которых формирует лишь групповой иммунитет.

1). **Вакцина менингококковая группы А полисахаридная сухая** — очищенный капсульный специфический полисахарид, выделенный из бульонной культуры менингококка. Препарат предназначен для профилактики менингококковой инфекции, вызванной менингококком серогруппы А у детей и взрослых (по эпидемиологическим показаниям).

2). **Вакцина менингококковая групп А и С полисахаридная сухая** — аналогична предыдущей. Предназначена для профилактики менингококковой инфекции, вызванной менингококками серогрупп А и С, с 18-летнего возраста по эпидемиологическим показаниям.

3). **Иммуноглобулин человека нормальный** — иммуноглобулиновая фракция сыворотки человека (серия — от 1000 чел.), очищенная и концентрированная методом фракционирования этиловым спиртом, содержит антитела различной специфичности. Предназначена для экстренной профилактики и лечения в первые дни заболевания при различных заболеваниях менингококковой инфекции, коклюша, а также кори, гепатита В и др. Препарат применяют в первую очередь у детей с тяжелыми формами заболеваний.

Для лечения применяют сульфаниламиды и антибиотики. При генерализованных формах менингококковой инфекции эффективной является пенициллинотерапия большими дозами.

Возбудители коклюша

1. Классификация и таксономия

Коклюш — острое респираторное инфекционное заболевание, характеризующееся затяжным течением и наличием судорожного приступообразного кашля.

Возбудителем коклюша является *Bordetella pertussis*, который относится к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Betaproteobacteria*, семейству *Alcaligenaceae*, роду *Bordetella*.

2. Нозологические формы

Возбудители рода *Bordetella* патогенны для человека. *B. pertussis* вызывает коклюш, возбудителем паракоклюша является *B. parapertussis*.

3. Эпидемиология и пути передачи

Единственный источник инфекции — человек, больной коклюшем (заразен до 25-30 дней) или бактерионоситель. Механизм передачи — аэрозольный; путь передачи — воздушно-капельный. Несмотря на массивное выделение возбудителя во внешнюю среду, благодаря крупнодисперсному характеру выделяемого аэрозоля передача микроба возможна только при тесном общении с больным. При этом заражение происходит на расстоянии не

более 2 м от источника инфекции. Из-за нестойкости возбудителя во внешней среде передача через предметы обихода, как правило, не происходит.

4. Морфология и тинкториальные свойства

Представители рода *Bordetella* — мелкие кокковидные грамотрицательные палочки с закругленными концами (0,2-0,5 x 0,5-2 мкм), биполярно окрашенные. Неподвижны. Спор не образуют. Имеют микрокапсулу и пили.

5. Питательные среды и культуральные свойства

B. pertussis требовательна к питательным средам. Росту бактерий препятствуют накапливающиеся в питательной среде жирные кислоты, поэтому в состав питательных сред входят адсорбенты — активированный уголь, крахмал, альбумин, эритроциты и др.

- 1) **Агар Борде-Жангу** — картофеле-глицериновая среда + 20-30% дефибринированной крови. Колонии на среде Борде-Жангу вырастают через 48-72 часа — мелкие (диаметр около 1 мм), выпуклые, влажные, блестящие.
- 2) **Казеинво-угольный агар (КУА)** содержит кислотный гидролизат казеина, крахмал, дрожжевой гидролизат, набор минеральных солей, активированный уголь. Колонии коклюшной палочки вырастают через 48-72 часа мелкие, выпуклые, типа «ртутной капли».

6. Антигенная структура

Коклюшные бактерии имеют О-антиген и семь К-антигенов, выявляемых в реакции агглютинации. Эти антигены называются факторами и обозначены цифрами 1 - 7. Фактор 1 имеется у всех штаммов *B. pertussis*, т.е. он видоспецифичен. По наличию и сочетанию антигенов 2, 3, 4 и 5 коклюшные бактерии подразделяются на серовары. Фактор 7 присутствует у всех *Bordetella*, что позволяет считать его родоспецифичным. *B. parapertussis* имеет видоспецифический фактор 14.

У *B. pertussis* обнаружены фазовые вариации, имеющие антигенные, культуральные и вирулентные отличия: от 1-ой фазы (S-вариант с выраженной вирулентностью, полноценными антигенными и характерными культуральными свойствами) через промежуточные II и III фазы к IV фазе (авирулентный R-вариант, утративший К-антигены). Переход от I к IV фазе наблюдается по ходу заболевания коклюшем.

7. Биохимические свойства

Облигатные аэробы. Бактерия оксидазоположительна, но не вырабатывает уреазу, нитразу, не содержит цитрата.

7. Факторы патогенности

А. Факторы адгезии и колонизации:

Пили, микроворсинки (филаментный гемагглютинин — белок, связывающий бактерии с ресничками эпителиоцитов слизистой).

Б. Антифагоцитарные факторы: капсула.

В. Токсические вещества:

1. **Термолабильный экзотоксин (коклюшный токсин)** — гистаминсенсibilизирующий, лимфоцитозстимулирующий, термостабильный (инактивируется при 80°C), действует на систему цАМФ. Токсин состоит из двух субъединиц — А и В. Субъединица В обеспечивает доставку субъединицы А к клеткам-мишеням, связываясь с их рецепторами. Кроме того, она сама по себе обладает биологической активностью, в частности стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов. Субъединица А проникает в цитоплазму и оказывает токсическое действие на клетку, вызывая выделение слизи из клеток слизистого эпителия в виде вязкой мокроты. Кроме того, он обладает свойствами адгезина, нарушает фагоцитарную активность нейтрофилов.
Термолабильный токсин
2. **Термостабильный экзотоксин** — белок, связанный с цитоплазмой, инактивируется при 56°C; оказывает прямое действие на клетки реснитчатого эпителия;
3. **Трахеальный цитотоксин**, приводит к деструкции клеток реснитчатого эпителия;
4. **Гемолизин** — токсин, оказывающий местное действие на эпителий;
5. **Аденилатциклаза** — фермент, превращающий АТФ в цАМФ, действует как токсин. Усиливает действие коклюшного токсина, в том числе сенсibilизацию организма к токсическим субстанциям *B. pertussis*, обладает антифагоцитарной активностью.
6. **Эндотоксин** (ЛПС наружной мембраны клеточной стенки) — вызывает лихорадку.

8. Патогенез

Входные ворота инфекции — клетки реснитчатого эпителия, выстилающие респираторный тракт. С помощью адгезинов — филаментного гемагглютинина, роль которого является основной, пилей и других факторов адгезии, *B. pertussis* прикрепляются к ресничкам эпителия трахеи и бронхов, колонизируют поверхность эпителиальных клеток, вызывая их повреждение. Эти процессы могут подавить специфические антитела класса А (sIgA).

При недостаточности этой первой линии защиты происходит интенсивное размножение коклюшных бактерий, при этом образуются многочисленные токсические факторы, которые обладают согласованным и целенаправленным действием как местным, так и системным.

В катаральный период коклюша повреждающее действие на эпителий оказывают трахеальный цитотоксин, термолабильный токсин и гемолизин.

Трахеальный цитотоксин — постоянно продуцируемый *B. pertussis* — не обладает прямой токсичностью. Но, взаимодействуя с макрофагами и клетками реснитчатого эпителия, цитотоксин стимулирует образование большого количества цитокинов, которые и оказывают деструктивное действие на эпителий.

В отличие от цитотоксина, термолабильный токсин обладает прямым токсическим действием на клетки эпителия. Таким образом, совместное действие этих токсинов вызывает воспалительную реакцию эпителия респираторного тракта, характерную для катарального периода. Отмечается повышенная температура, насморк, небольшой кашель.

Следует отметить, что коклюшные бактерии вызывают поверхностное воспаление слизистой оболочки респираторного тракта, нередко распространяющееся по всей ее поверхности, но не проникают ни в подлежащие ткани, ни в кровяное русло.

При дальнейшем течении заболевания продолжается накопление токсических факторов и прежде всего коклюшного токсина. С действием коклюшного токсина связано наступление следующего периода заболевания — судорожного. Постепенно учащаются приступы судорожного (параксизмального) кашля и выделяется вязкая стекловидная мокрота. Приступы судорожного кашля способствуют выведению этой мокроты.

Продуцируемая *B. pertussis* аденилатциклаза усиливает действие коклюшного токсина, действуя в том же направлении. Она способствует повышению проницаемости капилляров и развитию отека, а также действует как гистаминсенсibiliзирующий фактор.

На 5-ой неделе заболевания выделить возбудителя уже не удастся, тем не менее приступы судорожного кашля продолжают еще длительное время. Приступы могут вызвать различные неспецифические раздражители — громкий звук, яркий свет, осмотр больного врачом, медицинские процедуры и т.п. Предполагают, что эти приступы связаны с повышенной реактивностью поврежденной токсинами слизистой оболочки дыхательных путей к различным раздражителям и снижением порога чувствительности к гистамину. В период разрешения кашель становится реже, теряет конвульсивный характер. Постепенно симптомы болезни исчезают.

9. Иммунитет

Иммунитет, вырабатываемый после перенесенного коклюша, стойкий, повторные заболевания чрезвычайно редки. Иммунитет имеет антимикробный и антитоксический характер. Основную роль играют специфические антитела, относящиеся к классам IgM, IgG и IgA. sIgA обеспечивают местный иммунитет на слизистых респираторного тракта.

Трансплацентарная передача антител от матери плоду не отмечается, поэтому новорожденные дети чувствительны к *B. pertussis* с 1-го дня жизни.

10. Методы лабораторной диагностики

Проводятся бактериологическим (основным) и серологическим методами исследования.

Бактериологический метод позволяет выделить возбудителя коклюша с первых дней болезни и до 25-30-го дня (в катаральном периоде — в 90-95% случаев, в судорожном периоде — в 50%, частота выделения постепенно снижается). Основной исследуемый материал — слизь из носоглотки. Слизь берут с задней стенки глотки, где она оседает при кашле, тампоном на длинной проволоке, который вводят через рот или через носовые ходы. Часто используют метод "кашлевых пластинок": больному во время приступов кашля подставляют ко рту открытую чашку с питательной средой. Чашку держат вертикально на расстоянии 5-10 см в течение нескольких секунд.

Для выделения и культивирования *B.pertussis* применяют специальные питательные среды: картофельно-глицериновый агар с кровью (среда Борде-Жангу) и казеиншо-угольный агар (КУА). Для подавления роста посторонней микрофлоры в среды добавляют метициллин.

Через 48-72 часа после посева на чашках вырастают мелкие блестящие выпуклые колонии, напоминающие капельки ртути. Выделенную культуру идентифицируют по совокупности морфологических, культуральных, биохимических (*B.pertussis* практически инертна) и антигенных свойств. *B.pertussis* агглютинируются антифакторными сыворотками 7 и 1. По ходу бактериологического исследования проводится дифференциация *B.pertussis* от *B.parapertussis*. В отличие от коклюшных паракклюшные бактерии могут расти на МПА, колонии вырастают быстрее (за 24-48 часов), они крупнее и имеют коричневый цвет. *B.parapertussis* образуют уреазу, расщепляют аргинин, агглютинируются родоспецифической антифакторной сывороткой 7 и видоспецифической сывороткой 14.

Экспресс-метод диагностики. Во время катарального периода *B.pertussis* можно выявить методом иммунофлюоресценции.

Серологический метод. Его проводят в поздние сроки при атипичном течении болезни, если не удалось выделить возбудителя, и иногда проводят для ретроспективной диагностики. Исследуют парные сыворотки больного в серологических реакциях РСК, РА, РИГА, ИФА. Реакции ставят параллельно с коклюшным и паракклюшным антигенами (диагностикумами). Положительным результатом считается повышение титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой не менее, чем в 4 раза.

ИФА позволяет выявлять антитела классов IgM, IgG и IgA. Для оценки местного иммунитета определяют IgA в слизи из носоглотки.

11. Лечение и профилактика

1) *Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая (АКДС — вакцина)* — применяется для плановой вакцинации детей от 3 мес. до 3 лет. Содержит взвесь убитых коклюшных микробов 1-й фазы и очищенных дифтерийного и столбнячного анатоксинов, сорбированных на алюминия гидроксиде (20 млрд. микробных клеток коклюшных бактерий/мл); 30 флокулирующих доз (Lf) дифтерийного и 10 антитоксинсвязывающих (ЕС) столбнячного анатоксина в 1 мл.

2) *Тетракок (Франция).* Содержит 30 ЕС дифтерийного анатоксина, 60 ЕС столбнячного анатоксина, адсорбированных на гидроокиси алюминия, взвесь убитых коклюшных бактерий и инактивированную полиомиелитную вакцину 1, 2 и 3 типов. Предназначен для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка и полиомиелита. Обладает более высокой реактогенностью, чем АКДС вакцина.

3) *Противококлюшный иммуноглобулин.*

В качестве антибактериальной терапии назначаются антибиотики, которые оказывают терапевтический эффект только в ранние сроки заболевания. Антибактериальными препаратами, препятствующие колонизации *B.pertussis* на цилиндрическом эпителии верхних дыхательных путей являются эритромицин, вильфарен и некоторые другие.

I. План практической работы

1. Микроскопировать с масляной иммерсией демонстрационные микропрепараты, приготовленные из ликвора, окрашенные метиленовой синью, зарисовать, дать заключение.

Исследуемым материалом для бактериоскопического метода диагностики менингита является ликвор (лучше брать осадок после центрифугирования). Этапы приготовления мазка и порядок проведения иммерсионной микроскопии см. с.19. Окрашивание мазка осуществляется простым методом с использованием водного раствора метиленового синего. Продолжительность окраски составляет 3-5 минут, после чего микропрепарат промывают водой, высушивают и микроскопируют.

При положительном результате в поле зрения видны лейкоциты и диплококки в виде "кофейных зерен", расположенные как внеклеточно, так и внутри лейкоцитов.

2. Учеть РПГА с «парными» сыворотками в диагностике менингококковой инфекции.

Данный серологический метод диагностики используют для выявления противоменингококковых антител в сыворотке крови больного.

Компоненты реакции: исследуемые сыворотки пациента (материал берется на конец 1-ой недели, т.к. антитела к менингококковым антигенам появляются на 5-й день болезни, и на конец 3-ей недели, т.к. их пик выявляется на 2-3-й неделе от начала заболевания), менингококковый эритроцитарный диагностикум и фосфатный буфер.

Для постановки «парные» исследуемые сыворотки титруют в лунках полистироловых планшетов фосфатным буфером от 1:20 с двукратным увеличением титра. Для создания контроля в последнюю лунку вносят 0,5 мл — менингококкового эритроцитарного диагностикума на фосфатном буфере. После добавления во все лунки одинакового количества менингококкового эритроцитарного диагностикума проводят инкубацию в термостате при температуре 37° 30 минут. Положительным результатом является гемагглютинация в лунках (осадок в виде красного «зонтика»). Учет результатов реакции производят путем установления нарастания антител в «парных» сыворотках (нарастание титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой в 4 и более раза является положительным результатом).

Заключение: отмечается нарастание титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой в 4 раза, что является признаком «свежего» инфекционного процесса.

3. Заполнить таблицу: «Питательные среды для культивирования *B.pertussis*».

4. Разобрать схему постановки и учесть РСК в серодиагностике коклюша.

Метод диагностики: серологический — используют для выявления противокклюшных антител в сыворотке крови больного.

Компоненты: исследуемая сыворотка больного человека (в которой ищут антитела к возбудителю коклюша), коклюшный диагностикум (взвесь убитых бордетелл), система комплемента в рабочей дозе и гемолитическая система (состоящая из гемолитической сыворотки кролика и эритроцитов барана), физиологический раствор.

Постановка: в рабочую пробирку вносят исследуемую сыворотку больного человека в титре 1:40, коклюшный диагностикум, комплемент в рабочей дозе. Контроли: 1 пробирка — контроль сыворотки больного. В тест-системе находятся сыворотка больного, комплемент и физиологический раствор; 2 пробирка — контроль комплемента: коклюшная диагностическая сыворотка, коклюшный диагностикум и комплемент; 3 пробирка — контроль диагностикума: коклюшный диагностикум, комплемент и физиологический раствор.

После инкубации опытной и контрольных пробирок в течение 30-40 минут при температуре 37°С в них добавляют гемолитическую систему и снова инкубируют 40 минут при температуре 37 °С.

Учет реакции начинают с контролей.

1 контроль сыворотки больного — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Комплемент не связался в тест-системе с компонентами сыворотки, т.к. нет комплекса Аг-Ат, поэтому после добавления гемолитической системы в присутствии свободного комплемента произошел гемолиз эритроцитов. Контроль правильный.

2 контроль комплемента — гемолиз отсутствует, на дне пробирки осадок эритроцитов. В тест-системе составлен заведомо положительный комплекс Аг-Ат, и комплемент в рабочей дозе полностью с ним связался без остатка. При добавлении гемолитической системы в отсутствие комплемента гемолиза не происходит, и эритроциты выпадают в осадок. Контроль правильный.

В случае передозировки комплемента в данной пробирке произойдет гемолиз.

3 контроль диагностикума — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Комплемент не связался в тест-системе с антигенами диагностикума, т.к. нет комплекса Аг-Ат, поэтому после добавления гемолитической системы в присутствии свободного комплемента произошел гемолиз эритроцитов. Контроль правильный.

Опытная пробирка: положительная реакция «+» — пробирка с ровным осадком в виде «красной пуговки», гемолиз отсутствует (возбудитель коклюша и антитело образуют

иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент, т.е. происходит связывание комплемента комплексом Ag-At. При добавлении гемолитической системы гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет, т.к. комплемент весь израсходован на формирование первоначального иммунного комплекса. Отрицательная реакция «-» — содержимое пробирки равномерно красного цвета («лаковая кровь») — гемолиз эритроцитов. Если антиген и антитело не соответствуют друг другу, т.е. в исследуемом образце нет антитела, комплемент остается свободным и присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело (гемолитическая система), вызывая гемолиз.

Заключение: Исследуемая сыворотка содержит антитела к возбудителю коклюша.

5. Решение ситуационных задач.

Ситуационная задача.

Ребенок 2-х лет, заболел респираторной инфекцией, сопровождающейся субфебрильной температурой, насморком, слабым кашлем. За 10 дней до начала заболевания имел контакт с больным коклюшем ребенком.

Каков Ваш предполагаемый диагноз?

- 1) Коклюш, период разрешения
- 2) Паракоклюш, катаральный период
- 3) *Коклюш, катаральный период*
- 4) Коклюш, судоржный период

Перечислите методы лабораторной диагностики данного заболевания:

- 1) *Бактериологический метод*
- 2) Вирусологический метод
- 3) *Экспресс-метод диагностики*
- 4) *Серологический метод*

Перечислите основные питательные среды, применяемые для культивирования возбудителя данного заболевания:

- 1) *Среда Борде-Жангу*
- 2) Среда с ристомидином
- 3) *Казеиново-угольный агар*
- 4) Среда Левенштейна-Йенсена

Модуль IV «Воздушно-капельные инфекции»

Тема 3: Микробиологическая диагностика воздушно-капельных инфекций: атипичные пневмонии.

Цель занятия: знать определение типичной и атипичной пневмоний; классификацию и основные биологические свойства, факторы патогенности основных возбудителей группы атипичных пневмоний, методы микробиологической диагностики, биопрепараты для этиотропной терапии и специфической профилактики указанных инфекций;

уметь микроскопировать с масляной иммерсией микропрепараты, описывать морфологические и тинкториальные свойства бактерий; описывать культуральные свойства бактерий; учитывать результаты ПЦР, РПГА с парными сыворотками; учитывать результаты РСК.

Задание на дом:

I. Вопросы для самоподготовки:

- 1) Определение типичной и атипичной пневмоний.
- 2) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики микоплазм, вызывающих пневмонии
- 3) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики возбудителя хламидийной пневмонии
- 4) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики возбудителя легионеллезной пневмонии

II. Базовый текст

Определение типичной и атипичной пневмоний

Пневмония — острое инфекционное заболевание, при котором происходит образование воспалительного инфильтрата в паренхиме легкого, подтвержденное рентгенологически.

Наиболее актуальный возбудитель *типичной пневмонии* — *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) Нередко сходную клинико-рентгенологическую картину могут вызывать и другие пиогенные микроорганизмы *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*.

Клиническая картина типичной пневмонии характеризуется внезапным началом с ознобами, высокой лихорадкой, плевральными болями, продуктивным кашлем с отхождением ржавой или гнойной мокроты. Демонстративны и физические признаки пневмонической инфильтрации: участок бронхиального дыхания и/или локально выслушиваемая высокотембровая инспираторная крепитация. Рентгенологически визуализируется очаговое затенение легочной ткани в проекции доли (долей) или сегмента (сегментов). В клинической гемограмме часто отмечается лейкоцитоз и нейтрофилез.

Термин "*атипичная пневмония*" появился для обозначения поражения легких, вызванных атипичными возбудителями, которые являются внутриклеточными агентами и не выявляются при рассматривании мазка мокроты и при стандартном бактериологическом посеве мокроты или крови. Для диагностики требуются более сложные и дорогостоящие методы исследования.

Основные трудности, встающие перед врачом при ведении пациентов с атипичной пневмонией, очевидно, лежат в области ее диагностики, а не антимикробной химиотерапии. Традиционно эпидемиологические, клинические и рентгенологические характеристики пневмонии в каждом отдельном случае оказываются ключевыми в этиологической ориентированности заболевания. И, как правило, первым шагом в этом направлении является дифференциация пневмонии на типичную и атипичную.

Так называемые *атипичные микроорганизмы* (т.е. возбудители атипичной пневмонии) представляют собой весьма многочисленную группу помимо *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella spp.*, *Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae*, к ним относят также *Coxiella burnetti* (возбудитель Q-лихорадки), респираторные вирусы (прежде всего вирусы гриппа А и В, вирусы парагриппа 1, 2 и 3, респираторный синцитиальный вирус, вирус *Epstein-Barr*). Сюда же включаются и более редко встречающиеся микроорганизмы возбудители туляремии (*Francisella tularensis*), лептоспироза (*Leptospira spp.*), хантавирусы, хламидиеподобный возбудитель Z.

Клиническая картина атипичной пневмонии начинается с продромальной симптоматики простудного заболевания: сухого кашля, мышечных болей, общей слабости, насморка, умеренной лихорадки; чаще в анализах крови регистрируется нормальное количество лейкоцитов. Особенность атипичных пневмоний состоит в преобладании симптомов общей интоксикации, которые отодвигают на второй план легочные проявления, отсутствие инфильтративных изменений на рентгенограмме легких в первые дни болезни (интерстициальный тип). Течение таких пневмоний непредсказуемо: они могут протекать как малосимптомно, так и тяжело, с развитием опасных для жизни осложнений. Трудности диагностики и разнообразие клиники обуславливают часто несвоевременное поступление пациента в стационар, позднюю постановку диагноза и затруднения в выборе терапии.

Возбудители микоплазменной пневмонии

1. Классификация и таксономия

Mycoplasma pneumoniae относится к семейству Mycoplasmataceae, порядку Mycoplasmatales, классу Mollicutes, роду Mycoplasma.

Она занимает промежуточное положение между вирусами, бактериями и простейшими и является мембрано-ассоциированным микроорганизмом, уникальным мембранным паразитом, способным к длительной персистенции.

2. Нозологические формы

В организме человека встречается большое количество видов микоплазм, однако патогенными для человека, то есть при определенных условиях вызывающими болезнь, считаются всего три вида этих микроорганизмов:

-*Mycoplasma genitalium* — вызывает у человека урогенитальный микоплазмоз;

-*Mycoplasma pneumoniae* — является возбудителем атипичной пневмонии.

-*Mycoplasma hominis* — является причиной урогенитальных микоплазмозов и микоплазменных пневмоний.

3. Эпидемиология и пути передачи

Источником заражения является больной респираторным микоплазмозом и носитель. Пути передачи — воздушно-капельный, трансплацентарный.

4. Морфология и тинкториальные свойства

Mycoplasma pneumoniae — короткие, нитевидные и сферические бактерии. Длинной 2-5 мкм. Отсутствует типичная клеточная стенка. Вместо этого они покрыты трехслойной объединяющей мембраной, благодаря которому они могут менять форму и проходить через бактериальные фильтры. Обладает «скользящей подвижностью». По Граму окрашивается в красный цвет (грамотрицательная), но лучшие результаты дает окраска по Романовскому-Гимзе.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Выделение культуры *Mycoplasma pneumoniae* чрезвычайно трудоемкий и длительный процесс (микроорганизм растет крайне медленно, в течение 7-14 сут.) Культивируются на сыровоточном агаре с добавлением ацетата таллия, для подавления контаминантной флоры. В питательные среды необходимо вносить нативную сыворотку, холестерин, нуклеиновые кислоты, углеводы, витамины и различные соли. Полностью резистентны к пенициллину, а тетрациклин и эритромицин угнетают их рост. На плотных питательных средах (*Mycoplasma agar*) колонии разрастаются с выпуклым центром («яичница глазунья»).

6. Антигенная структура

У *M. pneumoniae* типоспецифичные Аг отсутствуют, но выявлены группоспецифические Аг — это содержание РНК и ДНК, трехслойная цитоплазматическая мембрана, и терминальная структура, играющая важную роль в уникальной скользящей подвижности и адсорбции (прилипанию) микоплазм к поверхностным структурам клеток хозяина (эритроциты, клетки реснитчатого эпителия бронхов и др.).

7. Биохимические свойства

Микоплазмы способны самостоятельно питаться и размножаться. Микоплазмы не способны к образованию холестерина, основного компонента собственной мембраны, и потребности в нем восполняют утилизацией его из тканей или питательной среды с его

внесением. Холестерин стабилизирует мембрану клетки, придает ей эластичность и обуславливает проникновение и утилизацию жирных кислот. Стерины детоксифицируют жирные кислоты, которые способны вызвать гибель клетки, и служат субстратом для получения энергии.

Избирательный гидролиз аргинина, мочевины, а также ферментация глюкозы позволяет производить индикацию микоплазм, а также их дифференцировать.

8. Факторы патогенности

1) Эндотоксин *M. pneumoniae* проявляет пирогенный эффект, вызывая тромбогеморрагические поражения, коллапс и отек легких.

2) Продукция токсина β -гемолизина — важнейший фактор патогенности, *M. pneumoniae* обладает способностью к гемадсорбции и гемолизу.

3) Предполагают наличие *нейротоксина* у некоторых штаммов *M. pneumoniae*, так как часто инфекции дыхательных путей сопровождаются поражениями нервной системы.

4) Факторы адсорбции (терминальные структуры и микрокапсула.)

9. Патогенез

Адсорбция *M. pneumoniae* — сложный процесс, в котором огромную роль играют именно терминальные структуры и микрокапсула возбудителя, обеспечивающие настолько тесный межмембранный контакт, что невозможно исключить прямое проникновение содержимого микоплазм в клетку. Именно этим путем клетки хозяина превращаются в иммунологически чужеродные, вызывающие образование к ним антител. Предполагается, что именно с формированием аутоантител связано развитие нереспираторных проявлений этой инфекции.

При воздушно-капельном пути передачи микоплазма вызывает поражение слизистых оболочек задней стенки глотки, трахеи, бронхов. Но основные изменения происходят за счет адгезинов в альвеолярном эпителии. В системе клеток мерцательного эпителия прикрепление происходит слабее, что, по-видимому, обусловлено активностью ресничек. Все же достаточная доза патогенного штамма *M. pneumoniae* вызывает дисфункцию ресничек, вплоть до цилиостаза, затем происходит их цитоадсорбция и встраивание участков мембраны возбудителя в мембрану клеток. Мембранная интеграция сопровождается нарушением макромолекулярного синтеза. Альвеолярные макрофаги и нейтрофилы осуществляют фагоцитоз, и этот процесс сопровождается слушиванием резко измененных альвеолярных клеток, экссудацией внутриклеточной жидкости.

10. Иммуитет

Специфической резистентности после перенесенного заболевания не формируется, возможны случаи повторного заражения. Фагоцитоз незавершенный, при отсутствии антител макрофаги не способны фагоцитировать микоплазмы, что обусловлено наличием микрокапсулы и поверхностных Ag.

11. Методы лабораторной диагностики

1. Культуральное исследование с выделением и идентификацией микоплазм (с количественной оценкой) является "золотым стандартом" диагностики. Точность выявления достигает 100%;

2. Для серодиагностики инфекции определяют специфические антитела в парных сыворотках больного, диагностическое значение имеет увеличение титра антител в 4 раза и более.

3. Обнаружение антигена в мокроте с использованием реакции иммуноферментного анализа (ИФА) с обнаружением специфических IgG и IgM. ИФА демонстрирует высокую чувствительность и специфичность 92% и 95% соответственно. Время сероконверсии, т.е. четырехкратного возрастания титра антимикоплазменных антител при последовательном исследовании проб крови, взятых в остром периоде заболевания и в периоде реконвалесценции, обычно составляет 3-8 недель.

4. *Полимеразная цепная реакция (ПЦР)*. Для проведения этой реакции из исследуемого материала выделяют ДНК, в которой определяют наличие специфического для данного микроба гена. ПЦР основан на амплификации, т.е. увеличении количества копий специфического (маркерного) гена возбудителя. Для этого двунитевую ДНК, выделенную из

исследуемого материала, денатурируют (“расплетают” при нагревании) и достраивают, при охлаждении, к расплетенным нитям ДНК новые комплементарные нити, в результате чего из одного гена образуются два. Этот процесс копирования генов многократно повторяется при заданных температурных режимах. Достраивание новых комплементарных нитей ДНК происходит при добавлении к искомым генам праймеров (затравки из коротких однонитевых ДНК, комплементарных 3'-концам ДНК искомого гена), ДНК-полимеразы и нуклеотидов. Денатурация (разрыв водородных связей и трансформация двухцепочечной ДНК в одноцепочечные) осуществляется при температуре 93-95°C в течение 1-3 минут. Присоединение (отжиг) праймеров (олигонуклеотидные генетические затравки) происходит комплементарно к соответствующим последовательностям специфического фрагмента на противоположных нитях ДНК. Температура отжига является специфической для каждой пары праймеров и располагается в интервале 50-65 °С. Точно рассчитанная и экспериментально проверенная величина температуры отжига праймеров является одной из определяющих специфичность реакции характеристик, исключающих присоединение праймеров к не полностью комплементарным последовательностям.

Комплементарное достраивание цепей ДНК (синтез фрагмента). Присоединившиеся праймеры формируют стартовые блоки, с которых начинается синтез ДНК. Комплементарное достраивание нитей ДНК всегда протекает только в направлении от 5'-конца к 3'-концу нити ДНК и происходит в противоположных друг другу направлениях. Образовавшиеся в первом цикле амплификации продукты синтеза служат матрицами для второго цикла амплификации, в результате которого, собственно, и происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК. Начиная с третьего цикла амплификации вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации — это и есть цепная реакция в ПЦР. Температура синтеза ДНК 72 °С, время - 3 мин.

Построение новых нитей ДНК из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) осуществляет термостабильная ДНК-полимераза, т.н. Таq-полимераза в присутствии ионов магния и Tris-HCl — буфера, которые создают необходимые условия для функционирования фермента.

В результате 30-45 циклов амплификации синтезируются $\approx 10^8$ копий фрагмента, что делает возможным визуальный учет результатов после электрофореза в агаровом (полиакриламидном) геле. Использование термостабильной ДНК-полимеразы позволило автоматизировать процесс амплификации с помощью специального прибора, называемого термоциклером или амплификатором. Этот прибор автоматически осуществляет смену температур согласно заданной программе и числу циклов амплификации.

5. Реакция связывания комплемента (РСК) демонстрирует переменную чувствительность (50-90%) и субоптимальную специфичность.

6. Тест холодной агглютинации ввиду его низкой чувствительности и специфичности в настоящее время в клинической практике не используется.

12. Лечение и профилактика

Этиотропная терапия заключается в применении антибиотиков группы макролидов: эритромицин, линкомицин, олеандомицин. Применяются и производные окситетрациклина (вибрамицин, доксициклин). Курс 7-10 дней.

Специфическая профилактика не разработана.

Возбудители хламидийной пневмонии

1. Классификация и таксономия

Хламидийная пневмония — инфекционное антропонозное заболевание, характеризующееся явлениями гематогенной диссеминации, общинфекционной интоксикации и отчетливо доминирующим респираторным синдромом (преимущественным воспалительным поражением системы органов дыхания).

Chlamydomphila pneumoniae относится домену *Bacteria*, семейству *Chlamydiaceae*, роду *Chlamidophila*

2. Нозологические формы

Ch.pneumoniae вызывает пневмонию. Патогенными для человека являются еще 2 вида возбудителей, которые ведут к развитию хламидийных инфекций различной локализации: *Ch. trachomatis* и *Ch. psittaci*.

3. Эпидемиология и пути передачи

Четкой сезонности в течение заболевания не наблюдается. Инфекция антропонозная — источником являются больные люди. Пути передачи: воздушно-капельный, аспирационный.

Chlamydomphila pneumoniae малоустойчива во внешней среде, высокочувствительна к обычным дезинфицирующим веществам, действию физических и химических факторов. При 40 °С в транспортной среде сохраняется в течение суток, повторное замораживание и оттаивание действует на *Ch. pneumoniae* губительно.

4. Морфология и тинкториальные свойства

Хламидии — мелкие грамотрицательные кокковидные бактерии размером 250-1500 нм (0,25-1 мкм). Они имеют все основные признаки бактерий: содержат два типа нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), рибосомы, мурамовую кислоту (компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий), размножаются бинарным делением, чувствительны к антибиотикам, характеризуются двухфазным циклом развития, состоящим из чередования функционально и морфологически различных форм — элементарных и ретикулярных телец.

Элементарные тельца — метаболически малоактивные, адаптированные к внеклеточному существованию клетки диаметром 0,2-0,6 мкм. Расширенное периплазматическое пространство придает элементарным телцам возбудителя не сферическую форму, а форму груши. Обладают инфекционными свойствами, антигеноактивны, способны проникать в чувствительную клетку, где и происходит уникальный цикл развития хламидий.

Ретикулярные тельца — метаболически активные, обеспечивающие репродукцию микроорганизма; форма внутриклеточного существования патогена. Они не обладают инфекционными свойствами.

Полный цикл развития *Ch. pneumoniae* занимает 48-72 часа. Внутриклеточные включения *Ch. pneumoniae* (ретикулярные тельца) по морфологии несколько отличаются от таковых других хламидий.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Для выделения культуры *Ch. pneumoniae* использовались 67-дневные куриные эмбрионы (возбудитель наиболее интенсивно размножается в эктодермальных клетках оболочки желточного мешка). Впрочем, затем выяснилось, что этот метод демонстрирует низкую чувствительность. В конечном счете выбор был сделан в пользу перевиваемой линии клеток человека типа He-La, McCoу и Her-2, до того использовавшейся для выделения респираторного синцитиального вируса. Оптимальная температура культивирования +35⁰С.

6. Антигенная структура

Антигенные свойства хламидий представлены общим групповым, родоспецифичным антигеном — липополисахаридный комплекс внутренней мембраны, реактивной половиной которого является 2-кето-3-дезоксооктановая кислота. Оставшаяся антигенная структура представлена белками наружной мембраны OMP-2 (Outer membrane proteins — OMP).

7. Биохимические свойства

Хламидии чрезвычайно адаптированы к внутриклеточному существованию. Почти полное отсутствие биохимического механизма, обеспечивающего энергией, обрекает их на облигатное внутриклеточное паразитирование.

Метаболическая активность хламидий, выделенных из клетки хозяина, выражена слабо. Они не способны синтезировать АТФ и в этом отношении полностью зависимы от клетки, в которой развиваются.

8. Факторы патогенности

- 1). Компоненты поверхности клетки хламидий (подавляют защитные реакции);
- 2). Экзо-и эндотоксины (блокируют фагосома-лизосомальное слияние в фагоцитах).

9. Патогенез

Ch. pneumoniae, как и все виды хламидий, обладает тропизмом к клеткам столбчатого цилиндрического эпителия слизистых оболочек человека, в частности, к эпителию бронхиол, бронхов, альвеолярным макрофагам, моноцитам, эндотелиальным клеткам сосудов. Попав в респираторный тракт, *Ch. pneumoniae* внедряется в клетку-хозяина путем эндоцитоза элементарных телец. В одних случаях тканевые макрофаги фагоцитируют хламидии с помощью псевдоподий, в других — чувствительные клетки инвагинируют участок плазмалеммы с адсорбированным элементарным тельцем в цитоплазму с образованием фагоцитарной вакуоли. Характерной особенностью элементарных телец является способность стимулировать их эндоцитоз чувствительной клеткой и ингибировать слияние лизосом с содержащей хламидии фагосомой (цитоплазматическим включением). Проникшие в клетку фагоцитированные элементарные тельца преобразуются через переходные формы в ретикулярные тельца. Размножаясь путем бинарного деления, ретикулярные тельца преобразуются через переходные формы в элементарные тельца нового поколения, которые путем разрушения инфицированной клетки выходят из нее, поступают во внеклеточную среду и через 48-72 часа инфицируют новые клетки. В цитоплазматическом включении внутри клетки хозяина хламидии не способны самостоятельно окислять глутаминат и пируват, а также осуществлять фосфорилирование и активное окисление глюкозы. Они используют ферментные системы и АТФ клетки хозяина, что обуславливает их метаболическую и энергетическую зависимость от клеток хозяина; в связи с этим хламидии называют «энергетическими паразитами».

Защитная реакция организма-хозяина на начальной стадии инфекции осуществляется при участии клеток моноцитарно-макрофагальной системы. Существуют данные об участии Т-системы в противoinфекционной защите от хламидий. Низкая эндотоксическая активность хламидийного липополисахарида обуславливает скудную тканевую реакцию с формированием слабого ответа со стороны клеток хозяина, а, локализуясь в эпителиальных клетках, хламидийная инфекция индуцирует слабый протективный иммунитет. Существенную роль в защите организма играет поликлональная активация В-лимфоцитов. После инфицирования последовательно образуются антитела классов IgM, IgG и IgA .

В настоящее время установлено, что *Ch. pneumoniae* может вызывать нереспираторные поражения (менингоэнцефалит, синдром Гийена-Барре, реактивный артрит, миокардит), что естественно, требует рассмотрения механизмов, посредством которых они реализуются. *Ch. pneumoniae* могут инфицировать мононуклеары и тем самым диссеминировать из дыхательных путей в другие участки тела. Нахождение хламидий в альвеолярных макрофагах и/или клетках эндотелия сосудов также способствует их выходу в кровь с последующей циркуляцией. При этом структурные компоненты хламидий, в частности полисахариды, индуцируют синтез цитокинов, что приводит к хроническому воспалению сосудистого эндотелия.

Под влиянием трансформирующих агентов (бета-лактамов антибиотиков и др.) в цитоплазме клеток появляются аномальные формы хламидий, морфологически сходные с L-формами, что было установлено на лабораторных моделях персистентной хламидийной инфекции. В таком состоянии микроорганизм становится менее чувствительным к антибиотикам. Так как L-подобные формы образуются из неинфекционных форм — ретикулярных телец, то они не могут быть диагностированы с помощью классических биологических тестов. Однако при активации персистентной инфекции чувствительность к антибиотикам у этих форм восстанавливается.

10. Иммунитет

Перенесенное заболевание не оставляет прочного иммунитета.

11. Методы лабораторной диагностики

1) Определенное распространение в клинической практике получил метод иммунофлюоресценции с целью прямого обнаружения *Ch. pneumoniae*.

2) Реакция связывания комплемента (РСК) с использованием липополисахаридного антигена. Вероятный диагноз пситтакоза как раз и основывался на результатах этого теста.

Однако при проведении РСК невозможно дифференцировать *Ch. trachomatis*, *Ch. psittaci* и *Ch. pneumoniae*. Более того, при острой *Ch. pneumoniae* — инфекции РСК оказывается положительной только в 30% случаев.

3) В настоящее время «золотым стандартом» серологической диагностики является **тест микроиммунофлюоресценции (МИФ)**, продемонстрировавший высокую чувствительность и специфичность в сравнении с референс-методом диагностики (выделение культуры возбудителя). Этот метод позволяет идентифицировать специфические иммуноглобулины G, A и M. Обычно вначале проводят определение IgG, предварительно этим тестом определяют IgM. Таким образом, исключается ложноположительное определение IgM в случаях наличия ревматоидного фактора, особенно у пожилых пациентов.

4) Свидетельствами активной хламидийной инфекции являются четырехкратное нарастание титров IgG или IgA в парных сыворотках крови, взятых с 2-4-недельным интервалом в остром периоде заболевания и в периоде реконвалесценции, или однократно определяемый высокий титр антихламидийных антител (например, IgG \geq 1:512).

5) ПЦР позволяет осуществить быструю диагностику, что может в части случаев оказаться полезным в плане выбора соответствующей антимикробной химиотерапии.

12. Лечение и профилактика

Основной принцип лечения — это антибиотикотерапия. Препаратами выбора являются макролиды и тетрациклины. Курс 7-14 дней.

Специфическая профилактика не разработана.

Возбудители легионеллезной пневмонии

1. Классификация и таксономия

Легионеллезная пневмония — острое респираторное заболевание, для которого характерна общая интоксикация, лихорадка и развитие тяжелой пневмонии.

Legionella pneumophila относится к семейству *Legionellaceae*, порядку *Legionellales*, классу *Gamma Proteobacteria*, роду *Legionella*.

2. Нозологические формы

Других патогенных видов не обнаружено.

3. Эпидемиология и пути передачи

Пути передачи: воздушно-капельный и воздушно-пылевой. Легионеллез — это сапронозная инфекция, то есть главным местом обитания легионелл являются абиотические объекты окружающей среды. Резервуар возбудителя — это вода и почва, в природе легионеллы обнаруживаются в пресных водоемах как симбионты сине-зеленых водорослей или паразиты некоторых организмов. Оптимальная для размножения легионелл температура внешней среды — это 40-60°C. Легионелла высевается из жидкостей кондиционеров, промышленных и бытовых систем охлаждения, бойлерных и душевых установок, оборудования для респираторной терапии. Таким образом, легионеллез является и техногенной инфекцией.

4. Морфология и тинкториальные свойства

L. pneumophila представляет собой подвижные (имеется жгутик, расположенный монотрихально) прямые или слегка искривлённые грамтрицательные палочковидные бактерии размером 3 x 0,5-0,7 мкм. Спор и капсул не образуют. На препаратах располагаются одиночно и небольшими скоплениями.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Факультативный анаэроб, растёт в куриных эмбрионах, культурах клеток человека и обогащённых питательных средах (казеиново-угольный агар, казеиново-дрожжевой агар, агар ВСУЕ-α). Необходимыми факторами роста являются цистеин и железо. Не растёт на простых питательных средах. Оптимальная температура роста-35-37°C, на искусственных питательных средах развивается медленно. Колонии округлые, выпуклые с лёгкой опалесценцией.

6. Антигенная структура

Выделяют тип-и группоспецифические Ag (47 серогрупп), выявляемые с помощью антисывороток, меченных флюоресцеинами. В зависимости от O-Ag различают 7 серогрупп *L. pneumophila*.

7. Биохимические свойства

Аэробы. Оксидаза-и каталаза-положительны. Гидролизуют гиппурат натрия и желатин. Из углеводов ферментируют только крахмал. Не восстанавливают нитраты. Не разлагают мочевины

8. Факторы патогенности (см. табл 20)

Таблица 20. Факторы вирулентности *Legionella pneumophila*

Состояние и факторы вирулентности	Биологический эффект
Факультативный внутриклеточный паразитизм	Поражение альвеолярных макрофагов и моноцитов; ингибирование фаголизосомального слияния при фагоцитозе.
Главный белок наружной мембраны (порин)	Видоспецифический белок, необходимый для связывания СЗ-рецепторов макрофага, обладает иммуногенными свойствами
Цитолизин, или главный секреторный белок	Zn-металлопротеаза с цитотоксической и гемолитической активностью
Липополисахарид	Эндотоксин
Главный белок цитоплазматической мембраны	Белок теплового шока
Легиолизин	Гемолизин, образующий коричневый пигмент на тирозин-содержащей среде
Протеолитические ферменты: фосфатаза, липаза, нуклеаза	Разрушение клеток хозяина
Возможность нахождения и размножения в амебах	Длительное сохранение во внешней среде

9. Патогенез

Воротами инфекции является слизистая оболочка респираторного тракта. Проникновение возбудителя в организм происходит при вдыхании водных аэрозолей (душ, кондиционеры воздуха, ванна, ультразвуковые распылители воды, увлажнители систем искусственной вентиляции легких, фонтаны и т. п.). Несмотря на то, что в мокроте больных обнаруживаются легионеллы, фактов передачи инфекции от человека к человеку не установлено. Большинство случаев заболевания легионеллезом связано с поражением легких. Легионеллы прикрепляются к альвеолярным макрофагам нижних дыхательных путей через рецепторы комплемента и засасываются в их лизосомы, таким образом предотвращая свою гибель, и размножаются свободно в кислой среде. Патологические изменения охватывают, как правило, не менее одной доли легкого и протекают в виде сливной пневмонии. Воспалительный процесс распространяется на терминальные бронхиолы и альвеолы (более крупные бронхи обычно интактны). В зоне поражения обнаруживается массивная экссудация полиморфоядерных нейтрофилов и макрофагов с явлениями интенсивного лизиса лейкоцитов, накопление ядерного детрита и фибрина. Отмечается также выраженный отёк интерстициальной ткани. Тот факт, что курильщики сигарет более чувствительны к инфекции, чем некурящие люди, позволяет предположить, что определённую роль в развитии болезни может играть нарушение функции альвеолярных макрофагов. Предполагается, что эти явления связаны с выделением легионеллами токсинов, обуславливающие другие клинические проявления болезни. Следует отметить, что все описанные изменения не являются патогномичными для легионеллеза и встречаются при пневмониях другой этиологии.

10. Иммуитет

Повторные заболевания и рецидивы не известны. Постинфекционный иммунитет пожизненный.

11. Методы лабораторной диагностики

L. pneumophila чрезвычайно трудный для культивирования микроорганизм. Для выделения культуры возбудителя используют специальные среды, содержащие L-цистеин

(среда Мюллера-Хинтона, угольно-дрожжевой агар и др.). Посевы инкубируют при температуре 35⁰С в присутствии 3-5% СО₂ 3-5 дней.

1. *Тест прямой иммунофлюоресценции* наиболее популярен в клинической практике. Он очень быстр в выполнении, но его чувствительность переменна и относительно невысока (18–75%). Спустя 4–6 дней после начала адекватной антибактериальной терапии определение антигена становится невозможным.

2. Антиген *L.pneumophila* может быть также обнаружен в моче радиоиммунологически, с использованием ИФА или в реакции латексной агглютинации. Однако следует иметь в виду, что легионеллезный антиген может персистировать в течение многих месяцев после выздоровления, а ИФА пригоден только для идентификации *L. pneumophila* 1-ой серогруппы.

3. *Непрямая иммунофлюоресценция, ИФА и микроагглютинация.* В типичных случаях сероконверсия (четырёхкратное нарастание титра специфических антител) наблюдается через 4-8 недель, однако у лиц старших возрастных групп этот временной интервал может достигать 14 недель. Следует также учитывать тот факт, что 20-30% пациентов, переносящих острую легионеллезную инфекцию, не демонстрируют нарастания титра антител. ИФА характеризуется высокой специфичностью (95%) и приемлемой чувствительностью (85%) при определении специфических IgG и IgM. Описываются отдельные наблюдения перекрестных реакций с *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia/Chlamydophila spp.*, *Mycoplasma pneumoniae* и *Campylobacter spp.*

12. Лечение и профилактика

Основной принцип — это антибиотикотерапия, с применением препаратов, способных к внутриклеточной пенетрации и аккумуляции: макролиды, рифампицины и тетрациклины. Курс 7-14 дней.

Специфическая профилактика не разработана.

III. План практической работы

1. **Заполнить таблицу: «Основные свойства возбудителей атипичной пневмонии».**

2. **Изучить характер роста пневмонийной микоплазмы на питательной среде.**

Описать культуральные свойства колоний, зарисовать.

Культивируются микоплазмы на сывороточном агаре с добавлением ацетата таллия, для подавления сопутствующей микрофлоры. В питательные среды необходимо вносить нативную сыворотку, холестерин, нуклеиновые кислоты, углеводы, витамины и различные соли (оптимум рН — 6,8-7,4). Микроорганизм растет крайне медленно, 7-14 сут. (температурный оптимум — 36-37⁰). На плотных питательных средах образуют мелкие полупрозрачные колонии с приподнятым зернистым центром, придающим им вид «яичницы-глазуньи».

3. Выписать этапы проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для проведения этой реакции из исследуемого материала выделяют ДНК, специфичную для данного микроба.

1 этап: денатурация ДНК (расплетение двойной спирали). Протекает при 93-95⁰С течение 30-40 сек.

2 этап: присоединение праймеров (отжиг). Присоединение праймеров (праймеры — синтетические олигонуклеотиды) происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50-65⁰С. Время отжига — 20-60 сек.

3 этап: достраивание цепей ДНК. Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой) и проходит при температуре 70-72⁰С. Время протекания синтеза — 20-40 сек.

4 этап: Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона).

5 этап: В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом происходит накопление ампликонов в растворе по формуле 2^n , где n — число циклов амплификации.

6 этап: проведение достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

4. Учет РПГА с «парными» сыворотками в диагностике хламидийной пневмонии.

Данный серологический метод диагностики используют для выявления противохламидийных антител в сыворотке крови больного.

Компоненты реакции: исследуемые сыворотки пациента (материал берется на конец 1-й — начало 2-й и конец 3-й — **начало 4-й недель с момента заболевания**, хламидийный эритроцитарный диагностикум и фосфатный буфер.

Для постановки «парные» исследуемые сыворотки титруют в лунках фосфатным буфером от 1:50 с двукратным увеличением титра. Для создания контроля в последнюю лунку вносят 0,5 мл хламидийного эритроцитарного диагностикума на фосфатном буфере. После добавления во все лунки одинакового количества хламидийного эритроцитарного диагностикума проводят инкубацию в термостате при температуре 37°C 30 минут. Положительным результатом является гемагглютинация в лунках (осадок в виде красного «зонтика»). Учет результатов реакции производят путем установления нарастания антител в «парных» сыворотках (нарастание титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой в 4 и более раза является положительным результатом).

Заключение: отмечается нарастание титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой в 4 раза, что является признаком «свежего» инфекционного процесса.

5. Разобрать схему постановки и учесть РСК в серодиагностике хламидийной пневмонии.

Метод диагностики: серологический — используют для выявления противохламидийных антител в сыворотке крови больного.

Компоненты: исследуемая сыворотка больного человека (в которой ищут антитела к возбудителю хламидийной пневмонии), хламидийный диагностикум (взвесь убитых *Chlamydophila pneumoniae*), система комплемента в рабочей дозе и гемолитическая система (состоящая из гемолитической сыворотки кролика и эритроцитов барана), физиологический раствор.

Постановка в рабочую пробирку вносят исследуемую сыворотку больного человека в титре 1:40, хламидийный диагностикум, комплемент в рабочей дозе. Контроли: 1 пробирка — контроль сыворотки больного. В тест-системе находятся сыворотка больного, комплемент и физиологический раствор; 2 пробирка — контроль комплемента: хламидийная диагностическая сыворотка, хламидийный диагностикум и комплемент; 3 пробирка — контроль диагностикума: хламидийный диагностикум, комплемент и физиологический раствор.

После инкубации опытной и контрольных пробирок в течение 30-40 минут при температуре 37°C в них добавляют гемолитическую систему и снова инкубируют 40 минут при температуре 37 °C.

Учет реакции начинают с контролей.

1 контроль сыворотки больного — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Комплемент не связался в тест-системе с компонентами сыворотки, т.к. нет комплекса Аг-Ат, поэтому после добавления гемолитической системы в присутствии свободного комплемента произошел гемолиз эритроцитов. Контроль правильный.

2 контроль комплемента — гемолиз отсутствует, на дне пробирки осадок эритроцитов. В тест-системе составлен заведомо положительный комплекс Аг-Ат, и комплемент в рабочей дозе полностью с ним связался без остатка. При добавлении гемолитической системы в отсутствие комплемента гемолиза не происходит, и эритроциты выпадают в осадок. Контроль правильный.

В случае передозировки комплемента в данной пробирке произойдет гемолиз.

3 контроль диагностикума — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Комплемент не связался в тест-системе с антигенами диагностикума, т.к. нет комплекса Аг-Ат, поэтому после добавления гемолитической системы в присутствии свободного комплемента произошел гемолиз эритроцитов. Контроль правильный.

Опытная пробирка: положительная реакция «+» — пробирка с ровным осадком в виде «красной пуговки», гемолиз отсутствует (возбудитель хламидийной пневмонии и антитело образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент, т.е. происходит связывание комплемента комплексом Аг-Ат. При добавлении гемолитической системы гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет, т.к. комплемент весь израсходован на формирование первоначального иммунного комплекса. Отрицательная реакция «-» — содержимое пробирки равномерно красного цвета («лаковая кровь») — гемолиз эритроцитов. Если антиген и антитело не соответствуют друг другу, т.е. в исследуемом образце нет антитела, комплемент остается свободным и присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело (гемолитическая система), вызывая гемолиз.

Заключение: Исследуемая сыворотка содержит антитела к возбудителю хламидийной пневмонии.

6. Заполнить таблицу по факторам вирулентности возбудителя легионеллезной пневмонии.

IV. Примеры ситуационных задач

Ситуационная задача

Больной 60 лет, заядлый курильщик, в рабочей комнате имеется кондиционер, обратился к врачу с жалобами на общую слабость, анорексию, заторможенность, упорные головные боли, непродуктивный кашель, высокую температуру (38,5⁰С) и одышку. Болен 3 дня. При осмотре выявлены локальная крепитация, бронхиальное дыхание, укорочение перкуторного звука, при рентгеноскопии — зоны затемнения в пределах одной доли легких. Определить возбудителя пневмонии:

- 1) *Mycoplasma pneumoniae*
- 2) *Legionella pneumophila*
- 3) *Chlamydia pneumoniae*
- 4) *Streptococcus pneumoniae*

Перечислить пути передачи установленной инфекции:

- 1) *Воздушно-капельный*
- 2) *Пищевой*
- 3) *Воздушно-пылевой*
- 4) *Контактно-бытовой*

Выбрать питательные среды, используемые для культивирования возбудителя установленной инфекции:

- 1) *Кровяной МПА*
- 2) *Среда Мюллера-Хинтона*
- 3) *Среда Борде-Жангу*
- 4) *Угльно-дрожжевой агар*
- 5) *Клетки культуры ткани*

ТЕМА: Микробиологическая диагностика трансмиссивных заболеваний: сыпной тиф (эпидемический и эндемический), Ку-лихорадка, возвратный тиф, клещевой боррелиоз (болезнь Лайма)

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ знать: основные биологические свойства возбудителей, признаки патогенности, патогенез заболевания, особенности иммунитета, микробиологическую диагностику, специфическую профилактику и лечение

уметь: учитывать и делать заключение по реакциям в диагностике данных заболеваний: развернутой РА, РПГА, РСК

Задание на дом:

1. Вопросы для самоподготовки:

- 1) Характеристика биологических свойств возбудителя и особенности микробиологической диагностики сыпного тифа: эпидемического и эндемического (крысиного)
- 2) Характеристика биологических свойств возбудителя и особенности микробиологической диагностики Ку-лихорадки
- 3) Характеристика биологических свойств возбудителя и особенности микробиологической диагностики возвратного тифа
- 4) Характеристика биологических свойств возбудителя и особенности микробиологической диагностики клещевого боррелиоза (болезни Лайма)

Риккетсиозы

Семейство *Rickettsiaceae* отдела *Gracilicutes* объединяет группу грамотрицательных бактерий, облигатных внутриклеточных паразитов, поражающих человека, теплокровных животных, птиц и членистоногих. Своё название бактерии получили в честь американского бактериолога Х. Риккетса, погибшего при изучении возбудителя сыпного тифа. Вызываемые ими заболевания известны как риккетсиозы; среди них выделяют группы тифов и пятнистых лихорадок, лихорадку цуцугамуши, Ку-лихорадку и траншейную лихорадку.

Таксономия риккетсий основывается на сравнении фенотипических, в том числе антигенных характеристик, клинико-эпидемиологических особенностях болезней, а также молекулярно-генетических данных, присущих отдельным представителям риккетсии. До недавнего времени семейство риккетсии включало роды *Rickettsia*, *Orientia*, *Ehrlichia* и *Coxiella*. По современной классификации (Е. П. Лукин, А. А. Воробьев, А. С. Быков, 2001), семейство *Rickettsiaceae* относится к классу *Alphaproteobacteria* (альфа-1 протеобактерии) и включает три рода: *Rickettsia*, *Orientia*, и *Ehrlichia*. Род *Coxiella* исключен из семейства *Rickettsiaceae* и отнесен к гамма-протеобактериям (близкое родство к легионеллам).

Сохранилось клинико-эпидемиологическое деление риккетсий по связи с переносчиком. Выделена группа болезней, передающихся вшами и блохами (сыпной и крысиный тиф), клещами (группа клещевых лихорадок, эрлихиозы, ориенции). Резервуаром и переносчиком риккетсиозов являются клещи, вши и блохи. Многие виды риккетсий постоянно обитают в клещах различных видов, сохраняя их многие годы путем трансвариальной передачи из поколения в поколение. В значительных количествах риккетсии выделяются с фекалиями переносчиков в окружающую среду. Таким образом, формируются очаги риккетсий и риккетсиозов.

Риккетсии эпидемического сыпного тифа

1. Таксономия и классификация

Возбудитель — *R. prowazekii*, открытый С. Провачеком в 1915 г., является типичным представителем возбудителей группы сыпного тифа, относится к роду *Rickettsia* семейства *Rickettsiaceae* подгруппы альфа-1 протеобактерий; паразитирует только в цитоплазме чувствительных клеток.

2. Нозологические формы

Возбудителем эпидемического сыпного тифа и болезни Брилля—Цинссера является *R. prowazekii*.

Эпидемический сыпной тиф (син. вшивый, голодный, тюремный, военный и т. д.) — острый антропоноз с трансмиссивным механизмом распространения платяными вшами. В отсутствие переносчика неконтагиозен. Клинически характеризуется лихорадкой, тяжелым течением в связи с поражением кровеносных капилляров с нарушением кровоснабжения жизненно важных органов (мозг, сердце, почки), появлением розеолезной и петехиальной сыпи. Природный резервуар отсутствует. В России резервуар практически ликвидирован (регистрируются единичные случаи).

Болезнь Бриля (син. рецидивный, повторный, спорадический сыпной тиф). Получила название по фамилии нью-йоркского врача Н. Брилля, впервые описавшего данную разновидность риккетсиоза Провачека в 1910 г. Впоследствии этот же риккетсиоз изучил Цинссер. Представляет собой не что иное, как рецидив (спустя 3 года — 60 лет) после ранее перенесенного эпидемического сыпного тифа. Возбудитель тот же — *R. prowazekii*. Характерны эпизодический характер (обычно при отсутствии педикулеза), стертая клиническая картина, трудность выделения возбудителя из крови и наличие выраженных серологических реакций с Ag риккетсии Провачека.

Больные данной формой неоднократно служили источником внутрисемейных и нозокомиальных вспышек эпидемической формы сыпного тифа. Встречаются среди людей на территориях, некогда затронутых эпидемиями вшивого тифа. В России в последние десять лет регистрируется ежегодно на уровне 30-60 случаев среди лиц старших возрастных категорий (40—60 лет и старше), перенесших эпидемическую форму сыпного тифа в годы Великой Отечественной войны и первые послевоенные годы.

3. Эпидемиология и пути передачи

Заболевание распространено повсеместно. Сыпной тиф известен с древних времен. Обширные эпидемии сыпного тифа сопровождали голод, войны, экономические и другие потрясения. В России в период 1918-1920 гг. сыпным тифом переболело около 20 млн человек. В настоящее время в нашей стране регистрируются единичные случаи сыпного тифа. Эндемические районы сохранились на высокогорных плато Эфиопии, Бурунди и, возможно, Перу.

Резервуар возбудителя — больной человек; переносчик — платяная вошь. Платяные вши, передающие возбудителей сыпного тифа, выступают лишь как трансмиссанты риккетсий, но не их хранители. В этом случае резервуаром, хранителем риккетсий является человек. Заражение риккетсиями сыпного тифа при укусе инфицированной платяной вошью происходит исключительно путем втирания фекалий вшей, содержащих огромное количество возбудителя, через расчески на коже.

Заражение человека риккетсиями возможно также путем вдыхания аэрозолей, содержащих возбудителей (например, высохшие фекалии клещей, вшей).

Риккетсии относительно малоустойчивы к воздействию внешних факторов (температура, влажность, ультрафиолетовое и другие виды излучений), а также к дезинфектантам. Однако могут длительно сохраняться в высушенном состоянии, а также переживать в организме переносчиков (клещи, вши). *R. prowazekii* могут сохраняться в фекалиях вшей до 10 лет. Легко инактивируется под влиянием положительных температур и дезинфектантов (растворы щелочи, хлорамина, первомура и др.);

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Риккетсии представляют собой мелкие короткие палочки размером 0,2/0,5х0,8/2 мкм, могут иметь кокковидную или нитевидную (до 40 мкм) форму. Размножаются бинарным делением. Грамотрицательные. Для риккетсий характерен мощный слизистый и микрокапсулярный слой. У всех морфологических форм риккетсий имеются трехслойная клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, внутриплазматические включения и вакуоли. Риккетсии неподвижны, но имеют фимбрии и пили. Последним приписывают функции конъюгационного канала, участвующего в передаче генетической информации.

Риккетсии не окрашиваются обычными бактериальными красителями, но окрашиваются по Романовскому-Гимзе и по Здродовскому. При окраске по Романовскому-Гимзе риккетсии имеют голубовато-пурпурный цвет и расположены в протоплазме клеток.

При окраске по Здродовскому ярко-красные бактерии расположены на голубом фоне, все риккетсии могут быть выявлены методом серебрения.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Риккетсии не растут на искусственных бактериальных средах. Для их культивирования используют развивающиеся куриные эмбрионы, культуры клеток, членистоногих переносчиков или чувствительные животные.

Для культивирования риккетсий в культурах клеток используют культуры фибробластов белых мышей, почек сирийских хомячков, почек зеленых мартышек, а также клеток эндотелия пупочной вены человека и животных. Культивирование возбудителей риккетсиозов в организме членистоногих (платяные вши человека, блохи крыс, иксодовые клещи) сохранило значение для исследовательских целей. Возбудитель обладает гемолитическими свойствами, способен формировать негативные колонии («бляшки») в культуре клеток; вызывает токсикоз в организме чувствительных биомоделей (белые мыши, морские свинки и др.) и человека.

6. Антигенная структура

Антигенность риккетсий обусловлена гликопротеинами и ЛПС, входящими в состав клеточной стенки. При этом спектр антигенных детерминант между отдельными представителями риккетсий настолько близок, что их нельзя идентифицировать с помощью поликлональных антител. ЛПС некоторых риккетсии (например, Провачека) имеют общие антигены с протеем. Поэтому для дифференциации риккетсии используют моноклональные антитела. Имеет общие антигены с риккетсиями Музера и протеем ОХ 196.

7. Биохимические свойства

Недостаточно изучены

8. Факторы патогенности

Факторами патогенности у риккетсии служат фимбриии и пили, ЛПС клеточной стенки, некоторые поверхностные белки, фосфолипаза А₂; экзотоксин риккетсии не образуют.

Риккетсии Провачека и Риккетса обладающие собственной фосфолипазой А₂, играющей ключевую роль в процессе инфицирования клеток. Предполагается, что риккетсии получают из инфицированной клетки достаточный баланс метаболических посредников и определенное количество энергии. В отличие от хламидий, т. е. также облигатных внутриклеточных паразитов, они независимы от энергетического обмена клетки-мишени или от ее макромолекулярного синтеза, подобно вирусам.

9. Патогенез

Платяная вошь заражается при сосании крови больного. Риккетсии проникают в эпителий кишечника вши, где и размножаются. Выход дочерних популяций сопровождается гибелью клеток кишечника и попаданием огромного числа бактерий в его просвет. Перед очередным кровососанием вши опорожняют кишечник и риккетсии попадают на кожные покровы. Заражение реализуется либо втиранием фекалий инфицированных вшей через расчески кожи, либо путем вдыхания пылевидного аэрозоля из высохших инфицированных риккетсиями фекалий. Заражающая человека доза очень мала и составляет 1/50—1/100 ID₅₀ для морских свинок.

С помощью пилей или крупных протеинов внешней оболочки риккетсии прикрепляются к клетке-мишени (эндотелию, эритроциту, макрофагу и др.), затем с помощью собственной фосфолипазы действуют на липиды внешней мембраны клетки и разрушают ее. Освобождающаяся при этом арахидоновая кислота конвертирует в физиологически активные соединения (простагландины и лейкотриены), которые изменяют проницаемость и тонус сосудов. Риккетсии же через дефекты в клеточной стенке уже через несколько минут проникают внутрь клетки, где формируется пузырек-фагосома, с находящимися в нем риккетсиями. В результате нескольких циклов деления (один цикл—8—14ч) в течение 72—96 ч, после заражения возникает популяция возбудителя численностью до 1000 бактерий в одной пораженной клетке. Переполненная риккетсиями вакуоль «лопается» подобно грибу-дождевику, риккетсии выходят за пределы клетки,

попадают в лимфу, кровь и распространяются по всему организму, поражая новые клетки-мишени.

Возможен также выход риккетсий из клетки путем «почкования», при котором риккетсии «одеваются» в клеточную оболочку «хозяина».

Для риккетсии характерна персистенция, т. е. длительное переживание в организме, не вызывая патологического процесса, что обусловлено переходом бактерий в L-форму, или антигенной мимикрией, или же экранизацией, вследствие покрытия поверхности риккетсий иммуноглобулином. Все это может приводить к рецидивам болезни, например рецидиву сыпного тифа (болезни Брилла—Цинссера).

Поскольку при риккетсиозах поражаются высокоспециализированные клетки (эритроциты, макрофаги, эндотелий), выполняющие физиологические, биохимические, опорные функции, связанные с обменом, регулированием тонуса и проницаемости сосудов, системой циркуляции и антикоагуляции крови, репарацией сосудов, особенно микрокапилляров, происходит дезорганизация и нарушение морфологической целостности выполняемых ими функций, особенно в системе свертывания крови. Морфологически это выражается в образовании периваскулитов, кровоизлияний, тромбоза капилляров, т. е. возникает панваскулит. Одновременно нарастает количество физиологически активных веществ (эйкозаноидов) типа простагландинов, лейкотриена, фактора Хагемана и др., что ведет к нарушению регуляции системы коагуляции — антикоагуляции крови, изменению проницаемости и тонуса сосудов, появлению застойных явлений и нарушению кровообращения в различных органах.

Инкубационный период варьирует, составляя в среднем 10-14 дней. Начало заболевания острое, клинические проявления обусловлены генерализованным поражением системы эндотелиальных клеток кровеносных сосудов в микроциркуляторной их части, что приводит к нарушению каскада тромбо-антитромбообразования, содержания кининов и других эйкозаноидов, повышению продукции некоторых цитокинов и нарушениям в системе комплемента. Морфологическую основу болезни составляет генерализованный десквамативно-пролиферативный панваскулит с формированием розеолезной и петехиальной сыпи на кожных покровах. Болезнь протекает тяжело, с высокой температурой, симптомами поражения сердечно-сосудистой и нервной систем (падение артериального давления, бред, психоз и т.д.). Клинические проявления инфекционно-токсического синдрома у больных риккетсиозами не отражают видовой принадлежности риккетсий, т. е. не имеют патогномичных симптомов и признаков. Субъективно болезнь сопровождается развитием лихорадки с появлением озноба, недомогания, болей в мышцах и суставах. Объективно развивается гипертермия, гипотония, сыпь (как следствие нарушения проницаемости стенок кровеносных сосудов и нарушения гомеостаза); развиваются десквамативно-пролиферативные воспалительные процессы, геморрагические проявления не только в коже, но и во внутренних органах, прежде всего головном мозге, сердце, почках, печени, легких, что ведет к недостаточному кровоснабжению и нарушению функции этих органов.

При тяжелых формах риккетсиозов развиваются осложнения с явлениями диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Вследствие нарастающей функциональной недостаточности жизненно важных органов (сердце, почки, головной мозг) и активации микрофлоры наступает гибель больных.

При болезни Брилла патоморфология и патофизиология инфекционного процесса те же, что и при эпидемической форме. Различие заключается в эпидемиологии (нет переносчика, отсутствует сезонность проявления, источник и реализация способа заражения) и патогенезе начальной стадии болезни. Она возникает вследствие активации латентно «дремлющих» риккетсий.

10. Иммуитет

Иммуитет — непродолжительный, клеточно-гуморальный.

11. Микробиологическая диагностика

Основана на клинико-эпидемиологических данных и лабораторных исследованиях. Лабораторное подтверждение диагноза играет иногда решающую роль (атипичные, стертые и другие формы болезни). Оно включает способы выявления возбудителя, а также обнаружение специфических антител и антигенов. Обнаружение возбудителя микробиологическими методами проводится до лечения антибиотиками путем введения исследуемого материала (кровь, биопсии из высыпаний на коже и др.) чувствительным к риккетсиям лабораторным животным (белые мыши, крысы, морские свинки, хомяки) или куриным эмбрионам и культурам клеток.

Возможно также иммуногистологическое исследование биоптатов. Разработана также ПЦР. Однако основным методом специфической диагностики риккетсиозов является серологический: определение специфических антител в крови. С этой целью применяют РСК, РА, РИГА, РИФ, ИФА.

Лабораторное подтверждение риккетсиозов возможно лишь на второй неделе болезни. К этому времени у 20-40 % больных выявляются специфические антитела в низких титрах: в РСК— 1:10/1:40; в РИФ — 1:20+1:80; в ИФА-1:500+1:1000. Максимальных величин титры антител достигают на 15-30-е сутки (при отсутствии лечения антибиотиками).

При этом обязательно должны исследоваться «парные» сыворотки, взятые в начале болезни и через 7—14 дней и позже от начала болезни.

При болезни Бриля диагностика затруднена неопределенностью симптоматики на первой неделе заболевания (до появления сыпи) и ее сходством с симптомами при инфекциях, чаще брюшнотифозной. Диагноз устанавливается на основании клинико-эпидемиологических данных с учетом анамнеза больного и подкрепляется серологическим исследованием со специфическим антигеном. При отсутствии переносчика в очаге лечение может осуществляться без изоляции больного, в зависимости от его состояния. Прогноз благоприятен даже в отсутствии лечения антибиотиками — летальность не выше 1 %.

12. Лечение и профилактика

Неспецифические меры профилактики риккетсиозов сводятся к уничтожению переносчиков (вшей, блох, клещей) наиболее эффективным способом (дезинсекция) или к устранению условий для контакта с ними (периодические осмотры на педикулез, на носительство клещей, ношение клещезащитной одежды и др.). Осуществляется изоляция завшивленных больных, их госпитализацию, дезинсекцию и дезинфекцию в очаге. Наиболее эффективны препараты, содержащие перметрин, а также назначение больному бутадиена.

Для специфической профилактики разработана живая вакцина из штамма Е, которая применяется в комбинации с растворимым антигеном риккетсии Провачека (живая комбинированная сыпнотифозная вакцина из штамма "Е"—ЖКСВ-Е), а также инактивированная вакцина из растворимого антигена. Прививки осуществляются подкожно одно-и двухкратно.

Однако вакцинопрофилактика не является основным способом профилактики риккетсиозов, так как заболеваемость ими в отсутствие переносчика обычно не носит массового характера; заболевания неконтагиозны, имеются эффективные средства борьбы с переносчиком, риккетсиозы хорошо лечатся антибиотиками, возможна также химиопрофилактика риккетсиозов.

При всех риккетсиозах эффективны антибиотики тетрациклинового ряда. Препараты пролонгированного действия (доксциклин, миноциклин) оказывают терапевтический эффект уже после однократного или двукратного введения. При отсутствии тетрациклинов возможно применение хлорамфеникола. Профилактическое назначение антибиотиков при риккетсиозах весьма эффективно.

Возбудитель эндемического (крысиного) сыпного тифа

1. Таксономия и классификация

R. typhi — типичный представитель риккетсий группы сыпного тифа с несколько сниженной по сравнению с *R. prowazekii* в отношении человека вирулентностью. Возбудитель обнаружен, выделен и идентифицирован Г. Музером и соавт. в 1926—1928 гг. Относится к роду *Rickettsia* семейства *Rickettsiaceae*; паразитирует внутриклеточно.

2. Нозологические формы

Крысиный (син. эндемический, блошиный, маньчжурский, корабельный, малайский, городской и др.) *сыпной тиф* — острое инфекционное заболевание риккетсиозной природы, связанное с эктопаразитами крыс, мышей и кошек, приуроченное преимущественно к территориям с тропическим и субтропическим климатом, благоприятствующим существованию в природе тропических блох и блох кошек.

Болезнь выделена в самостоятельную форму, отличающуюся от вшивого сыпного тифа, русскими врачами (С. С. Боткиным, С. С. Зимницким и В.А.Барькиным) в 1906—1910 гг. под названием маньчжурский сыпной тиф; окончательная номинация болезни принадлежит Макси (1926).

3. Эпидемиология и пути передачи

Эндемический сыпной тиф — острое инфекционное заболевание, проявляющееся лихорадкой, артралгиями и пятнисто-папулезной сыпью. Заболевание регистрируют повсеместно в эндемичных очагах, обычно портовых городах стран с теплым климатом. Резервуар возбудителя — крысы и мыши, переносчики — блохи, крысиные вши и клещи. В организм человека возбудители попадают через укусы переносчиков. Механизм заражения подобен таковому при эпидемическом сыпном тифе — путем втирания инфицированных фекалий блох через расчески кожи или вдыхания пылевидных частиц из высохших фекалий. Возможно попадание риккетсий с испражнениями на слизистые оболочки глаз, верхних дыхательных путей, а также алиментарным путем — через продукты зараженные мочой больных грызунов.

Инфекция в отсутствие блох неконтагиозна, заболеваемость носит преимущественно спорадический характер с незначительным подъемом в осенне-зимнее время. Болезнь широко распространена в странах тропического и субтропического пояса (Китай, Индия, Индонезия, Эфиопия, страны Средиземного моря, юго-запад США, Мексика и др.). В бывшем СССР очаг крысиного риккетсиоза существовал в Аджарии (г. Батуми) и в Азербайджане; в России риккетсиоз отсутствует. Стойкие очаги инфекции частично совпадают с очагами чумы, что объяснимо общностью переносчика. Инфицированность блох *R. typhi* достигает 7—18 %.

4. Морфологические, тинкториальные, культуральные, антигенные характеристики идентичны таковым для возбудителя вшивого сыпного тифа.

5. Патогенез

Патогенез болезни сходен с таковым при риккетсиозе Провачека, отличается более умеренными морфологическими изменениями в пораженных органах и микроциркуляторном русле сосудистой системы. Первичный аффект на месте входных ворот инфекции отсутствует.

При клещевых риккетсиозах на участках кожи, соответствующих месту присасывания инфицированного клеща, в первые 3—5 дней формируется «первичный аффект» в виде папулы с последующим некрозом в центре, фокусный васкулит и инфильтративно-воспалительная реакция с клеточной инфильтрацией.

Болезнь возникает остро после инкубационного периода в 5—15 дней, сопровождается общими явлениями инфекционного токсикоза (озноб, лихорадка, головная боль, миалгия, недомогание, бессонница и др.), что затрудняет ее диагностику. Характерна сыпь розеолезно-папулезного или макуло-папулезного характера, часто (45—62 %) распространяющаяся на ладони и подошвы. Лихорадочный период при среднетяжелом течении примерно 14 дней. Рецидивы и повторные заболевания не отмечены. У 50% больных отмечают увеличение печени и селезенки. Поражения ЦНС и сердечно-сосудистой системы выражены слабо. После выздоровления развивается стойкая невосприимчивость к повторному заражению, а наличие общих Аг с *R. prowazekii* обуславливает развитие перекрестной невосприимчивости к возбудителям обоих заболеваний.

6. Методы лабораторной диагностики

Диагноз устанавливается на основании клинико-эпидемиологических данных, подкрепляется исследованием сыворотки крови больного в серологических реакциях (РСК, РИГА, РИФ, ИФАи др.). Дифференциация от вшивого сыпного тифа основана на различии (в 2—4 раза) титров антител при постановке реакций с корпускулярными антигенами обеих риккетсий.

7. Лечение и профилактика

Быстрый лечебный эффект достигается при терапии антибиотиками тетрациклинового ряда, в том числе и однократным приемом доксициклина.

Принципы проводимого лечения аналогичны таковым при сыпном тифе. Основа профилактических мероприятий — борьба с грызунами, предупреждение их завоза прибывающими судами, защита пищевых продуктов от загрязнения мочой крыс и повышение социально-гигиенических стандартов жизни населения. По эпидемическим показаниям проводят иммунопрофилактику убитой вакциной.

Коксииеллы — возбудитель лихорадки Ку

1. Таксономия и классификация

Возбудитель — *Coxiella burnetii*, выделен в Австралии от больного человека Ф. Бернетом и М. Фрименом в 1937 г. и независимо от них — в США из лесных клещей *D. Andersoni* Дэвисом и Коксом (1938).

2. Нозологические формы

Лихорадка Ку (син. коксиеллез, устаревшее — пневмориккетсиоз и др.) — зооантропоноз с преимущественно аэрогенным механизмом заражения, характеризующийся лихорадкой, поражением дыхательной системы (пневмонии) и гепатолиенальным синдромом.

Заболевание обособлено в качестве самостоятельного Э. Дерриком в Австралии в 1935 г. Получило название Ку — лихорадки от англ. *quegu* — неясный, неопределенный.

3. Эпидемиология и пути передачи

Резервуар возбудителя — клещи (возможна трансвариальная передача), грызуны, птицы и домашние животные (рогатый скот). Переносчики — иксодовые, аргасовые и гамазовые клещи. Инфекция у клещей бессимптомна, возбудитель передается потомству трансвариально и трансстадийно. Длительное (до 2 лет) сохранение жизнеспособности коксиелл в высушенных фекалиях клещей обеспечивает дополнительный источник инфицирования теплокровных. Наибольшую опасность представляют сельскохозяйственные животные в сезон массового отела и окота (февраль-май), когда в окружающую среду поступает с околоплодными водами большое количество коксиелл. Заражение — аэрогенное — в результате вдыхания аэрозолей, содержащих возбудителя, или пероральное — при употреблении в пищу мясных и молочных продуктов больных животных. Инфицирующая доза при аэрозольном заражении 1—10 коксиелл. Основной путь заражения человека — ингаляционный. Устойчив к факторам внешней среды, длительно сохраняется (месяцами) на контаминированных предметах, требует тщательной дезинфекции.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Имеет более мелкие, чем риккетсии, размеры — порядка 0,25—1 мкм, полиморфен; чаще встречается в форме коккобацилл. Окрашивается в красный цвет при окраске по Здродовскому, в пурпурно-красный — по Романовскому. Внутриклеточный паразит.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Хорошо размножается в клещах, куриных эмбрионах, культурах клеток с накоплением до 10^{10} — 10^{12} ID₅₀. По структуре клеточной стенки отличается от риккетсий наличием (I фаза) или отсутствием (II фаза) в оболочке структурного липополисахарида. Гемолитические свойства не устаноятены, бляшкообразование выражено; вирулентность связана с фазовым состоянием коксиелл — у II фазы она резко снижена. Размножается в фаголизосомах протоплазмы чувствительных клеток.

Риккетсии Coxiella burnetii в большом количестве накапливаются в печени, селезенке и других органах. Иногда у морских свинок после заражения бывает бессимптомное течение инфекции, что заставляет прибегать к постановке серологических реакций с целью окончательной диагностики. Специфичность инфекции удается доказать иногда только через нескольких пассажей. Чистые культуры выделяют путем введения в желточный мешок куриных эмбрионов исследуемого материала.

6. Антигенная структура

Общих антигенов с риккетсиями не имеет: изоляты, выделенные в отдаленных регионах земного шара по генотипическим и серологическим свойствам различий не имеют.

По генотипическим характеристикам номинирован в группе гамма-протеобактерий вместе с легионеллами, возбудителями болезни легионеров, что объясняет полиморфизм клинической картины болезни, устойчивость возбудителя во внешней среде и другие особенности инфекции.

7. Патогенез

Первичными клетками-мишенями для коксии служат гистиоциты и макрофаги (моноклеарные), дополнительно — клетки эндотелиальной системы кровеносных сосудов. Поражение эндотелия рассматривается как вторичное, что обуславливает развитие периваскулитов, но не панваскулита в отличие от риккетсиозов.

Болезнь протекает в острой, подострой или хронической форме. Патогномичных симптомов не имеет; из-за отсутствия характерной клиники болезнь диагностируется, в основном, ретроспективно со значительным опозданием, особенно при подострой и хронической формах.

Инкубационный период варьирует от 10 до 26 суток. На 2-3 сутки начинается лихорадка — температура достигает 39-40°C. Продолжительность лихорадочного периода составляет около 3 недель. Кожные высыпания обычно отсутствуют. Типичны ретробульбарные расстройства и головные боли, артралгии, миалгии. Особенно характерны пневмонии, развивающиеся при ингаляции возбудителя. Образующиеся в легких инфильтраты сохраняются и в раннем периоде реконвалесценции. Осложнения наблюдаются редко, чаще при хронизации инфекции. Наиболее часто выявляют эндо-, мио- и перикардиты, особенно у лиц с клапанными патологиями. Возбудитель способен вызывать оппортунистические инфекции у лиц с иммунодефицитами, в том числе у принимающих стероиды.

8. Методы лабораторной диагностики

Бактериологический метод основан на выделении культуры возбудителя из крови, мокроты, ликвора, грудного молока или мочи больных с использованием тканевых культур. Для постановки биологической пробы используют морских свинок, белых мышей и крыс. У морских свинок через 7 дней после заражения развивается лихорадка.

Серологическая диагностика — наиболее проста, доступна и не менее надежна. Обычно применяют реакцию связывания комплемента и реакцию агглютинации. В РСК с антигеном диагностический титр 1:8—1:16 выявляется с 10-12-го дня болезни (с антигеном II фазы) и достигает максимального значения на 3-4-й неделе болезни (с антигеном I фазы). Комплемент-связывающие антитела в низких титрах выявляются у реконвалесцентов в течение ряда лет.

Надежным методом диагностики является *иммунолюминисцентный метод исследования*.

Для непосредственной и ретроспективной диагностики Ку-лихорадки предложена *внутрикожная проба*. Трудности приготовления стандартного антигена лишают ее практической ценности, хотя при эпидемиологических и эпизоотологических обследованиях эта проба могла бы быть полезной.

Для выявления природных очагов Ку-лихорадки важны массовые исследования клещей и диких животных на возбудителя. Методом флюоресцирующих антител исследуются гемолимфа и кишечник клещей, препараты-отпечатки внутренних органов животных на зараженность *риккетсиями Coxiella burnetti*.

Особенности коксии, связанные с их фазовым состоянием, затрудняют лабораторную диагностику. Последняя осуществляется с применением в серологических реакциях (РСК, РНИФ, ИФА) антигенов I и II фаз коксии. Обнаружение у больного IgG антител к антигену I фазы в титре 1:800 подтверждает хроническую (чаще всего эндокардит) форму болезни.

9. Лечение и профилактика

Препаратами тетрациклинового (тетрацилин, доксицилин, моноцилин) и хинолонового (ципрофлоксацин, офлоксацин и др.) ряда. Лечение хронических форм и осложнений требует длительного, настойчивого комбинированного применения антибиотиков. После выздоровления развивается стойкая невосприимчивость к повторным заражениям.

Существует живая вакцина на основе штамма М-44 (П. Ф. Здродовский, В. А. Гениг) коксиелл Бернета, однако ее применение целесообразно для вакцинации прежде всего сельскохозяйственных животных с целью уменьшения опасности выделения коксиелл в окружающую среду. Вакцинируются сотрудники лабораторий, работающие с коксиеллами. Неспецифическая профилактика сводится к постоянному эпидемиологическому и санитарно-ветеринарному надзору за коксиеллезом в эндемичных районах с последующей выбраковкой больных сельскохозяйственных животных.

Возбудители возвратного тифа

1. Таксономия и классификация

Спирохеты рода *Borrelia* семейство Spirochaetaceae вызывают как антропонозные (возвратный тиф), так и зоонозные (болезни Лайма) инфекционные болезни с трансмиссивным механизмом передачи возбудителей (клещи, вши). Род *Borrelia* включает более 20 видов, большинство из которых непатогенно для человека.

Патогенные для человека боррелии являются возбудителями возвратных тифов (рекуррентных лихорадок) или боррелиозов. *B. recurrentis* передается человеку вшами, вызывает эпидемический или вшивый возвратный тиф. Остальные боррелиозы человека делят на две самостоятельные группы — аргасовые клещевые боррелиозы (АКБ), вызываемые более 12 видами боррелий, и иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ), вызываемые *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* и некоторыми другими. ИКБ связаны с аргасовыми клещами рода *Ornithodoros*, обитающими в тропических и субтропических регионах Африки, Азии, Америки, и характеризуются повторяющимися приступами лихорадки (как при малярии). ИКБ вызывают клещи рода *Ixodes* (группа *I. ricinus* / *I. persulcatus*), распространены преимущественно в лесной зоне в Евразии и Америке.

2. Нозологические формы

Возвратный (вшинный) тиф — острая трансмиссивная инфекция, проявляющаяся рецидивирующими приступами лихорадки и явлениями общей интоксикации. Возбудитель — *B. recurrentis*; открыт О. Обермейером (1868), этиологическая роль подтверждена Г.Н. Минхом и И.И. Мечниковым в опытах с самозаражением.

Возвратные тифы — группа острых инфекционных заболеваний, вызываемых боррелиями, характеризующихся острым началом, приступообразной лихорадкой, общей интоксикацией. Различают эпидемический и эндемический возвратные тифы.

Эпидемический возвратный тиф является антропонозной инфекцией. Единственным источником возбудителя служит лихорадящий больной, в периферической крови которого находятся боррелии. Специфическими переносчиками боррелий являются платяная, головная и, в меньшей степени, лобковые вши, которые становятся наиболее заразными с 6-го по 28-й день после инфицирующего кровососания. Человек заражается возвратным тифом при втирании гемолимфы раздавленных вшей в кожу при расчесывания места укуса. Заболевание встречается во время социальных бедствий, войн. На территории РФ в настоящее время не регистрируется.

Эндемический возвратный тиф (син. клещевой возвратный тиф, аргасовый клещевой боррелиоз) — зоонозное природно-очаговое заболевание, спорадически встречающееся в отдельных субтропических, тропических географических зонах. Возбудителями эндемического возвратного тифа являются более 20 видов боррелий, среди которых наиболее часто вызывают заболевание африканская *B. duttoni* и азиатская *B. persica*. Резервуаром в природе являются грызуны, а также аргасовые клещи, у которых микроб передается трансовариально. Человек заражается через укусы клещей рода *Ornithodoros*.

Возбудителей эпидемического и эндемического возвратных тифов дифференцируют в биологической пробе (морские свинки не чувствительны только к *B. recurrentis*)

3. Эпидемиология и пути передачи

ИКБ — облигатно-трансмиссивные природноочаговые инфекции, распространенные преимущественно в умеренном климатическом поясе северного полушария, лесной ландшафтной зоне и связанные с присасыванием клещей рода *Ixodes*. Очаги ИКБ часто

сопряжены с очагами клещевого энцефалита, поскольку имеют одних и тех же переносчиков в Евразии — клещей *I. reticulatus* (таежный клещ) и *I. ricinus* (европейский лесной клещ).

Долгое время наиболее интенсивным очагом заболевания была Западная Европа (отсюда устаревшее название «европейский тиф»). Затем возбудитель распространился повсеместно в места проживания человека и его паразитов (вши, клопы). Это и дало основание названию «эпидемический возвратный тиф». Резервуар возбудителя — больной человек; переносчики — вши, реже — постельные клопы. Максимальная вероятность заражения наступает через 5–6 сут после кровососания. Заболевание имеет выраженную сезонность — характеризуется подъемами к концу зимы и началу весны. Чувствительны к высушиванию и нагреванию. При действии температуры 45–48 °С гибнут в течение 30 мин. Устойчивы к низким температурам и замораживанию.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Боррелии представляют собой тонкие спирохеты размером 0,3/0,6x2/20 мкм, с 3–10 крупными завитками, спираль имеет неравномерные завитки. Двигательный аппарат представлен 15–20 фибриллами. Размножаются поперечным делением, спор не образуют. Они хорошо воспринимают анилиновые красители, по Романовскому—Гимзе окрашиваются в сине-фиолетовый цвет (но не розовый, как бледные спирохеты). Боррелии обладают уникальным, не имеющим аналогов среди других бактерий генетическим аппаратом, который состоит из небольших размеров линейной хромосомы и набора циркулярных и линейных плазмид.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Представители этого рода взыскательны к условиям культивирования. Для них необходимы факультативно — анаэробные условия, температура плюс 33 градуса Цельсия, специальные среды (BSK-2), содержащие среду 199, глюкозу, альбумин, цистеин, кроличью сыворотку, желатин и другие компоненты. Боррелии могут культивироваться на сложных питательных средах, содержащих сыворотку, асцит, тканевые экстракты, при температуре 28–35 °С в атмосфере с 5–10 % CO₂, а также в куриных эмбрионах при заражении в желточный мешок.

6. Антигенные свойства

Имеют перекрестно-реагирующие антигены с другими спирохетами, родо — и видоспецифические антигены. Выделяют Н-(жгутиковые) флагеллиновые антигены (обладают слабой специфичностью) и поверхностные белковые антигены (OspA, OspC, более специфичны, используют для межвидовой и внутривидовой идентификации).

Антигенный состав подвержен вариациям в процессе жизненного цикла боррелии. При их культивировании на питательных средах и нахождении в организме человека на поздних стадиях заболевания у боррелии преобладает антиген ospA, тогда как при пребывании в клеще и в организме человека на ранних этапах заболевания у них преобладает антиген ospC.

7. Биохимические свойства

Плохо изучены.

8. Факторы патогенности

Липидмодифицированные белки наружной мембраны обеспечивают способность боррелии прикрепляться и проникать в клетки хозяина. В результате взаимодействия боррелии с макрофагами происходит выделение ИЛ-1, который индуцирует воспалительный процесс. Osp A-протеин принимает участие в развитии иммунопатологических реакций, приводящих к развитию артритов. В этом процессе участвует также белок теплового шока, который начинает синтезироваться бактериями при температуре 37°С и который по своей структуре и молекулярной массе идентичен таковому человека.

9. Патогенез

Инкубационный период в среднем 7–8 суток. После присасывания клеща боррелии со слюной попадают в макроорганизм, размножаются во входных воротах инфекции, поражая кожу (эритема) и ближайшие лимфоузлы (фаза первичной адаптации). Преодолев кожный и лимфатический барьеры, боррелии попадают в кровь, вызывают спирохетемию, проявляющуюся общетоксическим синдромом (стадия первичной диссеминации). По мере

прогрессирования процесса боррелии проникают через гематотканевые барьеры (в т.ч.-через гематоэнцефалитический барьер) и вызывают поражение различных органов и систем.

Патогенез и клинические проявления обоих типов возвратных тифов схожи. Попадая во внутреннюю среду организма, боррелии внедряются в клетки лимфоидно-макрофагальной системы — фагоциты, размножаются в их цитоплазме и поступают в большом количестве в кровь, вызывая лихорадку (повышение температуры тела до 39–40 °С), головную боль, озноб. Каждая такая атака заканчивается подъемом титра антител. Взаимодействуя с ними, боррелии образуют агрегаты, которые нагружаются тромбоцитами, вызывая закупорку капилляров, следствием чего является нарушение кровообращения в органах. Большая часть боррелий погибает под влиянием антител. Однако в течение инфекции антигены этих боррелий подвергаются вариации. Это связано с наличием большого набора (несколько десятков) белковых антигенов, синтез которых кодируется разными генами, часть которых периодически находится в неактивной, «молчащей» форме. В результате перегруппировок в хромосоме происходит активация «молчащего» гена и появление нового антигенного варианта. А так как антитела вырабатываются против одного антигена, то новые антигенные варианты боррелий неожиданно появляются и вызывают рецидив заболевания. Часть бактерий депонируется в нервной ткани и создает рецидивную группу бактерий с измененной антигенной структурой. Защитные механизмы, индуцированные первичной спирохетемией, оказываются неэффективными, что запускает синтез нового пула антител. Это может повторяться от 3 до 20 раз. После нескольких приступов образуется пул гетерогенных антител, полностью элиминирующих возбудителя. Прогноз эндемического возвратного тифа благоприятный. Летальность при эпидемическом возвратном тифе — не более 1 %.

10. Иммунитет

Иммунитет к эпидемическому возвратному тифу гуморальный, непродолжительный. В эндемических очагах коренное население к возбудителю эндемического возвратного тифа, циркулирующему в очаге, располагает иммунитетом.

11. Методы лабораторной диагностики

Используют бактериоскопический метод — обнаружение возбудителя в толстой капле крови, взятой на высоте лихорадочной реакции, окрашенной по Романовскому—Гимзе. Также используют дополнительные бактериоскопические исследования: микроскопия в темном поле «висячей капли» крови и негативный метод Бурри, состоящий в просмотре исследуемой капли крови, смешанной с тушью, серебрение боррелий в мазках крови или мазках-отпечатках из органов. Биопробу ставят для дифференциации *B. recurrentis* от возбудителей эндемического возвратного тифа: морские свинки легко заражаются возбудителями клещевого возвратного тифа, а белые мыши и крысы — *B. recurrentis*. В качестве вспомогательного используют серологический метод с постановкой РСК.

Серологический метод: сывороточные антитела обнаруживают в реакции иммобилизации боррелий, либо в реакции нагрузки боррелий тромбоцитами.

Боррелии можно выделить с использованием среды BSK2 у больных из очагов кожных поражений, из крови и спинномозговой жидкости (при менингеальных формах), при исследовании переносчиков (в т.ч. снятых с людей) и теплокровных хозяев (наибольшая высеваемость — из мочевого пузыря) в природных очагах. Боррелии можно выявить в иксодовых клещах с помощью световой микроскопии (окраска по Романовскому — Гимзе), темнопольной и люминесцентной микроскопии, ПЦР.

Основной метод серологической диагностики — реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) с корпускулярным антигеном *B. afzelii*, позволяющим выявлять антитела к боррелиям группы ИКБ.

12. Лечение и профилактика

Применяют предупредительную терапию (при положительных результатах исследования присосавшегося клеща) и лечение больных ИКБ тетрациклинами, пенициллинами и цефалоспоринами.

Специфическая профилактика не проводится. Неспецифическая профилактика сводится к борьбе с завшивленностью населения, в эндемических очагах — с клещами и грызунами. Ввиду формирования нестойкого иммунитета основу профилактики составляют раннее выявление и госпитализация всех больных, дезинсекция вещей больных и жилья, санитарная обработка контактировавших лиц.

Возбудители болезни Лайма

Лаймоборрелиоз (болезнь Лайма) — хроническая трансмиссивная природно-очаговая инфекция из группы иксодовых клещевых боррелиозов. Возбудителем болезни Лайма в Северной Америке является вид *B. burgdorferi*, который впервые был открыт в 1975 г. при обследовании детей, больных артритом, в городке Лайма (Lyme) в США, а в 1982 г. выделен из иксодового клеща У. Бургдорфером. На Евро-Азиатском континенте возбудителями этого заболевания являются *B. garini* и *B. afzelii*. Эти виды различаются между собой по антигенной структуре.

Переносчики на территории РФ — клещи *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*.

Морфология и культуральные свойства

Возбудители болезни Лайма представляют типичные по морфологическим и тинкториальным свойствам боррелии, которые хорошо культивируются на питательных средах при выделении из клещей. Выделить возбудитель из материала от больного (крови, ликвора) удается редко.

Распространение в природе и эпидемиология

Резервуаром возбудителей в природе являются мелкие млекопитающие, главным образом лесные белоплечатые мыши. Заболевание передается человеку через укусы клещей рода *Ixodes* и распространено в ареале обитания этих клещей на территориях Северной Америки, Австралии, Евразии, в том числе в России, преимущественно в летний период. Естественная восприимчивость людей высокая. От человека человеку заболевание не передается. В эндемичных районах до 20-80% членистоногих содержат спирохеты.

Антигенная структура

Возбудители болезни Лайма обладают сложной антигенной структурой. Они имеют *белковые антигены фибриллярного аппарата (p41) и цитоплазматического цилиндра (p93)*, антитела к которым появляются на ранних этапах инфекции, но не обладают защитными свойствами. Протективную активность имеют антигены, представленные липидмодифицированными *интегральными белками наружной мембраны*, обозначаемые как **osp** (*outer surface protein* — англ.) *A, B, C, D, E, F*, детерминация синтеза которых осуществляется группой плазмид. *OspA-антиген* обладает антигенной вариабельностью, подразделяясь на 7 сероваров, и является видоспецифическим.

Антигенный состав подвержен вариациям в процессе жизненного цикла боррелии. При их культивировании на питательных средах и нахождении в организме человека на поздних стадиях заболевания у боррелии преобладает антиген **ospA**, тогда как при пребывании в клеще и в организме человека на ранних этапах заболевания у них преобладает *антиген ospC*.

Факторы патогенности

Липидмодифицированные белки наружной мембраны обеспечивают способность боррелии прикрепляться и проникать в клетки хозяина. В результате взаимодействия боррелий с макрофагами происходит выделение ИЛ-1, который индуцирует воспалительный процесс. *Osp A-протеин* принимает участие в развитии иммунопатологических реакций, приводящих к развитию артритов. В этом процессе участвует также белок теплового шока, который начинает синтезироваться бактериями при температуре 37 °С и который по своей структуре и молекулярной массе идентичен таковому человека.

Патогенез и клиника заболевания

Болезнь Лайма (син. хроническая мигрирующая эритема, клещевой иксодовый боррелиоз) является хронической инфекцией с поражением кожи, сердечной и нервной систем, суставов. Впервые заболевание было описано в 1909 г. Афцелиусом (Afzelius).

После укуса клеща боррелии локализуются в месте внедрения или проникают непосредственно в кровоток. Инвазивная активность микроорганизма достаточно высока.

После экспериментального заражения уже через 12 часов они проникают в различные органы и ткани. Проникают через гематоэнцефалический барьер, в результате чего их можно выделить из спинномозговой жидкости. Длительность инкубационного периода может варьировать от 3 до 32 дней. У 80% пациентов на месте укуса развивается блуждающая эритема в виде овальной или округлой папулы. При локальном поражении развивается симптом блуждающей эритемы, при диссеминированном — поражения опорно-двигательного аппарата, нервной и сердечно-сосудистой системы, вторичные поражения кожи и т.д. Диссеминированные поражения обусловлены циркуляцией боррелий. Развиваются васкулиты с окклюзией сосудов, а также аутоиммунные реакции. Через несколько месяцев или лет поражения суставов приобретают хронический характер. У части больных развиваются менингиты, менингоэнцефалиты, поражения сердечно-сосудистой системы и др.

Заболевание сопровождается развитием аутоиммунных и иммунопатологических процессов. Клиника подразделяется на 3 стадии:

1. Мигрирующая эритема, которая сопровождается развитием гриппоподобного симптомокомплекса, лимфаденита и появлением в месте укуса клеща кольцевидной эритемы, которая быстро увеличивается в размерах.

2. Развитие доброкачественных поражений сердца и ЦНС в виде миокардита и асептического менингита, которые наступают на 4—5-й неделе заболевания и протекают в течение одного или нескольких месяцев.

3. Развитие артритов крупных суставов через 6 недель и более от начала заболевания. Заболевание протекает доброкачественно. Прогноз благоприятный.

Иммунитет

Гуморальный, видоспецифический к антигенам клеточной стенки боррелий.

Микробиологическая диагностика

Используются бактериоскопический, серологический методы и ПЦР в зависимости от стадии заболевания. Материалом для исследования служат биоптаты кожи, синовиальная жидкость суставов, ликвор, сыворотка крови. На 1-й стадии заболевания проводится бактериологическое исследование биоптатов кожи из эритемы.

Начиная со 2-й стадии заболевания осуществляется серологическое исследование определением IgM или нарастания титра IgG ИФА или РИФ.

ПЦР используется для определения наличия боррелий в ликворе, суставной жидкости.

Лечение и профилактика

Этиотропная антибиотикотерапия — антибиотиками тетрациклинового ряда.

Специфическая профилактика не разработана. Не специфическая профилактика сводится к использованию защитной одежды и борьбе с клещами.

III. План практической работы

1. Учесть развернутую реакцию агглютинации в диагностике сыпного тифа, поставленную с риккетсиями Провачека и Музера, зарисовать и сделать заключение.

Метод диагностики: серологический — используют для выявления высоких титров и более выраженного нарастания количества противориккетсиозных антител в сыворотке крови больного и их идентификации.

При учете возможности перекрестных реакций между риккетсиями Провачека с риккетсиями Музера (они имеют общие антигенные характеристики) серологические исследования с этими диагностикумами необходимо проводить параллельно.

Компоненты реакции: исследуемая сыворотка больного человека (в которой определяют антитела к возбудителю эпидемического тифа), риккетсиозные диагностикумы Провачека и Музера (взвесь убитых риккетсий соответствующего вида), изотонического раствора NaCl.

Постановка: В 2-х рядах титруют сыворотку пациента с помощью физиологического раствора от 1:40 (в ряд серологических пробирок предварительно разливают по 2 мл изотонического раствора натрия хлорида. В первую из них доливают 2 мл сыворотки пациента, разведенной 1:40, и, смешав ее, 2 мл переносят во вторую, из второй — в третью и

т.д.). В полученные двукратные разведения сывороток вносят по 1-2 капли риккетсиозных диагностикумов (в первый ряд — Провачека, во второй — Музера). Для создания контролей в предпоследнюю пробирку ряда вносят 2 мл сыворотки на физиологическом растворе и в последнюю — 2 мл смеси риккетсиозных диагностикумов Провачека и Музера на физиологическом растворе. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37°C на 2 часа, затем сутки выдерживают при комнатной температуре (18-20°C).

Учет развернутой реакции агглютинации производят, оценивая последовательно каждую пробирку, начиная с контрольных. Контроль сыворотки больного — жидкость прозрачная, осадка нет. Контроль диагностикума — жидкость прозрачная, на дне осадок в виде белой «пуговки».

Положительная реакция «+» — хлопья агглютината в абсолютной прозрачной жидкости (белый «зонтик»); отрицательная реакция «-» — отсутствие агглютинации (белая «пуговка»).

Диагностический титр реакции 1:100.

Заключение: Исследуемая сыворотка содержит антитела к *R. prowazekii* — возбудителю эпидемического тифа в титре.....

2. Учесть РПГА в диагностике сыпного тифа, зарисовать и написать заключение.

Данный серологический метод диагностики используют для выявления титра противориккетсиозных антител в сыворотке крови больного.

Компоненты реакции: исследуемая сыворотка пациента (материал берется не ранее чем на 7-ой день с момента заболевания), сыпнотифозный эритроцитарный диагностикум и физиологический раствор.

Постановка: В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных разведений исследуемой сыворотки на физиологическом растворе. Для создания контролей в предпоследнюю лунку вносят 0,5 мл сыворотки на физиологическом растворе и в последнюю 0,5 мл — сыпнотифозного эритроцитарного диагностикума на физиологическом растворе. Затем в опытные лунки добавляют по 0,1 мл разведенного сыпнотифозного эритроцитарного диагностикума, встряхивают и помещают в термостат на 2 ч. Положительным результатом «+» является гемагглютинация в лунках (осадок в виде красного «зонтика»), отрицательным «-» — отсутствие гемагглютинации (красная «пуговка»).

Заключение: в исследуемой сыворотке обнаружены антитела к возбудителю сыпного тифа в титре.....

3. Разобрать схему постановки и учесть РСК в серодиагностике Ку-лихорадки.

Метод диагностики: серологический — используют для выявления противококсиеллезных антител в сыворотке крови больного.

Компоненты: исследуемая сыворотка больного человека (в которой определяют антитела к возбудителю Ку-лихорадки), коксиеллезный диагностикум (взвесь убитых коксиелл), комплемент в рабочей дозе и гемолитическая система (состоящая из гемолитической сыворотки кролика и эритроцитов барана), коксиеллезная диагностическая сыворотка и физиологический раствор.

Постановка: в рабочую пробирку вносят исследуемую сыворотку больного человека в титре 1:40, коксиеллезный диагностикум, комплемент в рабочей дозе. Контроли: 1 пробирка — контроль сыворотки больного. В тест-системе находятся сыворотка больного, комплемент и физиологический раствор; 2 пробирка — контроль комплемента: коксиеллезная диагностическая сыворотка, коксиеллезный диагностикум и комплемент; 3 пробирка — контроль диагностикума: коксиеллезный диагностикум, комплемент и физиологический раствор.

После инкубации опытной и контрольных пробирок в течение 30-40 минут при температуре 37°C в них добавляют гемолитическую систему и снова инкубируют 40 минут при температуре 37 °C.

Учет реакции начинают с контролей.

1 контроль сыворотки больного — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Комплемент не связался в тест-системе с компонентами сыворотки, т.к. нет комплекса Ag-At, поэтому

после добавления гемолитической системы в присутствии свободного компонента произошел гемолиз эритроцитов. Контроль правильный.

2 контроль компонента — гемолиз отсутствует, на дне пробирки осадок эритроцитов. В тест-системе составлен заведомо положительный комплекс Аг-Ат, и компонент в рабочей дозе полностью с ним связался без остатка. При добавлении гемолитической системы в отсутствие компонента гемолиза не происходит, и эритроциты выпадают в осадок. Контроль правильный.

В случае передозировки компонента в данной пробирке произойдет гемолиз.

3 контроль диагностикума — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Компонент не связался в тест-системе с антигенами диагностикума, т.к. нет комплекса Аг-Ат, поэтому после добавления гемолитической системы в присутствии свободного компонента произошел гемолиз эритроцитов. Контроль правильный.

Опытная пробирка: положительная реакция «+» — пробирка с ровным осадком в виде «красной пуговки», гемолиз отсутствует (возбудитель Ку-лихорадки и антитело образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется компонент, т.е. происходит связывание компонента комплексом Аг-Ат. При добавлении гемолитической системы гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет, т.к. компонент весь израсходован на формирование первоначального иммунного комплекса. Отрицательная реакция «-» — содержимое пробирки равномерно красного цвета («лаковая кровь») — гемолиз эритроцитов. Если антиген и антитело не соответствуют друг другу, т.е. в исследуемом образце нет антитела, компонент остается свободным и присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело (гемолитическая система), вызывая гемолиз.

Заключение: Исследуемая сыворотка содержит антитела к возбудителю Ку-лихорадки.

4. Нарисовать с таблицы возбудителя возвратного тифа

Возбудителем эпидемического возвратного тифа является *Borrelia recurrentis*. Во время приступа, на высоте лихорадки возбудитель сравнительно легко может быть обнаружен в крови больного. Для этого готовят препараты толстой капли крови, окрашивают по Романовскому — Гимзе и микроскопируют. В поле зрения наряду с эритроцитами, лимфоцитами и сегментоядерными лейкоцитами определяются тонкие спиралевидные микроорганизмы с 3-8 неравномерными завитками с заостренными концами синего цвета.

ТЕМА: Микробиологическая диагностика венерических заболеваний: сифилиса, гонореи, трихомоноза, урогенитального хламидиоза и микоплазмоза

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ знать: классификацию и таксономию, основные биологические свойства, особенности культивирования, факторы патогенности возбудителей сифилиса, гонореи, трихомоноза, урогенитального хламидиоза и микоплазмоза; эпидемиологию; патогенез, микробиологическую диагностику; методы профилактики и особенности терапии венерических заболеваний

уметь: распознавать возбудителей гонореи и трихомоноза в готовых мазках, учитывать результаты реакции Вассермана и РСК, учитывать результаты ИФА в диагностике урогенитального хламидиоза и микоплазмоза

Задание на дом

1. Вопросы для самоподготовки:

- 1) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики гонореи
- 2) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики сифилиса
- 3) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики урогенитального хламидиоза
- 4) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики урогенитального микоплазмоза
- 5) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики трихомоноза

Возбудители гонореи

1. Таксономия и классификация

Neisseria gonorrhoeae — возбудитель гонореи, инфекционного венерического заболевания, проявляющегося воспалением слизистых преимущественно мочеполовых путей. В настоящее время гонорея — одно из наиболее распространённых инфекционных заболеваний.

Neisseria gonorrhoeae относится к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Betaproteobacteria*, порядку *Neisseriales*, семейству *Neisseriaceae*, роду *Neisseria*.

2. Нозологические формы

Гонококковая инфекция — это острое или хроническое инфекционное заболевание человека, которое передается половым путем и характеризуется гнойным воспалением слизистой оболочки мочеполовых путей (гонорея), конъюнктивы глаз (бленнорея), других органов, интоксикацией. Выделяют:

- инфекции нижних отделов мочеполового тракта: цервицит, уретрит (у мужчин и женщин), абсцессы желез, прилегающих к влагалищу (преддверные и парауретральные железы);
- инфекции верхних отделов мочеполового тракта: эндометрит, эпидидимит, воспалительные заболевания тазовых органов (воспаление фаллопиевых труб, яичника и тканей придатков);
- инфекции прочих органов и тканей: проктит (ректальная гонорея), фарингит, бленнорея.

3. Эпидемиология и пути передачи

Термин «гонорея» — гноетечение — ввел Талон во II в. н. э., хотя заболевание известно очень давно; во всяком случае, в вавилонских, ассирийских и греческих мифах упоминается болезнь, являющаяся, судя по описанию клинической картины, гонореей. В настоящее время гонорею относят к наиболее распространенным инфекционным заболеваниям, передаваемым половым путем.

Источник инфекции — больной человек, особенно хронической бессимптомно протекающей формой гонореи.

Экологической нишей являются слизистые оболочки мочеполовых путей человека. Механизм передачи — контактный, путь — половой, крайне редко — бытовой (например,

больная гонореей мать может заразить маленькую дочь при пользовании общей мочалкой, сиденьем унитаза и т. п.). Восприимчивость к гонококкам очень высокая. Гонококки очень неустойчивы во внешней среде, что следует помнить при заборе и транспортировке исследуемого клинического материала. Чувствительны к действию обычно применяемых антисептиков и дезинфектантов, особенно к солям тяжелых металлов. Высокочувствительны к пенициллинам, тетрациклинам, стрептомицину.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Неподвижные аспорогенные грамотрицательные диплококки (средний размер клетки $1,25 \times 1,0 \times 0,7 + 0,8$ мкм), напоминающие кофейные зерна или бобы, прилегающие друг к другу уплощенными сторонами, образующие капсулу. Полиморфны — встречаются более мелкие или более крупные клетки, а также палочковидные формы. Хорошо окрашиваются анилиновыми красителями (метиленовым синим, бриллиантовым зеленым и др.), цитоплазма имеет включения. Под действием пенициллина образуют L-формы; под влиянием химиопрепаратов быстро меняют свойства и становятся грамположительными.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Аэробы, хемоорганотрофы; для роста требуют свежеприготовленных влажных питательных сред с добавлением нативных белков крови, сыворотки или асцитической жидкости; широко используют безасцитные среды (например, среда КДС-1 с гидролизатом казеина, дрожжевым аутолизатом и нативной сывороткой); оптимум pH 7,2-7,4, температуры — 37°C. Не вызывают гемолиза на средах, содержащих кровь; на средах с добавлением молока, желатина и картофеля не растут. Через 24 ч на плотных питательных средах гонококки, содержащие в клеточной стенке протеин II, образуют слегка мутные бесцветные колонии; бактерии, не содержащие протеин II, образуют круглые прозрачные колонии в виде капель росы (1—3 мм в диаметре) с ровными краями. На жидких питательных средах растут диффузно и образуют поверхностную пленку, через несколько дней оседающую на дно.

6. Антигенная структура

Антигенная структура сложная и еще остаётся плохо изученной. Содержат соматический и капсульный антигены. ЛПС проявляют сильные иммуногенные свойства; основной пул антител, синтезируемых в организме, составляют Ig к ЛПС, которые обладают бактерицидным действием. Основную антигенную нагрузку несут пили и поверхностные белки наружной мембраны. Пили состоят из цепочек белковых субъединиц (молекулярная масса около 20 000 Да), остатков сахаров и фосфорной кислоты; нарушение последовательности соединения субъединиц изменяет антигенные свойства. Наружная мембрана содержит протеины I, II и III классов, которые проявляют сильные иммуногенные свойства; на основании их состава выделяют 16 серотипов. В присутствии комплемента АТ к белкам клеточной стенки проявляют бактерицидные свойства. Вариабельность протеинов, детерминированная кодированием в нескольких генах, определяет высокую частоту антигенных вариантов. Экспрессия некоторых АГ гонококка определяется изменением условий окружающей среды.

7. Биохимические свойства

Биохимическая активность крайне низкая. Разлагают только глюкозу с образованием кислоты без газа, измененные формы иногда не ферментируют ни одного углевода, продуцируют каталазу и цитохромоксидазу. Протеолитическую активность не проявляют, аммиак, сероводород и индол не образуют, не приводят к гемолизу на средах, содержащих кровь. Во внешней среде неустойчивы, поэтому посев следует проводить сразу после забора материала от больного.

8. Факторы патогенности

К ним относятся: капсула, пили, эндотоксин, поверхностные белки наружной мембраны, протеазы.

Все свежeweделенные культуры имеют *капсулу*, которая обладает антифагоцитарным действием (препятствует прямому контакту микробицидных субстанций с клеточной стенкой, маскирует ее антигенные детерминанты). АТ-опсонины к АГ капсулы стимулируют фагоцитоз гонококков. Полисахариды в капсулах не обнаружены, присущие им функции выполняют высокомолекулярные поверхностные полифосфаты.

Пили обеспечивают адгезию к эпителию. Генетически опосредованная вариабельность строения пилей обеспечивает прикрепление и выживаемость гонококков на клетках эпителия при смене хозяина и воздействии АТ. У авирулентных штаммов они отсутствуют.

Клеточная стенка содержит *эндотоксин*. Это липополисахарид, который состоит из липида А и центрального ядра (антигенной детерминанты) — олигосахарида, не имеющего боковых цепей. Липополисахариды *N. gonorrhoeae* проявляют сильные иммуногенные свойства. АТ к ним обладают бактерицидной активностью.

Белки клеточной оболочки. Проявляют сильные иммуногенные свойства. На основании их состава выделяют 16 сероваров. АТ к белкам клеточной стенки обуславливают комплементзависимый цитолиз. *Поверхностный белок I класса* обуславливает устойчивость к бактерицидным факторам слизистых оболочек, а также инвазивные свойства бактерий и их способность вызывать системные инфекции. *Поверхностный белок II класса* образует отдельную белковую фракцию, называемую протеинами мутности или Ора-протеинами (от англ. *opacity* — мутность). Их считают первичными факторами вирулентности гонококков, и они обуславливают прикрепление к эпителию, а также ингибируют фагоцитарные реакции.

Синтезируют *IgA* — *протеазу*, действующую внеклеточно и разрушающую пролинтреониновые связи в тяжелых цепях *Ig*, а также расщепляющую молекулу *IgA* в шарнирной области. Эти эффекты инактивируют АТ, препятствующие адгезии, что облегчает прикрепление к рецепторам эпителиальных клеток, а также защищает бактерии от фагоцитоза, опосредованного АТ. Резистентность слизистых оболочек во многом обусловлена местной секрецией *IgA*.

9. Патогенез

Входными воротами для возбудителя служит цилиндрический эпителий уретры, шейки матки, конъюнктивы и прямой кишки. Взаимодействие гонококков с эпителиальными клетками опосредовано пилиями, взаимодействующими с рецепторами эпителиальных клеток, что имеет решающее значение в развитии инфекции. Гонококки прикрепляются к эпителию, где мишенью для их цитотоксического действия служат поверхностные структуры клеток. Бактерии вызывают гибель и слущивание клеток, что нарушает процесс самоочищения слизистых оболочек. Нарушение функций слизистых вызывают как сами бактерии, так и ЛПС, а также пептидогликаны клеточных стенок гонококков. Микроворсинки клеток, лишенных ресничек, действуя как псевдоподии, захватывают бактерии, попадающие внутрь этих «непрофессиональных» фагоцитов. Подобное явление известно как эндоцитоз, опосредованный патогенным микробом. В цитоплазме клеток фагосомы сливаются в гигантские вакуоли, где гонококки размножаются, оставаясь недоступными действию АТ, фагоцитов и многих антибиотиков. Вакуоли сливаются с базальной мембраной, и бактерии попадают в прилегающую соединительную ткань, где вызывают местное воспаление, либо проникают в кровоток с возможным последующим диссеминированием. Прикрепившись к эпителию, гонококки становятся недоступными для фагоцитоза. Размножение *N. gonorrhoeae* внутри нейтрофилов остается предметом дискуссии. В окрашенных мазках клинического материала гонококки видны как внутри, так и вне нейтрофилов. Создается впечатление, что большинство фагоцитированных нейтрофилами бактерий подверглось внутриклеточному лизису, однако это положение не бесспорно, поскольку имеются отдельные сведения о способности гонококков выживать и реплицировать в фагоцитах за счет нарушения регуляции образования каталазы и подавления активности эндоперекисей в фаголизосомах.

Клиника. Гонококковая инфекция проявляется в виде гнойного воспаления слизистой оболочки мочеполовых путей (гонорея), конъюнктивы глаз (бленнорея), других органов. Инкубационный период 2 — 4 дня. Заболевание характеризуется резью при мочеиспускании, выделению гноя из уретры. Заболевание имеет тенденцию к переходу в хроническую бессимптомную форму. Нелеченая гонорея является одной из основных причин бесплодия как у мужчин, так и у женщин. Нелеченая бленнорея ведет к слепоте.

Гонококковая инфекция проявляется воспалением тазовых органов и бесплодием у женщин. Диссеминирование возбудителя может приводить к пельвиоперитониту, менингитам, артритам, эндокардитам и септицемиям. Женщины более склонны к диссеминированным поражениям. Заболевание у них часто протекает бессимптомно, поэтому своевременное

лечение не проводится, что делает женщин основным резервуаром инфекции. У мужчин бессимптомное течение гонореи наблюдают редко.

10. Иммуитет

Иммуитет по своему механизму — нестерильный, после перенесенного заболевания невосприимчивость к вторичным заражениям не вырабатывается, поэтому часто регистрируются повторные заболевания, возможны супер-и реинфекции. Животные резистентны к гонококкам, лишь внутрибрюшинное введение микробов вызывает гибель мелких лабораторных животных.

11. Методы лабораторной диагностики

Материалом для исследования служит гнойное отделяемое из уретры, влагалища и шейки матки, из прямой кишки и глотки. *N.gonorrhoeae* при бессимптомном течении болезни часто обнаруживают в отделяемом из прямой кишки у женщин и мужчин-гомосексуалистов, с конъюнктивы глаза (при бленнорее), а также в сыворотке крови. У мужчин-гомосексуалистов материал необходимо забирать также из ротовой полости, глотки и прямой кишки. Результаты микробиологического исследования зависят от соблюдения правил забора материала из передней уретры и простаты. За 2-3 суток перед забором материала необходимо прекратить применение дезинфицирующих и антибактериальных препаратов, воздерживаться от мочеиспускания в течение 4-6 ч и провести туалет окружающих кожных покровов. Забор материала должен проводить лечащий врач.

Для диагностики применяют *бактериоскопический, бактериологический и серологический* методы.

А. Бактериоскопическое исследование является основным методом диагностики острой гонореи и бленнорее. Готовят два мазка, один из которых окрашивают по Граму, а второй — метиленовым синим, и микроскопируют. В мазке, окрашенном по Граму, в положительном случае можно обнаружить грамотрицательные диплококки бобовидной формы, а в мазке, окрашенном метиленовым синим, — картину незавершенного фагоцитоза. Окраска по Граму позволяет дифференцировать гонококки с другими бактериями. Для получения более четких очертаний гонококков мазки фиксируют диметилсульфоксидом. В связи с тем, что в исследуемом материале могут находиться и другие грамотрицательные бактерии, морфологически сходные с гонококками, применяют прямой и непрямой варианты РИФ. При прямом варианте мазки обрабатывают флюоресцирующими антителами против гонококков, при непрямом — используют гонококки, сыворотку больного и антиглобулиновую сыворотку.

Б. Бактериологическое исследование проводят в тех случаях, когда гонококки в мазках не обнаруживают или находят атипичные, измененные формы. Культуральный метод позволяет выявлять гонококки в 1,5 — 4 раза чаще, чем бактериоскопический метод. Особенно показаны посевы при хронической гонорее, гонорейном проктите и контроле на излечение. Из-за низкой устойчивости гонококка в окружающей среде посев производят непосредственно после забора материала на чашки с сывороточным или асцитическим агаром, КДС-1. Добавление к среде ристомицина и полимиксина М (10 ЕД/мл) значительно повышает высеваемость гонококков. Перед посевом питательную среду нагревают в термостате, чашки с посевами инкубируют в эксикаторе в атмосфере, обогащенной 10 % CO₂. Выделение и идентификацию возбудителя проводят по стандартной схеме.

Серологический метод используют при хронической гонорее, при отсутствии у больного выделений. Проводят РСК по Борде—Жангу по стандартной схеме, которая бывает положительной с 3—4-й недели болезни; в острых случаях реакция положительна у 35 % больных, при хронических — у 65 % (слабоположительная у 100 %). В качестве АГ для РСК применяют гоновакцину или АГ из убитых гонококков. Более достоверна люминесцентная диагностика с использованием прямого и непрямого иммунофлюоресцентного анализа.

12. Лечение и профилактика

Характер терапии зависит от формы заболевания (острая или хроническая), топического диагноза, наличия осложнений и состояния организма. При острой и подострой гонорее обычно применяют препараты пенициллина. Другие антибиотики, как правило, применяют при непереносимости пенициллина. В результате антибиотикотерапии воспалительные

явления в течение 5—7 дней резко уменьшаются, выделения становятся скудными, слизистыми, гонококки в них отсутствуют. При успешном лечении по истечении 7—10 дней приступают к установлению излеченности.

При хронической осложненной гонорее, а также свежей торпидной лечение сводится к специфической или неспецифической иммунотерапии и к местному воздействию на пораженный орган. После такого воздействия в условиях стационара проводят курс антибиотикотерапии, причем курсовая доза препарата в 2 раза выше, чем при лечении острой гонорее. Чем больше давность гонорейного процесса, чем значительнее выражены соединительнотканые изменения, тем интенсивнее должны быть иммунотерапия и местное лечение. Иммунотерапия, которая может быть специфической (гоновакцина) или неспецифической (пирогенал и т. п.), способствует более быстрому и полному рассасыванию воспалительных инфильтратов. Чаще всего применяют гоновакцину, которую вводят внутримышечно через 1—2 дня; курс лечения состоит из 6—8 инъекций. Для местного лечения применяют различные химические, механические и термические раздражители. Для физиотерапии применяют компрессы, местные ванны, микроклизмы и др.

Излеченным больного следует считать тогда, когда после продолжительного наблюдения не удастся обнаружить гонококки в организме, и больной перестает быть источником инфекции. Общая продолжительность диспансерного наблюдения за больными, перенесшими гонорее, составляет 2 месяца. Если в течение этого срока возбудитель и клинические проявления болезни отсутствуют, то таких лиц снимают с диспансерного учета.

Для контроля качества проведенного лечения используют методы провокаций:

1. Химический метод: у мужчин — инстиляция в уретру 0,5% раствора нитрата серебра, у женщин — смазывание уретры 1—2% раствором нитрата серебра, а шейного канала — 2—5% раствором Люголя на глицерине.

2. Механический метод: у мужчин — массаж уретры на буже.

3. Биологический метод: внутримышечное введение гоновакцины в количестве 500 000 000 микробных тел (можно одновременно с пирогеналом — 200 МПД). Если гоновакцина применялась во время лечения, то для провокации назначается двойная последняя терапевтическая доза, но не более 2 млрд микробных тел.

4. Алиментарный метод: соленая, острая пища, пиво.

5. Термический метод: прогревание половых органов индуктотермическим током.

Профилактика. Проводится комплекс мер, направленных на ликвидацию источника инфекции: больных необходимо выявлять и лечить. Особое внимание следует уделить активному выявлению больных гонореей среди пациентов урологических клиник, мужей женщин, страдающих воспалительными заболеваниями женских половых органов неясной этиологии, в обязательном порядке обследовать всех членов семьи больного гонореей, декретированных групп населения (работники детских дошкольных учреждений и общепита) перед поступлением на работу и в последующем через каждые три месяца. Выявленные больные подлежат лечению с последующим контролем на излеченность. Законом предусмотрено наказание за уклонение от лечения и заведомое заражение других лиц.

Большое значение имеет санитарно-просветительная работа, направленная на пропаганду здорового образа жизни, исключение случайных половых связей.

Предохранительные мероприятия включают использование презервативов, обработку наружных половых органов антисептиками сразу же после случайных половых контактов. Для профилактики бленнорей новорожденным при первичной обработке сразу же после рождения в глаза закапывают нитрат серебра или 1—2 капли раствора сульфацил натрия (альбуцид).

Возбудитель сифилиса

1. Таксономия и классификация

Возбудитель сифилиса (*Treponema pallidum*) относится к семейству *Spirochaetaceae*, род *Treponema*. По старой классификации назывался спирохетой Шаудина или просто бледной спирохетой, так как микроб плохо окрашивается анилиновыми красками.

2. Нозологические формы

Патогенными для человека свойствами обладают *Treponema pallidum* (подвиды *pallidum*, *pertenue* и *endemicum*), *T. carateum* и *T. vincentii*. Последний вид представлен условно-патогенными микробами, обитающими в складках слизистой полости рта и десневых карманах. При ослаблении организма может вызвать в симбиозе с *Fusobacterium nucleatum* и *Prevotella melaninogenica* язвенно-некротическую ангину Симановского–Венсана–Плаута.

3. Эпидемиология и пути передачи

Сифилис является чисто антропонозной инфекцией. В естественных условиях болеет только человек. Заболевание распространено повсеместно. Заражение происходит, как правило, контактно-половым, реже — контактно-бытовым путями. Возможна передача возбудителя от матери плоду трансплацентарно или при прохождении по родовым путям. Возбудитель не способен проникать через плаценту в первые 4 мес беременности. Лечение матери на этих сроках препятствует инфицированию плода. Возможно заражение кровью, собранной у инфицированных лиц на раннем этапе инфекции. Поэтому для разрушения возбудителя кровь консервируют при — 3°С в течение 5 дней. Наибольшую опасность представляют лица на ранних этапах болезни; в III и IV стадиях они практически теряют инфекционность (в среднем через 4 года после заражения).

Чувствителен к высушиванию, солнечным лучам, дезинфицирующим веществам, нагреванию. При нагревании до 55 °С гибнет в течение 15 мин, при 100 °С — мгновенно. На предметах домашнего обихода сохраняет заразительность до высыхания. При неблагоприятных условиях образует цисты и L-формы.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Представляет собой типичные по морфологии трепонемы размером 0,09/0,5x5/20 мкм, имеющие 8—12 завитков. Двигательный аппарат представлен идущими от каждого полюса клетки тремя периплазматическими фибриллами. Способны образовывать L-формы. Основной способ размножения — поперечное деление. Слабо воспринимает анилиновые красители. По Граму не окрашивается. По Романовскому — Гимзе окрашивается в бледно-розовый цвет. Выявляется при импрегнации серебром по Морозову, а также с помощью фазово-контрастной и темнопольной микроскопии. Помимо морфологии в витальных препаратах трепонем определяется их подвижность — поступательные, вращательные, сгибательные и маятникообразные движения.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Вирулентные штаммы на питательных средах не растут. Для накопления культуры заражают кролика в яичко. Невирулентные штаммы можно культивировать на средах, содержащих мозговую и почечную ткань, в анаэробных условиях при 35 °С. Культивирование приводит к потере вирулентных и изменению антигенных свойств.

6. Антигенная структура

Обладает сложной антигенной структурой. Имеет специфический термолабильный белковый антиген и неспецифический липоидный антиген. Трепонемы имеют перекрестно — реагирующие антигены с другими спирохетами (боррелиями, лептоспирами). В связи с наличием в составе клеточных стенок бледных трепонем фосфолипидов (кардиолипидов (кардиолипидов и др.), аналогичных клеткам млекопитающих, в ответ на эти антигены в организме вырабатываются специфические не только для возбудителя сифилиса, но и перекрестно-реагирующие на кардиолипид и другие фосфолипиды тканей человека и животных так называемые *вассермановские* антитела. Они выявляются в РСК с кардиолипидным антигеном (из сердца быка). Специфические антитела к возбудителю сифилиса выявляют в РНИФ и иммуноблоте.

Антиген Вассермана — фосфолипид, входящий в состав митохондриальных мембран (кардиолипидов). Его получают из бычьего миокарда — ткани, богатой митохондриями. Благодаря антигенной общности с тканевыми фосфолипидами, антитела к кардиолипину трепонем реагируют с тканевым (митохондриальным) кардиолипином. Истинные аутоантитела против тканевого кардиолипидина образуются при “антимитохондриальном (антифосфолипидном) синдроме”, обуславливая положительные реакции Вассермана (ложноположительные — применительно к возбудителю сифилиса) при коллагенозах (системная красная волчанка, ревматоидный артрит), проказе и других тяжелых инфекциях, связанных с повреждением тканей, при гемолитической анемии, при наркоманиях.

7. Биохимические свойства

Возбудитель сифилиса является микроаэрофилом. Биохимические свойства вследствие некультивируемости изучены плохо. Некоторые штаммы разлагает глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу и маннит с образованием кислоты; образуют индол и сероводород; разжижают желатину. Уреаза -, каталаза -, оксидаза -, реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, не восстанавливают нитратов. Единичные штаммы лизируют эритроциты человека.

8. Факторы патогенности

Изучены плохо. Считают, что в процессе прикрепления к клеткам принимают участие адгезины, синтез которых происходит, возможно, только при попадании возбудителя в организм человека. Липопроотеины участвуют в развитии иммунопатологических процессов.

9. Патогенез

Сифилис — венерическая антропонозная инфекционная болезнь, характеризующаяся первичным аффектом, высыпанием на коже и слизистых оболочках с последующим поражением различных органов и систем.

Проникшие в организм трепонемы из места входных ворот попадают в регионарные лимфатические узлы, где размножаются. Из лимфатических узлов возбудитель попадает в кровяное русло, где прикрепляется к эндотелиальным клеткам, вызывая развитие эндартериитов, ведущих к развитию васкулитов и последующему тканевому некрозу. С кровью трепонемы разносятся по всему организму, обсеменяя различные органы и ткани: печень, почки, костную, нервную и сердечно-сосудистую системы.

Болезнь протекает в несколько циклов. Инкубационный период составляет 3—4 недели. *Первичный период* характеризуется появлением *твердого шанкра* (язвочки с твердыми краями на месте внедрения возбудителя — слизистых оболочках половых органов, рта, ануса), увеличением и воспалением лимфатических узлов. Первичный период длится 6—7 недель. Затем наступает *вторичный период*, который характеризуется появлением на коже и слизистых оболочках папулезных, везикулярных или пустулезных высыпаний, а также поражением печени, почек, костной, нервной и сердечно-сосудистой систем. В элементах сыпи содержится большое количество живых трепонем, в этот период больной наиболее заразен. Вторичный сифилис длится годами. Высыпания могут самопроизвольно исчезать, а при ослаблении защитных сил организма появляются вновь. Такие рецидивы могут повторяться несколько раз. После вторичного сифилиса, который длится 2—4 года, наступает *третичный период*, который длится десятилетиями и характеризуется образованием сифилитических бугорков (*гумм*). Гуммы являются результатом развития в организме иммунопатологического процесса, в ответ на сохранившиеся в организме трепонемы. Бугорки и гуммы склонны к распаду с последующими обширными деструктивными изменениями в пораженных органах и тканях. Без лечения может наступить *четвертичный период* — *спинная сухотка*, которая характеризуется развитием прогрессирующего паралича вследствие поражения ЦНС.

10. Иммунитет

Защитный иммунитет после перенесенной инфекции не формируется. В ответ на антигены возбудителя в организме образуются антитела, которые являются свидетелями инфекционного процесса; развивается ГЗТ и аутоиммунные процессы. Гуморальный иммунный ответ характеризуется первичным образованием неспецифических антител, называемых исторически «реагинами», на липоидный антиген возбудителя, представляющих собой смесь IgM-и IgG-антител. Титр этих антител в процессе уменьшения в организме количества трепонем падает. Специфические антитела на белковый антиген появляются позже. Они длительно сохраняются независимо от присутствия трепонем в организме.

11. Методы лабораторной диагностики

Используют бактериоскопический и серологический методы в зависимости от стадии заболевания. Бактериоскопическое исследование проводят при первичном сифилисе и в период высыпаний при вторичном сифилисе. Материалом для исследования служат отделяемое твердого шанкра, пунктаты лимфатических узлов, материал из кожных высыпаний.

При первичном и вторичном сифилисе возбудитель можно обнаружить в очагах поражений микроскопией. Более оптимальны для выявления бледных трепонем *темнопольная и*

иммунолюминесцентная микроскопия. При первом методе необходимо исключить возможные артефакты (нити фибрина, например), наличие сапрофитических трепонем. *T.refringens* колонизирует наружные половые органы, отличается высокой подвижностью и отсутствием сгибательных движений. *T.denticola* колонизирует ротовую полость, ее завитки короче и направлены под более острым углом. В ротовой полости человека встречается также *T.vincentii*, которая в ассоциации с другими микроорганизмами может вызывать *язвенно — некротическую ангину*.

Кроме возбудителя сифилиса имеются очень близкие в генетическом и антигенном отношении трепонемы других подвидов *T.pallidum*, вызывающие поражения человека в странах с жарким климатом (*фрамбезию, бержель, тинту*).

При окраске по Романовскому — Гимзе *T.pallidum* окрашивается в розовый цвет, непатогенные трепонемы — в синий или фиолетовый, *T.refringens* прокрашивается фуксином в красный цвет. Люминесцентная диагностика широко применяется для выявления трепонем в различных клинических материалах. Среди методов выявления возбудителя наибольшей чувствительностью и достаточной специфичностью обладает ПЦР.

Основные методы диагностики — *серологические*, т.е. выявление сывороточных антител. Применяют РСК с кардиолипидным и трепонемным антигеном, флоккуляционные пробы (микроагглютинационный тест на кардиолипидные антитела), РНГА. Более специфичными и чувствительными тестами являются тесты, основанные на непрямой иммунофлюоресценции (РИФ), реакция иммобилизации бледной трепонемы (РИБТ), ИФА на основе рекомбинантных белков трепонем.

В серодиагностике сифилиса необходимо учитывать серонегативность первичного сифилиса в первые недели заболевания. Необходимо сочетание методов, основанных на выявлении антител как против кардиолипидных, так и трепонемных антигенов. Кардиолипидные тесты быстро становятся серонегативными после элиминации возбудителя (спустя несколько месяцев), антитрепонемные антитела сохраняются намного дольше. Существенное значение для определения активности процесса имеет определение *антитрепонемных IgM — антител* (при выявлении врожденного сифилиса —особо, поскольку IgM — антитела не переходят через плаценту от матери к плоду; при исследовании спинномозговой жидкости — для диагностики нейросифилиса и др.).

Серологическое исследование проводится комплексом серологических реакций, среди которых различают отборочные неспецифические тесты, использующие кардиолипидный антиген и применяемые для обследования населения на сифилис, и диагностические тесты, использующие трепонемальный антиген и применяемые для подтверждения диагноза.

К отборочным тестам относится реакция микропреципитации или ее аналоги: VDRL (*venereal disease research laboratory* — англ.) и RPR (*rapid plasma reagin* — англ.) — флоккуляционные тесты и РСК (реакция Вассермана). Реакция микропреципитации и флоккуляционные тесты определяют как IgG, так и IgM-антитела и бывают позитивными на ранних этапах заболевания. РСК (реакция Вассермана) ставится с кардиолипидным и трепонемным антигенами, определяет IgG-антитела. Отборочные тесты с кардиолипидным антигеном в количественном варианте используют для контроля эффективности лечения.

При постановке ИФА, РНГА, РИФ, РИТ (реакция иммобилизации трепонем) в качестве антигена используют ультразвуковой экстракт трепонем, выращенных в яичке кролика. Это высокочувствительные и высокоспецифичные реакции на сифилис. Они относятся к диагностически подтверждающим тестам. В связи с длительным сохранением специфических антител в организме эти реакции не могут быть использованы для оценки эффективности лечения. Кроме того, они будут положительны у больных фрамбезией и беджель.

12. Лечение и профилактика

Для лечения используют антибиотики пенициллинового ряда и висмутсодержащие препараты. Чаще применяют депонированные пенициллины с пролонгированным действием, при непереносимости — макролиды, тетрациклины, цефалоспорины.

Специфическая профилактика не проводится. Не специфическая профилактика сводится к борьбе за здоровый образ жизни, своевременному выявлению и лечению больных, серологическому исследованию, проводимому у доноров, беременных, больных в стационарах, у лиц групп риска (наркоманы, проститутки, гомосексуалисты).

Возбудители урогенитального хламидиоза

1. Таксономия и классификация

Хламидии — бактерии, являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами, которые вызывают различные заболевания человека, животных и птиц. Свое название хламидии получили от греч. *chlamyda* — мантия, так как в пораженных клетках они образуют включения, окруженные оболочкой, напоминающей мантию.

Представители семейства *Chlamydiaceae* (хламидии) являются патогенными облигатными внутриклеточными бактериями, паразитирующими в чувствительных клетках теплокровных (млекопитающих, птиц, человека и др.). Они близки по структуре и химическому составу к классическим бактериям. Для них характерно сохранение морфологической сущности на протяжении всего жизненного цикла, деление вегетативных форм, наличие клеточной стенки, содержание ДНК и РНК, энзиматическая активность, чувствительность к антибиотикам широкого спектра, наличие общего родоспецифического антигена. В то же время хламидии по размерам меньше классических бактерий, имеют небольшой геном, являются облигатными внутриклеточными паразитами с уникальным циклом развития. Они не способны синтезировать высокоэнергетические соединения и обеспечивать собственные энергетические потребности (*энергозависимые паразиты*), что и определяет их облигатный паразитизм. С учетом своих особенностей хламидии занимают самостоятельное (особое) положение среди других микроорганизмов — прокариот.

Хламидии относятся к порядку *Chlamydiales*, семейству *Chlamydaceae*, роду *Chlamydia*. Различают три вида хламидий — *Ch. trachomatis*, *Ch. psittaci*, *Ch. pneumoniae*, — вызывающих заболевания у человека, животных, а также несколько видов, патогенных только для животных (например, *Ch. pecorum*, *Ch. abortus*, *Ch. felis* и др.). Согласно последней классификации, семейство *Chlamydaceae* предложено разделять на два рода: род *Chlamydia*, представленный видом *Ch. trachomatis*, и род *Chlamidophila*, в который включены виды *Ch. psittaci* и *Ch. pneumoniae*.

2. Нозологические формы

Вид *Ch. trachomatis* — микроорганизмы, вызывающие заболевания, главным образом, у человека (антропонозные хламидиозы). Они обуславливают разнообразную патологию урогенитального тракта, глаз (трахома) и связанную с ней хламидийную инфекцию иной локализации (венерическую лимфогранулема).

Вид *Ch. psittaci* — включает микроорганизмы, первично поражающие животных. У человека они могут вызвать зоонозные хламидиозы (орнитоз, генерализованные инфекции, связанные с сельскохозяйственными и домашними животными).

Вид *Ch. pneumoniae* — включает микроорганизмы, вызывающие респираторную патологию, передающуюся от человека к человеку. Это антропонозные пневмонии, ОРЗ, с этим возбудителем связывают развитие некоторых форм бронхиальной астмы, атеросклероза. Возбудитель недостаточно изучен.

3. Эпидемиология и пути передачи

Урогенитальный хламидиоз — антропонозная инфекция: ее источником служат больные люди (хламидии не являются представителями нормальной микрофлоры, поэтому их обнаружение у здоровых людей является доказательством хронического бессимптомного течения хламидиоза). Как источник инфекции наиболее опасны женщины, у которых бессимптомное течение заболевания отмечается в 70—80% случаев. Заражение человека происходит через слизистые оболочки половых путей. Основной механизм заражения — контактный, путь передачи — половой. Однако возможно инфицирование и через различные предметы (белье, мочалка и др.). Описаны случаи семейного хламидиоза, возникшего в результате контактно-бытового инфицирования. Новорожденные могут заражаться от больной матери при прохождении через родовые пути (хламидиоз глаз, отиты, атипичные

пневмонии хламидийной этиологии). Возможна также трансплацентарная передача возбудителя от матери плоду в процессе его внутриутробного развития (неонатальная патология — врожденный хламидиоз).

Генитальные серовары *Ch. trachomatis* могут попасть на слизистую оболочку глаз также при купании, в результате чего развивается кератоконъюнктивит («хламидиоз бассейнов»). Хламидийный конъюнктивит обычно является односторонним процессом и носит название «паратрахома».

Восприимчивость к болезни высокая. Полагают, что около 6—9% мужчин и 12—15% женщин в мире заражены хламидиями.

Хламидии обладают эпителиотропностью и поэтому способны поражать эпителий различных органов. Массовое размножение хламидий в эпителиальных клетках приводит к разрушению слоя эпителия и образованию язв, которые заживают с образованием рубцов и спаек. Рубцовые изменения роговицы при трахоме приводят к слепоте, воспаление органов малого таза при урогенитальном хламидиозе ведет к бесплодию. После гибели большого количества эпителиальных клеток возбудитель может попадать в кровь, паренхиматозные органы и фиксироваться в лимфоидной ткани. Это, в частности, характерно для венерического лимфогранулематоза и орнитоза. Кроме того, многие виды хламидий способны к латентному существованию или персистенции в организме хозяина, вызывая иммунную и аллергическую перестройку организма, как, например, при синдроме Рейтера.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Хламидии — это мелкие грамотрицательные бактерии шаровидной или овоидной формы. Не образуют спор, не имеют жгутиков и капсулы. Строение клеточной стенки хламидий отличается от других бактерий: она представляет собой двухслойную мембрану, ограничивающую периплазматическое пространство, не содержит (или содержит в небольшом количестве) N-ацетил-мурамовую кислоту — основной компонент пептидогликана. Ригидность клеточной стенке придают пептиды, перекрестно сшитые пептидными мостиками. В остальном хламидий сходны с другими грамотрицательными бактериями. Они имеют гликолипиды, аналогичные ЛПС наружной мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий, и при окраске по Граму приобретают красный цвет. Основным методом выявления хламидий является метод окраски по Романовскому—Гимзе. Хламидии полиморфны, что связано с особенностями их репродукции. Уникальный цикл развития хламидий характеризуется чередованием двух различных форм существования — *элементарных* и *ретикулярных* (или *инициальных*) телец.

Элементарные тельца представляют собой мелкие (размер 0,2—0,3 мкм) метаболически неактивные инфекционные частицы, которые располагаются вне клетки. Они имеют толстую оболочку, состоящую из внутренней и наружной мембран, что определяет их относительно высокую устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды. Элементарные тельца окрашиваются по Романовскому—Гимзе в красный цвет. Внутри клеток элементарные трансформируются в ретикулярные тельца.

Ретикулярные тельца являются вегетативной формой хламидий, обычно имеют овоидную форму и крупнее элементарных телец в несколько раз (их размер 0,4/0,6x0,8/1,2 мкм). Они располагаются внутриклеточно около ядра и окрашиваются по Романовскому—Гимзе в голубой или фиолетовый цвет. Инфекционность ретикулярных телец по сравнению с элементарными крайне мала.

Репродукция хламидий. Размножение хламидий, которые являются облигатными внутриклеточными паразитами, происходит в клетках, преимущественно эпителиальных. Элементарные тельца индуцируют фагоцитоз и захватываются клеткой-мишенью, попадая в нее путем эндоцитоза. После поглощения элементарные тельца оказываются внутри фагосомы и блокируют ее слияние с лизосомами. Благодаря этой своей особенности элементарные тельца «избегают» контакта с лизосомальными ферментами и беспрепятственно размножаются внутри фагосомы. Внутри клеток элементарные тельца трансформируются в ретикулярные, которые, в свою очередь, многократно делятся бинарным делением, затем уплотняются и превращаются в элементарные тельца. В конце цикла послед-

ние занимают большую часть клетки хозяина. Растягивая стенку вакуоли, они разрывают ее, а затем и плазматическую мембрану клетки. Цикл развития хламидий продолжается 24—48 ч и завершается гибелью клетки хозяина и выходом элементарных телец. Последние, освободившись, инфицируют соседние интактные клетки, и цикл повторяется.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Поскольку хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами, их можно размножать только в живых клетках. Природа паразитизма хламидий радикально отличается от таковой у вирусов: они не способны самостоятельно аккумулировать и использовать энергию. В этой связи хламидии, подобно риккетсиям, принято называть *энергетическими паразитами*.

Культивируют хламидии в желточном мешке развивающихся куриных эмбрионов, организме чувствительных животных и в культуре клеток типа HeLa, McCoy, Hep-2. Оптимальная температура культивирования +35 °С. Перед заражением культуры клеток облучают или обрабатывают циклогексамидом, что позволяет хламидиям легче усваивать АТФ. *Ch. trachomatis*, возбудитель венерической лимфогранулемы, отличается более высокой вирулентностью и поэтому легче культивируется на всех предложенных живых моделях, не требуя даже предварительной подготовки культур клеток.

6. Антигенная структура

Хламидии имеют антигены трех типов:

- родоспецифический термостабильный липополисахарид (гликолипид), находящийся в клеточной стенке хламидий. ЛПС имеет две антигенные детерминанты, одна из них специфична для всего рода, другая перекрестно реагирует с некоторыми другими грамотрицательными бактериями (сальмонеллы серовара minnesota), его выявляют с помощью РСК;
- видоспецифический антиген белковой природы, расположенный более поверхностно—в наружной мембране, несет функцию структурного белка и *порина*. Обнаруживают с помощью РИФ;
- вариантоспецифический антиген белковой природы.

Кроме того, *C. trachomatis* и *C. psittaci* располагают типоспецифическими антигенами, которые, вероятно, являются мембранными пептидами.

7. Биохимические свойства

Хламидии обладают небольшим набором ферментов. Они могут ферментировать пировиноградную кислоту, синтезировать некоторые липиды и т. д. Но хламидии не способны синтезировать высокоэнергетические соединения, и вне клеток хозяина их метаболические функции сведены до минимума. Обеспечение хламидий метаболитами осуществляется в основном за счет жизнедеятельности клеток хозяина. Причем некоторые метаболиты (например, изолейцин) могут являться ингибиторами роста хламидий и, вероятно, поэтому обеспечивают латентное течение хламидиоза. *Chlamydia trachomatis* обладает гликоген — синтетазной системой (гликоген содержится и выявляется при определенных методах окраски во включениях), синтезирует предшественники фолиевой кислоты и соответственно биохимической активности чувствителен к сульфаниламидам.

8. Факторы патогенности

С белками наружной мембраны хламидий связаны их адгезивные свойства. Эти адгезины обнаруживают только у элементарных телец. Кроме того, хламидии образуют эндотоксин (ЛПС). Возможно, некоторые из них выделяют экзотоксин, обладающий летальным действием: при внутривенном введении вызывает гибель мышей. По-видимому, белки наружной мембраны являются антифагоцитарным фактором, так как способны подавлять слияние фагосомы с лизосомой.

Кроме того, у некоторых хламидий обнаружен так называемый белок теплового шока (от англ. *heat-shock protein* — *HSP*), способный вызывать аутоиммунные реакции.

Резистентность хламидий к различным факторам внешней среды достаточно высока. Они устойчивы к низким температурам (не теряют активность даже при замораживании при —50...—70 °С), высушиванию. Так, например, возбудитель орнитоза может сохраняться во внешней среде (например, в подстилке гнезда птиц) до нескольких месяцев. Однако, как и все неспорообразующие бактерии, хламидии довольно чувствительны к нагреванию и быстро инактивируются различными дезинфектантами.

9. Патогенез

Урогенитальный хламидиоз — одно из самых распространенных (после трихомонадной инфекции) заболеваний, передающихся половым путем. Это — острое или хроническое инфекционное заболевание, которое характеризуется преимущественным поражением мочеполового тракта, обычно малосимптомным течением, но тяжелыми последствиями — развитием бесплодия. Возбудитель урогенитального хламидиоза — *Ch. trachomatis*.

Входные ворота инфекции — как правило, слизистые оболочки половых органов. Патологический процесс начинается через 5—30 дней после заражения. У женщин первоначально поражается шейка матки. У мужчин *Ch. trachomatis* первично инфицирует эпителий уретры. Урогенитальный хламидиоз часто называют «негонококковый уретрит», так как у больных отмечаются симптомы, напоминающие гонорею: зуд, выделения, боль при мочеиспускании. Однако эти признаки менее выражены, чем при гонорее. Далее развивается восходящая инфекция, которая у женщин клинически проявляется развитием цервицита, уретрита, эндометрита, сальпингита. У мужчин в результате хламидийной инфекции возникает эпидидимит или простатит. Воспалительный процесс в органах малого таза приводит к образованию спаек и рубцов, следствием чего является развитие непроходимости маточных труб у женщин, семенных протоков у мужчин. Финалом воспалительных заболеваний малого таза хламидийной этиологии является развитие внематочной беременности у женщин, а также формирование женского и мужского бесплодия.

В некоторых случаях хламидийный уретрит может осложниться развитием экстрагенитальных осложнений и привести к болезни Рейтера. Полагают, что в основе патогенеза этого заболевания лежит аутоиммунный механизм. Показано, что выделяемый хламидиями при хроническом течении заболевания белок теплового шока сходен по своему аминокислотному составу с человеческим. Накапливаясь в организме человека, этот белок может запускать аутоиммунные процессы, приводящие к развитию реактивных артритов, синовитов нижних конечностей, асептическому уретриту и конъюнктивиту с полиморфным поражением кожи и слизистых оболочек. Кроме того, *C. trachomatis*, вероятно, стимулирует выработку антиспермальных антител. Синдром Рейтера, нередко наблюдаемый у мужчин, сочетает в себе триаду признаков: уретрит— конъюнктивит — реактивный артрит (это так называемый *уретро-окулосиновиальный синдром*).

Хламидии могут также вызывать воспалительные реакции в прямой кишке. Нередко наблюдается сочетание урогенитального хламидиоза с гонореей, трихомониазом или другими заболеваниями, передающимися половым путем (ЗППП).

10. Иммуниет

При урогенитальном хламидиозе имеет преимущественно клеточный характер. В сыворотке крови инфицированных людей могут быть обнаружены специфические антихламидийные антитела, однако они не защищают от повторного заражения, так как не являются протективными. После перенесенного заболевания иммунитет не формируется.

11. Методы лабораторной диагностики

1. Бактериоскопический метод — выявление хламидий, их морфологических структур и антигенов в пораженных клетках (клиническом материале).

Материал — соскобные препараты с доступных исследованию слизистых оболочек мочеполового (уретра, шейка матки и т.п.) и других органов (конъюнктивы, прямая кишка и пр.) при экстрагенитальных формах. Из материала готовят мазки, которые окрашивают по Романовскому-Гимзе. Цитоплазматические включения хламидий (тельца Гальбершtedтера-Провачека) содержат или крупные ретикулярные тельца или мелкие элементарные тельца. По цвету и внутренней структуре отличаются от ядра клетки и цитоплазмы. Метод

характеризуется сравнительно низкой чувствительностью, позволяет диагностировать от 10-20% случаев урогенитальной инфекции; при хламидийной патологии глаз чувствительность 90-100%.

Применение люминисцирующих поликлональных и моноклональных антител для выявления антигенов хламидий в цитоплазматических включениях в соскобных препаратах урогенитального тракта значительно увеличивает чувствительность и специфичность метода. Используется как прямой, так и непрямой иммунофлуоресцентный метод. При люминесцентной микроскопии антигены хламидий выявляют на красном или оранжевом фоне (при контрастировании синькой Эванса или родамином) цитоплазмы эпителиальных клеток в виде внутриклеточных включений ярко-зелёного цвета. По информативности и чувствительности уступает только бактериологическому методу.

При диагностике орнитоза и других зоонозных хламидиозов бактериоскопический метод не применяется.

2. Бактериологический метод. Выделение хламидий из инфекционного материала проводится заражением куриных эмбрионов, лабораторных животных или клеточных культур с последующей идентификацией возбудителя. Материал тот же, что и при бактериоскопии. При орнитозе кровь или мокрота. Кровь из вены (не менее 5 мл) исследуют в первые 7-10 дней заболевания, мокроту — до 14 дня заболевания. Для удаления сопутствующей микрофлоры добавляют антибиотики, не действующие на хламидии. (стрептомицин, нистатин, гентамицин).

При заражении куриного эмбриона исследуемый материал вводят по 0,25-0,5мл в желточный мешок 6-7 суточного развивающегося эмбриона. Обычно заражают 8-10 эмбрионов на 1 исследуемую пробу. При отсутствии специфической гибели эмбрионов спустя 4-10 суток после заражения под контролем бактериоскопии делают до 3 слепых пассажей.

Идентификация. Первичную идентификацию хламидий проводят на основании обнаружения типичных цитоплазматических включений, содержащих элементарные, ретикулярные тельца, и выявлении в их составе родоспецифического антигена (мазки-отпечатки из желточных мешков куриных эмбрионов — окраска по Маккиавелло, прямая и непрямая РИФ).

При выделении хламидий в культурах клеток (L-929, HeLa), идентификация основана на выявлении в зараженных клетках типичных цитоплазматических включений (микроскопия с окраской по Гимзе, Май-Грюнвальду), и родоспецифического антигена (РИФ). Оценку заражения клеток проводят через 48-72 часа.

При диагностике орнитоза кроме культур клеток можно заражать лабораторных животных в мозг или внутрибрюшинно.

3. Серологический метод исследования. Антитела выявляют в сыворотке крови (исследуют 2-3 раза с интервалом 10-14 дней) и секретах мочеполовых органов. Используют РСК, РПГА, РИФ.

Диагностически значимыми являются титры 1:32 — 1:64 при урогенитальных хламидиозах, 1:160 — при генерализованных инфекциях. Наиболее достоверным является нарастание титра антител в 4 и более раза. Специфические IgM и IgA обнаруживаются в секретах половых желез в титрах >1:8, IgG — > 1:256.

Вообще все применяемые лабораторные методы можно разделить на две основные группы — *методы выявления антител* и *методы выявления антигенов*.

Методы выявления антител наиболее эффективны при генерализованных формах хламидиозов, сопровождающихся выработкой антител в высоких титрах (орнитоз), и мало эффективны при локальных (особенно хронических) формах (урогенитальные хламидиозы). Большинство методов выявляет антитела к группоспецифическому липополисахариду хламидий, что не позволяет определить вид хламидий. Среди используемых методов:

- РСК — достаточно специфичный, но мало чувствительный метод;
- РПГА — более эффективный метод для диагностики текущего инфекционного заболевания;

- *ИФА* — наиболее чувствительный метод серологической диагностики. Некоторые варианты тест — систем ИФА позволяют дифференцировать *S.pneumoniae* от хламидий других видов;
- *РНИФ* — обладает наибольшей степенью видоспецифичности.

Методы выявления возбудителя, его ДНК и антигенов

1. *Цитологические методы* с окраской мазков по Романовскому — Гимзе и другими методами мало чувствительны и специфичны, имеют преимущественно историческое значение.

2. *Метод флюоресцирующих антител (МФА)* с моноклональными антителами (МКА) к группоспецифическому липополисахариду хламидий — наиболее распространенный, чувствительный и специфичный метод, позволяет выявлять локализацию возбудителя (урогенитальные мазки), морфологию (характер гранул, преобладание РТ или ЭТ). Метод требует высокой квалификации микроскописта и качества мазка — отпечатка (достаточное количество клеток с учетом внутриклеточного расположения возбудителя).

3. *ИФА для выявления антигена* применяется относительно реже, требует большого количества материала (соскоб), связана с получением суспензии и опасностью инфицирования персонала.

4. *ПЦР для выявления ДНК хламидий* — наиболее чувствительный метод. Однако и при нем возможны ложноположительные (при недостаточной чистоте работы — при контаминации) и ложноотрицательные (наличие в пробах материала ингибиторов Tag — полимеразы) результаты. Однако ПЦР в реальном времени (in real time) является самым надежным и современным методом диагностики.

Недостатки чувствительных методов выявления антигенов возбудителя — возможность получения положительных результатов даже через 1-1,5 месяца после излечения. Нужна полная замена эпителия слизистой, содержащего поверхностные антигены разрушенных хламидий, для получения отрицательных результатов. Особенно это относится к ИФА, ПЦР, для МФА — в меньшей степени (этот метод позволяет оценить морфологию включений хламидий).

12. Лечение и профилактика

Лечение комплексное. Назначают антибиотики с направленной фармакокинетикой, которые способны длительно сохраняться внутри клеток. Наиболее эффективен с этой точки зрения азитромицин из группы макролидов. В связи с тем, что хламидии лишены полноценного пептидогликана, недопустимо использование β-лактамов. Одновременно с антибиотиками назначают иммуномодуляторы, эубиотики (лактобактерин в свечах или в виде аппликаций, местно), а также местные антисептические средства. Эффективному лечению часто препятствует одновременное наличие у больных гонококков и трихомонад (в трихомонадах хламидии могут находиться внутриклеточно). Эффективность современных методов лечения уrogenитальных хламидиозов не превышает в идеале 98-99%, т.е. часть пациентов эффективно освободить от хламидий не удастся, даже после нескольких циклов лечения. У этих больных часто развиваются дисбактериозы, присоединяется кандидоз, снижается резистентность к различным инфекционным агентам.

Профилактика только неспецифическая. Должна быть направлена на своевременное выявление и лечение больных уrogenитальным хламидиозом. Для профилактики хламидиоза новорожденных беременным женщинам с хламидийной инфекцией назначают эритромицин (под контролем врача). К сожалению, закапывание в глаза новорожденным сульфацил-натрия, практикуемое для профилактики бленнореи, а также применение глазных мазей с эритромицином и тетрациклином не защищают от хламидийного конъюнктивита. Немаловажное значение имеет соблюдение правил личной гигиены, использование презервативов при половом контакте и выполнение других мероприятий, рекомендованных для профилактики ЗППП.

Возбудители уrogenитального микоплазмоза

1. Таксономия и классификация

Современная систематика относит представителей семейства *Mycoplasmatacea* к классу *Mollicutes* (молликут — “мягкокожих”), объединяющему *микоплазмы*, *уреаплазмы*,

ахлеплазмы (первые три рода молликут встречаются у человека, среди них встречаются патогенные и сапрофитические виды), *спироплазмы* и *анаэроплазмы*.

M. hominis, *M. genitalium* и *U. urealyticum* — «урогенитальные микоплазмы» — относятся к семейству *Mycoplasmataceae*, порядку *Mycoplasmatales*, классу *Mollicutes*, роду *Mycoplasma*.

2. Нозологические формы

Заболевания человека, вызываемые микоплазмами, объединяют в группу микоплазмозов. Это антропонозные бактериальные инфекции, вызываемые микоплазмами, поражающими, в зависимости от вида возбудителя, органы дыхания или мочеполовой тракт и редко другие органы.

Возбудители этой группы инфекций — микоплазмы являются самыми мелкими свободноживущими бактериями. Они привлекают большое внимание исследователей по двум причинам: из-за своей уникальной организации и в силу того, что очень часто контаминируют культуры клеток, вызывают заболевания растений, животных и человека, оказывают влияние на размножение ряда вирусов, в том числе онкогенных и ВИЧ, и сами способны вызывать иммунодефициты.

Микоплазмы широко распространены в природе. В настоящее время известно около 100 видов, они имеются у растений, моллюсков, насекомых, рыб, птиц, млекопитающих, некоторые входят в состав микробных ассоциаций организма человека. От человека выделяют 15 видов микоплазм; 6 видов: *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans (incognitis)*, *M. penetrans* и *U. urealyticum* обладают потенциальной патогенностью. *M. pneumoniae* колонизирует слизистую оболочку респираторного тракта; *M. hominis*, *M. genitalium* и *U. urealyticum* обитают в уrogenитальном тракте.

3. Эпидемиология и пути передачи

Источник инфекции — больной человек; микоплазмы и уреоплазмы инфицируют 25—80 % лиц, ведущих активную половую жизнь и имеющих трех и более партнеров. Механизм передачи — контактный; основной путь передачи — половой, на основании чего заболевание включают в группу ЗППП; восприимчивость высокая. Основные группы риска — проститутки и гомосексуалисты; уреоплазмы значительно чаще выявляют у больных гонореей, трихомониазом, кандидозом.

Устойчивость в окружающей среде низкая, особенно у «урогенитальных микоплазм». Микоплазмы и уреоплазмы чувствительны к фторхинолонам, макролидам, цефалоспорином, азалидам и тетрациклинам; 10 % уреоплазм резистентны к тетрациклинам и макролидам. Чувствительны к действию обычно применяемых антисептиков и дезинфектантов.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

Микоплазмы — самые мелкие прокариотические микроорганизмы, *не имеющие клеточной стенки* (это придает им сходство с L-формами бактерий) и способные к *паразитированию на мембранах эукариотических клеток*. Способность *персистировать* на мембранах клеток связана с наличием сходства структуры и состава цитоплазматической мембраны микоплазм с мембранами клеток эукариот и использовании микоплазмами их компонентов (прежде всего холестерина и фосфолипидов) для построения собственных структур. Микоплазмы имеют трехслойную цитоплазматическую мембрану, обеспечивающую целостность микробных клеток и частично замещающую в функциональном отношении отсутствующую клеточную стенку.

Отсутствие ригидной клеточной стенки и ее предшественников обуславливает ряд биологических свойств:

- полиморфизм клеток,
- пластичность, \
- осмотическую чувствительность,
- способность проходить через поры с диаметром 0,22 мкм,
- резистентность к различным агентам, подавляющим синтез клеточной стенки, в том числе к пенициллину и его производным,

-множественность путей репродукции (бинарное деление, почкование, фрагментация нитей, цепочечных форм и шаровидных образований).

Клетки размером 0,1—1,2 мкм, граммотрицательны, но лучше окрашиваются по Романовскому—Гимзе. Различают подвижные и неподвижные виды.

Минимальной репродуцирующей единицей является элементарное тельце (0,7—0,2 мкм) сферическое или овальное, позднее удлинняющееся вплоть до разветвленных нитей. Клеточная мембрана включает белки, мозаично погруженные в два липидных слоя, основной компонент которых — холестерин, и находится в жидкокристаллическом состоянии. Размер генома бактерий наименьший среди прокариот (составляет 1/16 генома риккетсий). Возбудители обладают минимальным набором органелл (нуклеоид, цитоплазматическая мембрана, рибосомы). Простота организации, ограниченность генома определяют ограниченность их биосинтетических возможностей.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Хемоорганотрофы. У большинства видов микоплазм метаболизм бродильный. Основной источник энергии — глюкоза или аргинин. Растут при температуре от 22 до 41°C (оптимум — 36-37°C); pH питательной среды — 6,8—7,4. Большинство видов — факультативные анаэробы. Бактерии чрезвычайно требовательны к питательным средам и условиям культивирования. Питательные среды должны содержать все предшественники, необходимые для синтеза макромолекул, обеспечивать микоплазмы источниками энергии, холестерином, его производными и жирными кислотами. Для этого используют экстракт говяжьего сердца и мозга, дрожжевой экстракт, пептон, ДНК, НАД в качестве источника пуринов и пиримидинов, которые микоплазмы синтезировать не могут. Дополнительно в среду вносятся: глюкозу — для видов, ферментирующих ее; мочевины — для уреоплазм и аргинин — для видов, не ферментирующих глюкозу. Источником фосфолипидов и стиролов служит сыворотка крови животных, для большинства микоплазм — сыворотка крови лошади.

Осмотическое давление среды должно быть в пределах 10—14 кгс/см² (оптимальное значение — 7,6 кгс/см²), что обеспечивается введением ионов K⁺ и Na⁺. Виды, ферментирующие глюкозу, лучше растут при более низких значениях pH (6,0—6,5). Требования к аэрации различны у различных видов, большинство видов лучше растет в атмосфере, состоящей из 95 % азота и 5 % углекислого газа.

Микоплазмы культивируют на жидких, полужидких и плотных питательных средах. Некоторые виды, например *M. pneumoniae*, можно культивировать на стекле или пластике в виде монослоя, как культуры клеток. Большинство видов размножается медленно, культивирование продолжается несколько дней или даже недель (*M. pneumoniae*, *M. genitalium*). *M. hominis* достигает начала стационарной фазы роста только через 48—72 ч, титр культуры составляет 10⁷—10⁸ КОЕ/мл. Такой титр сохраняется в стационарной фазе роста в течение 5—7 суток культивирования. Уреоплазмы имеют очень короткую стационарную фазу, их жизнеспособность резко падает уже через 24 ч, когда погибает приблизительно 90 % клеток, особенно в плохо забуференной среде. Бульонные культуры микоплазм слегка опалесцируют; уреоплазмы не вызывают помутнения среды даже при титре 10⁷ КОЕ/мл. В толще полужидкого агара микоплазмы и уреоплазмы образуют светлое облачко по ходу укола пипетки, заметное в проходящем свете. На плотных средах микоплазмы образуют характерные мелкие колонии (0,1—0,3 мм) с приподнятым центром («яичница глазунья»), имеющие тенденцию вращаться в среду и нежной, часто ажурной периферией; уреоплазмы образуют очень мелкие колонии (0,01—0,03 мм в диаметре). Рост подавляется специфическими иммунными сыворотками.

Для культивирования пригодны куриные эмбрионы, которые погибают после 3—5 пассажей.

6. Антигенная структура

Микоплазмы характеризуются выраженной гетерогенностью и изменчивостью антигенной структуры (антигенный полиморфизм). Основные АГ представлены фосфо- и гликолипидами, полисахаридами и белками; наиболее иммуногенны поверхностные АГ, включающие углеводы в составе сложных гликолипидных, липогликановых и гликопротеиновых

комплексов. Антигенная структура может изменяться после многократных пассажей на бесклеточных питательных средах. Характерен выраженный антигенный полиморфизм с высокой частотой мутаций.

M. hominis в мембране содержит 9 интегральных гидрофобных белков, из которых лишь 2 более или менее постоянно присутствуют у всех штаммов.

У уреоплазм выделяют 16 сероваров, разделенных на 2 серогруппы — А и В; основные антигенные детерминанты — поверхностные полипептиды. Выделяют биовары уреоплазм, отличающиеся по вирулентности и строению гена основного фермента — уреазы.

7. Биохимические свойства

Биохимическая активность низкая. Выделяют 2 группы микоплазм: разлагающие с образованием кислоты глюкозу, мальтозу, маннозу, фруктозу, крахмал и гликоген («истинные» микоплазмы) и восстанавливающие соединения тетразолия, окисляющие глутамат и лактат, но не ферментирующие углеводы. Все виды не гидролизуют мочевины и эскулин.

Уреоплазмы инертны к сахарам, не восстанавливают диазакрасители, каталазаотрицательны; проявляют β-гемолитическую активность к эритроцитам кролика и морской свинки; продуцируют гипоксантин. Уреоплазмы секретируют фосфолипазы А1, А2 и С; протеазы, селективно действующие на молекулы IgA и уреазу. Отличительная особенность метаболизма — способность продуцировать насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты.

8. Факторы патогенности

Разнообразны и могут значительно варьировать; основные факторы — адгезины, токсины, ферменты агрессии и продукты метаболизма. Адгезины входят в состав поверхностных АГ и обуславливают адгезию на клетках хозяина, что имеет ведущее значение в развитии начальной фазы инфекционного процесса. Экзотоксины в настоящее время идентифицированы лишь у нескольких непатогенных для человека микоплазм, в частности у *M. neurolyticum* и *M. gallisepticum*; мишени для их действия — мембраны астроцитов. Предполагают наличие нейротоксина у некоторых штаммов *M. pneumoniae*, так как часто инфекции дыхательных путей сопровождаются поражениями нервной системы. Эндотоксины выделены у многих патогенных микоплазм; их введение лабораторным животным вызывает пирогенный эффект, лейкопению, геморрагические поражения, коллапс и отек легких. По своей структуре и некоторым свойствам они несколько отличаются от ЛПС грамотрицательных бактерий. У некоторых видов встречаются гемолизины (наибольшей гемолитической активностью обладает *M. pneumoniae*); большая часть видов вызывает выраженный (β-гемолиз, обусловленный синтезом свободных кислородных радикалов. Предположительно микоплазмы не только сами синтезируют свободные кислородные радикалы, но и индуцируют их образование в клетках, что ведет к окислению мембранных липидов. Среди ферментов агрессии основными факторами патогенности являются фосфолипаза А и аминоксипептидазы, гидролизующие фосфолипиды мембраны клетки. Многие микоплазмы синтезируют нейраминидазу, которая осуществляет взаимодействие с поверхностными структурами клетки, содержащими сиаловые кислоты; кроме того, активность фермента нарушает архитектуру клеточных мембран и межклеточные взаимодействия. Среди прочих ферментов следует упомянуть протеазы, вызывающие дегрануляцию клеток, в том числе и тучных, расщепление молекул АТ и незаменимых аминокислот, РНКазы, ДНКазы и тимидинкиназы, нарушающие метаболизм нуклеиновых кислот в клетках организма. До 20 % общей ДНКазной активности сосредоточено в мембранах микоплазм, что облегчает вмешательство фермента в метаболизм клетки. Некоторые микоплазмы (например, *M. hominis*) синтезируют эндопептидазы, расщепляющие молекулы IgA на интактные мономерные комплексы.

9. Патогенез

Микоплазмы — мембранные паразиты. Они могут быть обнаружены лишь внутри тех клеток, которые способны к фагоцитозу, за исключением *M. penetrans* и некоторых штаммов *M. fermentans*, активно проникающих в клетки. Способность микоплазм паразитировать на мембране эукариотической клетки во многом определяет патогенез вызываемых ими инфекций, который включает формирование местных воспалительных и генерализованных

аутоиммунных реакций. Микоплазмы проникают в организм, мигрируют через слизистые оболочки и прикрепляются к эпителию сначала посредством неспецифического, а затем лигандрецепторного взаимодействия через сиалогликопротеиновые рецепторы, а также посредством связывания поверхностных белков с различными рецепторами. Микробы не проявляют выраженного цитопатогенного действия, но вызывают значительные нарушения функциональных свойств клеток с последующим развитием местных воспалительных реакций. Взаимодействие с рецепторным аппаратом клеток может приводить к нарушению их антигенной структуры и запуску аутоиммунных процессов. Дефекты системы комплемента создают условия для персистенции возбудителя, что ведет к расстройствам гемостаза, повреждению эндотелия, гиперагрегации тромбоцитов, активации плазменных факторов свертывания и развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания.

Основные эффекты действия микоплазм на различные клетки:

1. Взаимодействие с фагоцитирующими клетками вызывает цитопатический или цитотоксический эффект и гибель фагоцитов или приводит к длительной персистенции микоплазм в фагосомах фагоцитов.

2. Воздействие микоплазм на макрофаги приводит к нарушению их функций.

3. Персистенция микоплазм на мембранах лимфоидных клеток оказывает существенное влияние на их функции, в том числе непосредственное деструктивное воздействие на иммунокомпетентные клетки (*M. fermentans* оказывает СПИДо — подобное действие на иммунную систему).

4. Микоплазмы действуют на эритропоэз, т.е. на гомеостаз организма.

5. Обмен антигенными компонентами мембран с клетками хозяина обеспечивает антигенную мимикрию и развитие аутоиммунных реакций.

6. Отсутствие клеточной стенки и частая локализация микоплазм в инвагинатах мембран клеток объясняет их слабую иммуногенность и защиту от действия антител. Этому способствует и высокая антигенная изменчивость молликут.

7. Микоплазмы способны воздействовать на хромосомный аппарат клеток хозяина (на соматические и половые клетки), вызывая хромосомные абберации.

8. Ряд продуктов метаболизма оказывает токсическое воздействие на инфицированные клетки. Так, глюкозоферментирующие микоплазмы резко снижают рН и оказывают этим деструктивное действие на эпителиальные клетки.

Урогенитальные микоплазмы вызывают острые, но чаще хронические гнойно-воспалительные заболевания мочеполового тракта. Доказана их роль в развитии негонококковых уретритов, спонтанных абортх, преждевременных родах, привычном невынашивании беременности, рождении детей с низкой массой тела и пороками развития, бесплодия мужчин и женщин. Вместе с тем микоплазмозительство не всегда является показателем патологического процесса. Состояние иммунной системы, физиологическое состояние и гормональный фон человека, наличие других сопутствующих инфекций могут способствовать активации репродукции «урогенитальных микоплазм» и развитию клинически выраженного патологического процесса.

10. Иммунитет

Развитие иммунного ответа не сопровождается формированием специфической резистентности; для респираторного и урогенитального микоплазмоза характерны случаи повторного заражения. Фагоцитоз незавершенный, при отсутствии АТ макрофаги не способны фагоцитировать микоплазмы, что обусловлено наличием микрокапсул, поверхностных АГ, перекрестно реагирующих с АГ некоторых тканей организма человека (легкие, печень, головной мозг, поджелудочная железа, гладкая мускулатура и эритроциты).

В цитоплазме нейтрофилов возбудитель сохраняет свою жизнеспособность. Микоплазмы чувствительны к компонентам комплемента, их дефицит или дефекты создают условия для персистенции возбудителя. Короткоживущие IgA определяют элиминацию возбудителя со слизистых оболочек; поликлональная стимуляция лимфоцитов ведет к формированию инфильтратов в легочной ткани, появлению перекрестно реагирующих АТ и развитию ГЗТ. Для микоплазмоза характерно развитие аутоиммунных реакций. Инфекция *M. fermentans*

сопровождается образованием АТ к IgG (за счет связывания Fc-фрагментов), т. е. ревматоидного фактора, участвующего в повреждении клеток. Повреждение суставных тканей индуцируют АТ, перекрестно реагирующие с АГ тканей организма при повреждении целостности хрящевой ткани и обнажении «скрытых» клеточных АГ.

11. Методы лабораторной диагностики

Для лабораторной диагностики микоплазменных инфекций используют *культуральный, серологический и молекулярно-генетический методы*.

При урогенитальных инфекциях исследуют срединную порцию утренней мочи, соскобы со слизистой уретры, сводов влагалища, цервикального канала, материал, полученный при лапароскопии, амниоцентезе, мазки-отпечатки тканей органов мертворожденных и абортированных плодов. При простатите исследуют секрет простаты, при мужском бесплодии — сперму.

Наиболее оптимальна *культуральная (бактериологическая) диагностика* с использованием жидких и плотных питательных сред, особенно в сочетании с антибиотикограммой и определением титра микоплазм (уреаплазм) в нативных образцах. Преимущества этого подхода: быстрота (для уреаплазм 1-2 суток, для микоплазм — до 3 суток), простота (цветной пробирочный тест), достоверность (селективность сред, учет биохимизма возбудителей), возможность определения концентрации (титр 10000 цветообразующих единиц — ЦОЭ имеет диагностическое значение) и чувствительности к различным препаратам на основе антибиотикограммы (повышает эффективность лечения), возможность достоверного контроля эффективности лечения (растут только жизнеспособные микоплазмы).

Молекулярно-биологические методы диагностики включают молекулярную гибридизацию (МГ) на основе ДНК-зондов и ПЦР. Наиболее чувствительна *ПЦР — диагностика*. Метод позволяет идентифицировать виды микоплазм при наличии 10 000-100 000 клеток на пробу. ПЦР позволяет выявить единичные клетки микоплазм. Однако: возможны ложно-положительные и ложно-отрицательные результаты, длительность выявления положительных результатов контроля излеченности, невозможность определения титра микоплазм (не разработаны количественные методики) и чувствительности к препаратам. Тем не менее современный метод ПЦР в реальном времени лишен многих этих недостатков.

Серологические методы многочисленны, однако коммерческие препараты отсутствуют, существуют проблемы в интерпретации результатов. При серодиагностике материалом для исследования служат мазки-отпечатки тканей, соскобы из уретры, цервикального канала и влагалища, секрет простаты и сперма, в которых можно обнаружить АГ микоплазм в прямой и непрямой РИФ. Микоплазмы и уреаплазмы окрашиваются в ярко-зеленый цвет и выявляются на поверхности анализируемых клеток в виде зеленых гранул, расположенных группами или по одиночке, окрашенные зеленые гранулы могут располагаться в неклеточном пространстве. Цитоплазма клеток окрашивается в красно-бурый цвет. Результат считается положительным, если в препарате обнаруживаются не менее 10 светящихся зеленых гранул, расположенных на мембране клеток. *Люминесцентная диагностика* дает неудовлетворительные результаты чаще, чем при выявлении хламидий. Это связано с малыми линейными размерами возбудителей, серологической гетерогенностью и антигенной изменчивостью, возможностью перекрестных реакций между различными видами, наличием диагностических препаратов только для выявления уреаплазм и *M. hominis*.

АГ микоплазм могут быть обнаружены также в сыворотке крови больных. Для этого используют реакцию агрегат-гемагглютинации (РАГА) и ИФА. Особенность РАГА заключается в том, что для сенсibilизации эритроцитов используют агрегированные глутаровым альдегидом белки иммунной сыворотки, при этом АТ вводятся в состав трехмерных белковых комплексов, вследствие чего часть активных центров АТ отдалается от поверхности эритроцита и становится более доступной для детерминант АГ.

12. Лечение и профилактика

Лечение должно быть основано на подборе чувствительных антибиотиков (чаще применяют макролиды, тетрациклины — доксициклин) и бактериологическом контроле эффективности лечения. Имеются устойчивые к тетрациклинам, макролидам и другим антибиотикам штаммы (связано с наличием плазмид устойчивости). Направленная этиотропная химиотерапия обычно дает хороший эффект, однако исчезновение клинической симптоматики часто не означает полную элиминацию возбудителя. У микоплазм имеются специфические вирусы, в т.ч. бактериофаги. В лечебных и диагностических целях они до настоящего времени не используются.

Специфическая профилактика отсутствует. Не специфическая профилактика направлена на ликвидацию источника инфекции; на разрыв механизма и путей передачи; а также на повышение невосприимчивости коллектива к инфекции.

Возбудители трихомоноза

1. Таксономия и классификация

Trichomonas vaginalis относится к типу *Sarcomastigophora*, подтипу *Mastigophora*, классу *Zoomastigophoreae*, отряду *Trichomonadida*. Различают также комменсалы — ротовую (*T. tenax*) и кишечную (*T. hominis*) трихомонады.

Трихомоноз — антропонозное венерическое заболевание (инвазия), вызываемая мочеполовой трихомонадой; проявляющееся комплексным воспалительным поражением различных участков мочеполовой системы. *T. vaginalis* впервые выделил А. Доннк (1837). Трихомонады выделяют из влагалища и мочеиспускательного канала женщин, мочеиспускательного канала и предстательной железы мужчин (человек — единственный природный хозяин).

2. Нозологические формы

В организме человека также обитают трихомонады-комменсалы:

- в полости рта — *T. tenax* (*T. elongata*), выделяемая из зубных камней и кариозных дефектов зубов;

- в толстом кишечнике — *T. hominis*, выделяемая при диспептических расстройствах.

Трихомоноз распространён повсеместно. До 25% женщин, ведущих активную половую жизнь, инфицированы трихомонадами. Риск заражения коррелирует с частотой половых контактов. Частота трихомоноза у мужчин и женщин одинакова.

3. Эпидемиология и пути передачи

Заболевание передается половым путем, через родовые пути (младенцу), редко — через предметы личной гигиены. В окружающей среде быстро погибает; на банных губках и мочалках сохраняется 10—15 мин, а в слизи, сперме и моче — 24 ч.

4. Морфологические и тинкториальные свойства

T. vaginalis цист не образует. Существует только как трофозоит, размножается делением. Возбудитель имеет грушевидное тело 14–30 мкм длиной, вытянутое ядро, смещённое в передний конец, и вакуолизированную цитоплазму. На переднем конце расположены четыре жгутика и ундулирующая мембрана, доходящая только до середины тела. Сквозь всё тело проходит осевая нить — аксостиль, выступающая на заднем конце в виде шипика.

5. Питательные среды и культуральные свойства

T. vaginalis можно культивировать на питательных средах, на клеточных культурах и куриных эмбрионах. Наиболее пригодная среда для культивирования — печёночная среда с цистеином, пептоном и мальтозой. Трихомонады предпочитают анаэробные условия, pH 5,5–6,0, температуру культивирования 35–37 °C.

6. Антигенная структура

T. vaginalis может сорбировать на своей поверхности белки плазмы (антигенная мимикрия), что не позволяет иммунной системе идентифицировать паразита как чужеродный организм.

7. Биохимические свойства

T. vaginalis демонстрирует черты, являющиеся общими для всех анаэробов в отношении углеводного и энергетического метаболизма, что контролируется ферментами, работающими как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Продукты метаболизма включают ацетат, лактат, малат, глицерол, CO₂, а в анаэробных условиях — водород.

8. Факторы патогенности

1. Контакт — зависимые механизмы, связанные с подвижностью трихомонад и их адгезивной активностью. Активно двигаясь, трихомонады заселяют различные участки эпителия уретры или влагалища. Благодаря пластичности, трихомонады полностью повторяют рельеф эпителиоцитов, на поверхности которых проходит их жизненный цикл.

2. Контакт — независимые механизмы: способность к фагоцитозу, цитотоксическая активность, секреция многочисленных протеаз, фосфолипазная активность и др. В зоне прикрепления простейших к эпителиальным клеткам наблюдается разрушение плазматических мембран клеток с последующим формированием в кортикальном слое трихомонад пищеварительных вакуолей, содержащих дендрит разрушенных трихомонадами эпителиоцитов. Установлено, что в процессах пищеварения трихомонад, а также их способности проникать глубоко в субэпителиальные слои важная роль принадлежит

выделяемому ими комплексу ферментов и, в первую очередь, протеиназам, что приводит к значительному разрыхлению тканей и проникновению в межклеточное пространства токсических продуктов обмена трихомонад и бактерий сопутствующей флоры.

3. Способность возбудителя избегать литическую активность комплемента и клеточно-опосредованные иммунные реакции организма хозяина, что является важнейшим аспектом патогенеза заболевания.

9. Патогенез

Попав на слизистую оболочку мочеполовых путей, *T. vaginalis* вызывает воспалительную реакцию. Клинически характерны зуд, жжение, дизурические расстройства, боли при половых актах. Выраженность симптомов варьирует в течение недель и месяцев. Примерно в 75% случаев «свежего» трихомоноза наблюдают серозно-гнойные выделения. У женщин *T. vaginalis* вызывает острый или подострый вагинит. У мужчин обычны поражения мочеиспускательного канала и предстательной железы, иногда эпидидимит. Хронизация процесса почти в 100% случаев приводит к развитию хронического простатита.

Trichomonas vaginalis вызывает вагинит, уретрит, простатит. Воспалительный процесс сопровождается болью, зудом, гнойно-серозными выделениями. Часто болезнь протекает бессимптомно.

10. Иммуитет

Не изучен.

11. Методы лабораторной диагностики

При микроскопическом методе выявляют трихомонады в нативных и окрашенных мазках из отделяемого мочеиспускательного канала, секрета предстательной железы или осадка мочи, окрашенных метиленовым синим или по Романовскому— Гимзе. При фазово-контрастной микроскопии нативных препаратов наблюдается подвижность трихомонад. Нативный препарат готовят на предметном стекле, смешивая отделяемое с каплей теплого изотонического раствора хлорида натрия. При приготовлении препарата «висячая капля» наносят каплю исследуемого материала на покровное стекло со смазанными вазелином краями, после чего его переворачивают каплей вниз и помещают на предметное стекло с лункой. Препараты исследуют с объективом х40 и окуляром х10. Трихомонады по размеру близки к лейкоцитам и имеют характерные толчкообразные движения ундулирующей мембраны и жгутиков.

При хронических формах трихомонады выращивают на питательных средах, например СКДС (солевой раствор с гидролизатами казеина, дрожжей и с мальтозой).

12. Лечение и профилактика

Препарат выбора — метронидазол (флагил, трихопол). Препарат назначают внутрь, внутривенно или внутривагинально. Эффективность химиотерапии достигает 95%. Основное условие эффективного лечения — одновременное лечение обоих партнёров.

Профилактика аналогична проводимой при венерических заболеваниях.

III. План практической работы

1. Микроскопировать с масляной иммерсией демонстрационные микропрепараты, приготовленные из уретры, окрашенные метиленовой синью, зарисовать, дать заключение.

Материалом для исследования служит гнойное отделяемое из уретры (возможно использование материала, взятого из секрета предстательной железы или осадка первой порции мочи). Этапы приготовления мазка и порядок проведения иммерсионной микроскопии см. с.11-12. Окрашивание мазка осуществляется простым методом с использованием водного раствора метиленового синего. Продолжительность окраски составляет 1 минуту, после чего микропрепарат промывают водой, высушивают и микроскопируют.

При положительном результате в поле зрения видны лейкоциты и диплококки в виде "кофейных зерен", расположенные как внеклеточно, так и внутри лейкоцитов.

Заключение: в исследуемом материале обнаружен возбудитель гонореи — *Neisseria gonorrhoeae*.

2. Микроскопировать с масляной иммерсией демонстрационные микропрепараты, приготовленные из отделяемого влагалища, окрашенные метиленовой синью, зарисовать, дать заключение.

Материалом для исследования служит отделяемое из влагалища. Окрашивание мазка осуществляется простым методом с использованием 1% водного раствора метиленового синего. Высушенный на воздухе мазок фиксируется, высушивается, после чего на него наносится на 1 мин раствор метиленового синего. Оставшийся краситель осторожно смывается слабой струей холодной воды и мазок высушивается. Трихомонады в препарате имеют округлую или овальную, грушевидную форму, с интенсивно окрашенными в синий цвет ядрами; цитоплазма клеток светло-синяя, с нежной сетчатой структурой, вакуоли — бесцветны.

Заключение: в исследуемом материале обнаружен возбудитель трихомоноза — *Trichomonas vaginalis*.

3. Разобрать схему постановки и учесть РСК в серодиагностике хронической гонореи.

Метод диагностики: серологический — используют для выявления антител к возбудителю гонореи в сыворотке крови больного.

Компоненты: исследуемая сыворотка больного человека (в которой ищут антитела к возбудителю гонореи), гонорейный диагностикум (взвесь убитых гонококков), комплемент в рабочей дозе и гемолитическая система (состоящая из гемолитической сыворотки кролика и эритроцитов барана), гонорейная диагностическая сыворотка и физиологический раствор.

Постановка: в рабочую пробирку вносят исследуемую сыворотку больного человека в титре 1:8, гонорейный диагностикум, комплемент в рабочей дозе. Контроли: 1 пробирка — контроль сыворотки больного. В тест-системе находятся сыворотка больного, комплемент и физиологический раствор; 2 пробирка — контроль комплемента: гонорейная диагностическая сыворотка, гонорейный диагностикум и комплемент; 3 пробирка — контроль диагностикума: гонорейный диагностикум, комплемент и физиологический раствор.

После инкубации опытной и контрольных пробирок в течение 30-40 минут при температуре 37°C в них добавляют гемолитическую систему и снова инкубируют 40 минут при температуре 37 °C.

Учет реакции начинают с контролей.

1 контроль сыворотки больного — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Комплемент не связался в тест-системе с компонентами сыворотки, т.к. нет комплекса Аг-Ат, поэтому после добавления гемолитической системы в присутствии свободного комплемента произошел гемолиз эритроцитов. Контроль правильный.

2 контроль комплемента — гемолиз отсутствует, на дне пробирки осадок эритроцитов. В тест-системе составлен заведомо положительный комплекс Аг-Ат, и комплемент в рабочей дозе полностью с ним связался без остатка. При добавлении гемолитической системы в отсутствие комплемента гемолиза не происходит, и эритроциты выпадают в осадок. Контроль правильный.

В случае передозировки комплемента в данной пробирке произойдет гемолиз.

3 контроль диагностикума — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Комплемент не связался в тест-системе с антигенами диагностикума, т.к. нет комплекса Аг-Ат, поэтому после добавления гемолитической системы в присутствии свободного комплемента произошел гемолиз эритроцитов. Контроль правильный.

Опытная пробирка: положительная реакция «+» — пробирка с ровным осадком в виде «красной пуговки», гемолиз отсутствует (возбудитель гонореи и антитело образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент, т.е. происходит связывание комплемента комплексом Аг-Ат. При добавлении гемолитической системы гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет, т.к. комплемент весь израсходован на формирование первоначального иммунного комплекса. Отрицательная реакция «-» — содержимое пробирки равномерно красного цвета («лаковая кровь») — гемолиз эритроцитов. Если антиген и антитело не

соответствуют друг другу, т.е. в исследуемом образце нет антитела, комплемент остается свободным и присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело (гемолитическая система), вызывая гемолиз.

Заключение: Исследуемая сыворотка содержит антитела к возбудителю гонореи.

4. Разобрать схему постановки и учесть реакцию Вассермана (РСК) в серодиагностике сифилиса.

Метод диагностики: серологический — используют для выявления противосифилитических антител в сыворотке крови больного. Исследование антител сыворотки пациента осуществляют с двумя антигенами: специфическим — ультразвуковым (взвесь трепонем инактивированных ультразвуком) и неспецифическим — кардиолипиновым (липиды мышц бычьего сердца). Использование кардиолипинового (нетрепонемного) антигена повышает чувствительность реакции.

Компоненты: исследуемая сыворотка больного человека (в которой определяют антитела к возбудителю сифилиса), специфический диагностикум, неспецифический (кардиолипиновый) диагностикум комплемент в рабочей дозе и гемолитическая система (состоящая из гемолитической сыворотки кролика и эритроцитов барана), специфическая (трепонемная) диагностическая сыворотка и физиологический раствор.

Постановка: в две рабочие пробирки вносят исследуемую сыворотку больного человека 1:4 и комплемент в рабочей дозе. Затем в первую пробирку добавляют специфический диагностикум, а во вторую — кардиолипиновый. Контроли: 1 пробирка — контроль сыворотки больного. В тест-системе находятся сыворотка больного, комплемент и физиологический раствор; 2 пробирка — контроль комплемента: специфическая (трепонемная) диагностическая сыворотка, специфический диагностикум и комплемент; 3 пробирка — контроль диагностикума: специфический диагностикум, комплемент и физиологический раствор.

После первичной 45-минутной инкубации в термостате при 37°C добавляют во все пробирки гемолитическую систему. Легким встряхиванием перемешивают содержимое пробирок и помещают их в термостат при 37°C на 45-60 минут. Регистрируют результат реакции по наличию или отсутствию гемолиза в опытных пробирках.

Учет реакции начинают с контролей.

1 контроль сыворотки больного — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Комплемент не связался в тест-системе с компонентами сыворотки, т.к. нет комплекса Аг-Ат, поэтому после добавления гемолитической системы в присутствии свободного комплемента произошел гемолиз эритроцитов. Контроль правильный.

2 контроль комплемента — гемолиз отсутствует, на дне пробирки осадок эритроцитов. В тест-системе составлен заведомо положительный комплекс Аг-Ат, и комплемент в рабочей дозе полностью с ним связался без остатка. При добавлении гемолитической системы в отсутствие комплемента гемолиза не происходит, и эритроциты выпадают в осадок. Контроль правильный.

В случае передозировки комплемента в данной пробирке произойдет гемолиз.




3 контроль диагностикума — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Комплемент не связался в тест-системе с антигенами диагностикума, т.к. нет комплекса Аг-Ат, поэтому после добавления гемолитической системы в присутствии свободного комплемента произошел гемолиз эритроцитов. Контроль правильный.

Опытная пробирка: полная задержка гемолиза — ++++ (резко положительная реакция) — пробирка с ровным осадком в виде «красной пуговки» (антиген и антитело образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент, т.е. происходит связывание комплемента комплексом антиген — антитело. При добавлении гемолитической системы гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет, т.к. комплемент весь израсходован на формирование первоначального иммунного комплекса; значительная задержка гемолиза — +++ (положительная реакция); частичная задержка гемолиза — ++ (слабоположительная реакция); незначительная задержка гемолиза — +; сомнительная реакция — +/- . Отрицательный результат реакции

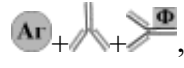
характеризуется полным гемолизом во всех пробирках опыта — содержимое пробирки равномерно красного цвета — гемолиз эритроцитов («лаковая кровь»). Если антиген и антитело не соответствуют друг другу, т.е. в исследуемом образце нет антител, комплемент остается свободным и присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело (гемолитическая система), вызывая гемолиз.

Заключение: Исследуемая сыворотка содержит антитела к возбудителю сифилиса, наблюдается резко положительная реакция RW (++++).

5. Изучить постановку и учет ИФА с целью диагностики урогенитального хламидиоза и микоплазмоза.

Ингредиенты реакции: исследуемая сыворотка для выявления антител  к урогенитальному хламидиозу и/или микоплазмозу, лунки планшеток с сорбированным антигеном урогенитального хламидиоза и/или микоплазмоза , антиглобулиновая сыворотка, меченая ферментом (пероксидазой хрена)  и субстрат/хромоген для фермента (перекись водорода + Ортофенилендиамин, ОФД)

Постановка ИФА. В опытные лунки планшеток с сорбированным антигеном добавляют исследуемую сыворотку больного, а в контрольные: заведомо положительные сыворотки (2-3 лунки), заведомо отрицательные сыворотки (2-3 лунки). Выдерживают 60 мин. при комнатной температуре и промывают каждую лунку буферным раствором для удаления несвязующих компонентов. В каждую лунку вносят антиглобулиновую сыворотку, меченую ферментом (пероксидазой хрена). Выдерживают 60 мин. при комнатной температуре и промывают каждую лунку буферным раствором для удаления несвязующих компонентов. Затем добавляют субстрат/хромоген для фермента (перекись водорода + Ортофенилендиамин, ОФД).

Учёт ИФА. При образовании комплекса , субстрат (перекись водорода) расщепляется ферментом (пероксидазой хрена) на конечные продукты кислород и воду. В присутствии кислорода индикатор, ОФД, изменяет цвет продукта реакции — с бесцветного на желтый или темно-коричневый. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител. Учет реакции производят путем определения оптической плотности содержимого каждой лунки (контрольных и рабочих) с помощью фотоколориметра не более чем через 30 минут с момента постановки реакции.

1. Определение специфичности контролей: контроли специфичны, если ср. знач. ОП «+» контролей >1 , а ср. знач. ОП ср «-» $<0,2$.

2. Определение результата реакции:

результат положительный, если ОП рабочей лунки $>$ ОП крит.,

результат отрицательный, если ОП рабочей лунки $<$ ОП крит.

ОП крит. = ср. знач. ОП K^+ $0,200$, где ОП крит.-критическое значение оптической плотности; ср. знач. ОП K^- — среднее значение оптической плотности отрицательных контролей; $0,200$ — коэффициент, устанавливаемый методом статистической обработки результатов на предприятии-изготовителе тест-системы.

Заключение: в исследуемой сыворотке содержатся антитела к возбудителю урогенитального хламидиоза и/или микоплазмоза, если контроли специфичны.

IV. Решение ситуационных задач

Ситуационная задача.

Поступил больной А. 35 лет с жалобами на зуд и жжение при мочеиспускании. В анамнезе — частые беспорядочные половые связи. Врач-венеролог взяла материал из уретры, сделала мазок и отправила в лабораторию, где его окрасили метиленовым синим. В результате микроскопического исследования в мазке обнаружены диплококки в форме «кофейных зерен» темно-синего цвета. При посеве материала на сывороточный агар с ристомицином через сутки инкубации при температуре 37°C возбудитель образует мелкие, круглые, прозрачные колонии в виде «капель росы».

Назовите предполагаемого возбудителя заболевания:

- 1) *Treponema pallidum*
- 2) *Trichomonas vaginalis*
- 3) *Neisseria gonorrhoeae*
- 4) *Mycoplasma genitalium*
- 5) *Chlamydia trachomatis*

Назовите факторы патогенности возбудителя:

- 1) *капсула*
- 2) *эндотоксин*
- 3) *белки клеточной оболочки*
- 4) *экзотоксин*
- 5) *лецитиназа*

Назовите методы лабораторной диагностики данного заболевания:

- 1) *бактериоскопический*
- 2) *биологический*
- 3) *вирусологический*
- 4) *серологический*
- 5) *бактериологический*

ТЕМА: Микробиологическая диагностика микозов (кандидоза и дерматомикозов) и актиномикоза

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ знать: классификацию и таксономию, основные биологические свойства, особенности культивирования, факторы патогенности возбудителей; эпидемиологию; патогенез, микробиологическую диагностику; методы профилактики и особенности терапии заболеваний

уметь: готовить мазки, окрашивать простыми и сложными методами, проводить световую микроскопию с иммерсией, определять морфологические и тинкториальные свойства микроорганизмов, учитывать культуральные свойства кандид, определять чувствительность кандид к антибиотикам, учитывать РА с парными сыворотками в диагностике кандидоза

Задание на дом:

1. Вопросы для самоподготовки:

- 1) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики кандидоза
- 2) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики дерматомикозов (*Epidermophyton* sp., *Trichophyton* sp.)
- 3) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики актиномикоза

Возбудители кандидоза

Таксономия и классификация

Возбудители кандидоза (кандидомикоза) относятся к роду *Candida*. Род *Candida* содержит около 200 видов. Таксономические взаимоотношения внутри рода недостаточно изучены. Часть представителей рода является дейтеромицетами (*Fungi imperfecti*); половое размножение которых не установлено. Выявлены также телеоморфные роды, включающие представителей с половым способом размножения: *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluveromyces* и *Pichia*.

Клинически значимыми видами являются: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa* и *C. glabrata* (прежнее название — *Torulopsis glabrata*). Ведущее значение в развитии кандидоза имеют *C. albicans* и *C. tropicalis*.

Нозологические формы

Кандидоз — антропонозный микоз, характеризующийся поражением слизистых оболочек и кожи. Возможны тяжёлые висцеральные формы, чаще с вовлечением лёгких и органов пищеварения. Кандидоз обычно возникает эндогенно как следствие дисметаболических расстройств и дисфункций иммунной системы.

Поражения у человека вызывают *C. albicans* (более 90% поражений), *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* и др. В начале XX в. кандидозы наблюдали сравнительно редко, но заболеваемость значительно возросла с началом применения антибиотиков и растёт в настоящее время. На сегодняшний день кандиды — наиболее распространённые возбудители оппортунистических микозов.

Эпидемиология и пути передачи

Кандиды обитают на растениях, плодах, являются частью нормальной микрофлоры млекопитающих и человека. Виды рода *Candida*, являющиеся частью нормальной микрофлоры, могут вторгаться в ткань (эндогенная инфекция) и вызывать кандидоз у пациентов с ослабленной иммунной защитой. *C. albicans* — нормальный комменсал полости рта, ЖКТ, влагалища и иногда кожи. Любые нарушения резистентности организма либо изменения нормального микробного ценоза могут приводить к развитию заболевания. Возможность передачи возбудителя при бытовых контактах не определена, однако первичная колонизация детей кандидами происходит при прохождении через родовые пути матери или при кормлении грудью. Мочеполовой кандидоз передаётся половым путём.

Морфологические и тинкториальные свойства

Кандиды представлены овальными грам⁺ почкующимися дрожжевыми клетками, псевдогифами и септированными гифами. Аэробы. На простых питательных средах при температуре 25—27 °С образуют дрожжевые и псевдогифальные клетки. Колонии выпуклые, блестящие, сметанообразные, непрозрачные с различными оттенками. Для *C. albicans* характерно образование «ростковой трубки» из бластоспоры (почки) при помещении их в сыворотку. Кроме того, *C. albicans* образует хламидоспоры — толстостенные двухконтурные крупные овальные споры. В тканях кандиды растут в виде дрожжей и псевдогиф.

Возбудители — дрожжеподобные грибы рода *Candida*. Кандиды не относят к истинным диморфным грибам, так как в тканях можно выявлять как дрожжевые клетки, так и гифы. Переход в мицелиальную фазу можно наблюдать при культивировании при более низкой температуре (22–25 °С) или при истощении питательной среды. *In vivo* трансформацию дрожжевой фазы в мицелиальную (плесневую) можно наблюдать при прорастании в ткани организма. Дрожжевая фаза представлена овальными или круглыми клетками-бластоспорами (4–8 мкм), размножающимися многополосным почкованием. Клеточная стенка содержит 5–7 слоёв. Оптимальная температура для роста составляет 25–28 °С. Мицелиальная фаза представлена цепочками удлинённых клеток с трёхслойной клеточной стенкой, образующими псевдомицелий. На нём беспорядочно располагаются дрожжеподобные бластоспоры. Некоторые виды, включая *C. albicans*, формируют терминальные хламидоспоры.

Питательные среды и культуральные свойства

Кандиды хорошо растут как на простых (среды Сабуро и др.), так и на кровяных или сывороточных средах. Оптимальная температура составляет 30–37 °С, оптимальный рН — 6,0–6,8. Колонии *C. albicans* на агаре Сабуро белые или беловато-кремовые [лат. *candidus*, снежно-белый], блестящие, напоминают капли майонеза. Отличительными признаками *C. albicans* считают следующие.

- Способность ферментировать глюкозу и мальтозу с образованием кислоты и газа.
- При росте в жидких белковых средах при 37 °С через 2–4 ч бластоспоры подавляющего большинства штаммов *C. albicans* образуют особые выросты — ростковые трубки. Штаммы, не образующие их — авирулентны.
- При культивировании при температуре 22–25 °С либо по мере истощения глюкозы в среде (4–7-е сутки) или на «голодных» средах *C. albicans* образует хламидоспоры.

Факторы патогенности

У кандид выявлены адгезины (обуславливают адгезию на эпителии), олигосахариды клеточной стенки (ингибируют клеточные иммунные реакции), фосфолипазы и кислые протеазы. Кроме того, кандиды способны маскировать поверхностные структуры, с которыми взаимодействуют компоненты комплемента и опсонины. Определённую предрасполагающую роль играют анатомические (например, стенозы), метаболические (например, сахарный диабет) и иммунные нарушения. Развитию кандидоза способствуют повреждения кожных покровов, повышенное потоотделение, мацерации, обменные и гормональные нарушения (например, сахарный диабет), беременность, а также приём пероральных контрацептивов. Чрезмерный рост кандид провоцируют также дисбактериозы, вызванные неадекватным применением антибиотиков широкого спектра действия или изменениями микробного окружения. Иммунодефициты или приём иммунодепрессантов способны вызывать молниеносные формы либо хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек.

Патогенез и клиника

Кандиды — одни из наиболее распространенных возбудителей микозов (кандидозов). Развитию кандидоза способствуют неправильное назначение антибиотиков, обменные и гормональные нарушения, иммунодефициты, повышенная влажность кожи, повреждения кожи и слизистых оболочек. Наиболее часто кандидоз вызывается *C. albicans*, которая обладает следующими факторами вирулентности: продукция протеазы и поверхностных интегриноподобных молекул для адгезии к экстрацеллюлярным матриксным белкам и др.

Клинически выделяют кандидоз кожных покровов, кандидоз ногтевых валиков и ногтей, кандидоз слизистых оболочек, хронический кожно-слизистый кандидоз, диссеминированный (висцеральный) кандидоз.

Кандидоз кожных покровов развивается на прилегающих друг к другу поверхностях тела и в кожных складках, то есть на участках, характеризующихся достаточно высокой температурой и повышенной влажностью (также кандидоз может возникать при мацерациях кожи). Кандидозное интертриго проявляется опрелостями с последующим присоединением эритематозных или везикулёзно-пустулёзных высыпаний. Последние трансформируются в эрозии с беловатыми некротизированными участками эпителия. Пелёночный дерматит характеризуется сыпью с шелушением или везикулёзно-пустулёзными высыпаниями с интенсивным воспалением и зудом.

Кандидоз ногтевых валиков и ногтей (паронихии и онихии) наблюдают при мацерациях кистей и стоп, вызванных постоянным контактом с водой (у мойщиков посуды, прачек, рыбаков). Характерно утолщение и обесцвечивание ногтевых пластинок, реже возникает выпадение ногтей.

Кандидоз слизистых оболочек (молочница). Заболевание развивается на фоне метаболических расстройств или при нарушении нормального микробиоценоза слизистых оболочек.

- Кандидоз слизистой оболочки полости рта — характерное следствие приёма антибиотиков широкого спектра или иммунодефицитных состояний. Типичные проявления — белые или желтоватые «творожистые» бляшки на поверхности слизистой оболочки (отсюда «молочница»). Поражение часто сочетается с диффузной эритемой и повышенной сухостью слизистой оболочки.

- Кандидозный вульвовагинит распространён среди женщин, принимающих гормональные или использующих внутриматочные контрацептивы, либо находящихся в последнем триместре беременности (состояние опосредовано иммунодепрессивным действием высоких концентраций прогестерона). Характерны чувство дискомфорта, зуд и творожистые бели.

Хронический кожно-слизистый кандидоз — редкая патология, опосредованная дефектами Т-лимфоцитов. Возможны поражения кожных покровов (включая кожу волосистой части головы), слизистых оболочек (хейлит, эзофагит), онихии и паронихии. В наиболее тяжёлых случаях наблюдают гранулематозный кожный кандидоз с появлением на коже и ногтях инфильтратов с нечёткими контурами, покрываемыми позднее серозно-кровоянистыми корками.

Диссеминированный (висцеральный) кандидоз — следствие инвазии органов ЖКТ, дыхательных путей, мочеполовой системы и ЦНС, проявляющейся развитием микроабсцессов вследствие фунгемии. Состояние усугубляет сенсбилизация организма к аллергенам грибов с развитием очагов воспаления, в которых отсутствует возбудитель. Нелеченные случаи заканчиваются фатально. Поражения наблюдают при пересадках органов, операциях на сердце, катетеризации вен в течение продолжительного времени, имплантации протезов, переедании, длительном приёме глюкокортикоидов, иммунодепрессантов. Наиболее часты поражения почек, глаз, головного мозга и сердца. Множественные очаги чаще выявляют при наличии постоянного инфицирования, например через катетер.

Иммунитет

В защите организма от кандид участвуют фагоциты-мононуклеары, нейтрофилы и эозинофилы, захватывающие элементы грибов. Антитела и комплемент взаимодействуют с грибами, вызывая их опсонизацию. Развивается ГЗТ, формируются гранулемы с эпителиоидными и гигантскими клетками.

Микробиологическая диагностика

При кандидозе в мазках из клинического материала выявляют псевдомицелий (клетки соединены перетяжками), мицелий с перегородками и почкующиеся бластоспоры.

Посевы клинического материала проводят на среду Сабуро, сусло-агар и др. Колонии *C. albicans* белые или беловато-кремовые, выпуклые, круглые. Выросшие грибы

дифференцируют по морфологическим, биохимическим и физиологическим свойствам. Виды кандид отличаются при росте на глюкозо-картофельном агаре по типу филаментации: расположению гломерул — скоплений мелких округлых дрожжеподобных клеток вокруг псевдомицелия. Для бластоспор *C. albicans* характерно образование «ростковых трубок» при культивировании на жидких средах с сывороткой или плазмой (2—3 ч при 37 °С). Кроме того, у *C. albicans* выявляют хламидоспоры: участок посева на рисовом агаре покрывают стерильным покровным стеклом и после инкубации (при 25 °С в течение 2—5 дней) микроскопируют.

Наличие *кандидемии* устанавливают при положительной гемокультуре с выделением из крови *Candida spp.* Кандидозная уроинфекция устанавливается при обнаружении более 10⁵ клеток *Candida spp.* в 1 мл мочи.

Можно также проводить серологическую диагностику (реакция агглютинации, РСК, РП, ИФА) и постановку кожноаллергической пробы с кандид-аллергеном.

Лечение

При кандидозе применяют препараты нистатина, леворина (для лечения местных поверхностных микозов, например орофарингеального), клотримазола, кетоконазола, флуконазола (не действует на *C. krusei*, многие штаммы *C. glabrata*), амфотерицина В (не активен против *C. lusitaniae*). Выбор препаратов зависит от клинической формы, тяжести заболевания и индивидуальной чувствительности кандид, которую определяют диско-диффузионным методом.

Профилактика

Профилактика направлена на контроль асептики, стерильности инвазивных процедур (катетеризация вен, мочевого пузыря, бронхоскопия и др.). Для предупреждения развития системного кандидоза больным с выраженной нейтропенией назначают противокандидозные препараты.

Возбудители дерматомикозов

Возбудители дерматомикозов (эпидермомикозов, дерматофитий, эпидермофитий) — дерматофиты, или дерматомицеты; поражают кожу, ногти и волосы, вызывая трихофитию, микроспорию, фавус, эпидермофитию и др. Дерматофиты подразделяют на 3 рода: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*. Они отличаются по способам споруляции

Морфология

Дерматофиты образуют септированный мицелий с артроконидиями хламидоспорами, макро — и микроконидиями. Макроконидии различны: у рода *Microsporum* — толстостенные, многоклеточные, веретенообразные и покрыты шипами; у рода *Trichophyton* — крупные, гладкие, септированные; у рода *Epidermophyton* имеется множество гладких дубинкообразных макроконидий.

Грибы размножаются бесполом (анаморфы) или половым (телеоморфы) путями, образуя аски. Растут на среде Сабуро и др. Колонии (в зависимости от вида) разноцветные, мучнистые, зернистые, пушистые.

Резистентность

Грибы устойчивы к высушиванию и замораживанию. Трихофитоны сохраняются в волосах до 4—7 лет. Дерматофиты погибают при 100 °С через 10-20 мин. Чувствительны к действию УФ-лучей, растворов щелочи, формальдегида, йода.

Эпидемиология

Около 40 видов дерматофитов вызывают патологические процессы у человека. Возбудитель передается при контакте с больным человеком или животным, а также при контакте с различными объектами окружающей среды. Грибы передаются через предметы обихода (расчески, полотенца). Люди чаще инфицируются в банях, душевых, бассейнах.

Различают антропофильные, зоофильные и геофильные грибы. Антропофильные дерматофиты передаются от человека человеку, зоофильные дерматофиты — человеку от животных. Например, *Trichophyton verrucosum* передается от крупного рогатого скота («телячий лишай»). Геофильные дерматофиты обитают в почве и передаются при контакте с ней.

Например, *Microsporium gypseum* передается при обработке почвы голыми руками — «микроспория садоводов».

Патогенность дерматофитов

Вирулентность низкая. К факторам вирулентности относят кератиназу, расщепляющую кератин эпидермиса, волос и ногтей. Дерматофиты поражают только поверхностные образования, поэтому иммунные реакции не возникают (за исключением некоторых видов трихофитонов). Размножение дерматофитов во внутренней среде организма ингибирует: температура 37°C, SIF (сывороточный ингибирующий фактор, представляет собой трансферрин, связывает железо, которое необходимо грибкам для размножения), α_2 -макроглобулин (ингибирует фермент кератиназу, то есть препятствует внедрению грибковой инфекции в глубокие слои кожи).

Патогенез и клиника

Развитию заболевания способствуют мацерация, мелкие повреждения кожи, повышенная потливость, ослабленный иммунитет, эндокринные нарушения, длительное применение антибиотиков и др. В зависимости от вида гриба, в различной степени поражаются кожа, волосы и ногти. Возбудители обитают на ороговевших субстратах (кератинофильные грибы). Продуцируют кератиназу, расщепляющую кератин наружных покровов. Дерматофиты не проникают далее базальной мембраны эпидермиса.

Различают дерматомикоз туловища, конечностей (*tinea corporis*), лица (*tinea facialis*), стопы (*tinea pedis*), ногтей (*tinea unguium*), кисти (*tinea manus*), промежности (*tinea cruris*), области бороды (*tinea barbae*), волосистой части головы (*tinea capitis*).

Волосы, пораженные грибами, обламываются; развивается плешивость, очаговое облысение. Кожа шелушится, появляются везикулы, пустулы, трещины. Развивается зуд очагов поражения. Воспаление отсутствует или может быть в выраженной форме. Например, *M. gypseum* вызывает гнойно-воспалительный процесс волосистой части головы (керион), заканчивающийся через 8 недель умеренным рубцеванием.

Грибковые инфекции ногтей (онихомикозы) сопровождаются изменением цвета, прозрачности, толщины, поверхности, прочности и целостности ногтевой пластинки. Возбудителем онихомикоза может быть любой дерматофит, но чаще его вызывают *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton interdigitale*.

Иммунитет

Снижение иммунитета способствует развитию микозов. У людей, инфицированных грибами, появляются антитела IgM, IgG, IgE; развивается ГЗТ.

Микробиологическая диагностика

Применяют микроскопический, микологический (культуральный), аллергологический, серологический и биологический методы диагностики.

Микроскопически исследуют соскобы с пораженной кожи, чешуйки, ногтевые пластинки, волосы, обработанные в течение 10—15 мин 10—15% раствором KOH. При микроскопии выявляют нити мицелия, артроконидии, макро- и микроконидии, бластоспоры. Артроконидии рода *Trichophyton* могут располагаться параллельными цепочками снаружи волоса (эктотрикс) и внутри волоса (эндотрикс). Артроконидии рода *Microsporium* располагаются мозаично снаружи волоса. При фавусе внутри волоса обнаруживаются элементы гриба и пузырьки газа.

При микологическом методе делают посев на питательные среды — сусло-агар, Сабуро и др. Рост грибов изучается через 1-3 недели культивирования при 25 °C.

Для серодиагностики используют РСК, РПГА, РП, РИФ, ИФА

При аллергологической диагностике ставят кожно-аллергические пробы с аллергенами из грибов.

Биопробу ставят на лабораторных животных (морские свинки, мыши и др.), заражая их в кожу, волосы и когти.

Лечение

Проводят местную и системную противогрибковую терапию. Назначают гризеофульвин, тербинафин, амфотерицин В, низорал (кетоназол), клотримазол и другие

антимикотики. Пораженные ногтевые пластинки удаляют.

Профилактика

Профилактика основана на соблюдении правил гигиены (гигиена кожи, использование только личной обуви и др.), выявлении и лечении больных, обследовании контактных лиц. В эпидемических очагах проводят дезинфекцию.

Возбудители трихофитии

Трихофития (син. стригущий лишай) вызывается грибами рода *Trichophyton*. Различают антропонозную и зооантропонозную трихофитию.

Грибы рода *Trichophyton* различаются по расположению элементов гриба (в основном спор) в волосе:

По типу “endothrix” (при котором споры располагаются цепочками внутри волоса) поражают волосы *T. violaceum*, *T. tonsurans*.

По типу “ectothrix” (при котором споры располагаются преимущественно снаружи волоса) поражают волосы *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* var. *gypseum*

T. rubrum могут поражать пушковые волосы, тип поражения “neoendothrix” (при котором споры располагаются как внутри, так и снаружи волоса)

Виды:

1. Антропофильные (паразиты человека) — *T. violaceum* (поражают волосы, кожу, ногти, системные поражения), *T. tonsurans* (волосы, кожа головы и туловища), *T. rubrum* (кожа, складки, ногти), *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (межпальцевые и паховые складки); Вызывают антропонозную (поверхностную) трихофитию. Болеют только люди, чаще дети. Развивается воспаление и шелушение кожи. Волосы поражаются по типу «эндотрикс» и надламываются у поверхности кожи. У многих больных инфекция имеет тенденцию к самостоятельному разрешению в результате полового созревания. Если этого не происходит, то возникает так называемая хроническая “чёрноточечная” трихофития волосистой части головы. Она наблюдается преимущественно у взрослых женщин, у которых имеются эндогенные предрасполагающие факторы: дисфункция половых желёз, щитовидной железы, вегетативные расстройства, гиповитаминозы. На волосистой части головы образуются очаги со слабо выраженной гиперемией, незначительным шелушением, поредением волос, нечёткими контурами. Поредение волос обусловлено не выпадением волос, а их обламыванием на разных уровнях. Часть волос обламывается на высоте 2-3 мм от поверхности кожи (имеют вид пеньков серого цвета), другая часть волос обламывается на уровне кожи и имеют вид “чёрных точек” — важный клинический симптом заболевания.

Чистая культура *T. tonsurans* представлена тонким (2-3 мкм), редко — септированным мицелием, грушевидными микроконидиями, артрспорами, хламидоспорами и, иногда, макроконидиями.

Чистая культура *T. violaceum* состоит из тонкого (3—4 мкм), извитого, малосептированного мицелия, разнообразных хламидоспор. В старых культурах появляются артрспоры.

2. Зоофильные (паразиты домашних животных (кошек, собак, рогатого скота), которые являются источником заражения людей) — *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* var. *gypseum*. Вызывают зооантропонозную (инфильтративно-нагноительную) трихофитию. Возбудитель передается человеку от мышей, домашних животных. В коже развиваются абсцессы, гранулемы. Снаружи волос имеются артроконидии («эктотрикс»); волосы выпадают. Поражается волосистая часть головы, борода, ногти, стопы. Развиваются фолликулиты, перифолликулиты. Затем они сливаются в болезненный, ярко-красный, плотный инфильтрат, который может достигать 6-8 см в диаметре. Очагов может быть до 5-6. На поверхности инфильтрата находятся обломанные волосы, пустулы, корки. После их удаления обнажаются фолликулярные отверстия, напоминающие медовые соты (“kerion”), при надавливании из них выделяется густой гной. В результате всасывания продуктов распада грибов, гноеродных кокков, разрушенных тканей развивается интоксикация организма — лихорадка до 38-39°C, головная боль, недомогание, регионарный лимфаденит. Заболевание протекает остро, через

2-3 месяца склонно к самопроизвольному излечению: на месте инфильтратов образуются рубцы; при обширных поражениях — развивается стойкая алопеция (облысение).

Чистая культура гриба состоит из тонкого (2 мкм) септированного мицелия со штопорообразными гифами, а также из округлых микроконидий (2—4 мкм), хламидоспор и удлинённых макроконидий (8 x 40 мкм).

Эпидермофития

Возбудитель — *Epidermophyton floccosum* (единственный вид в роде) — антропофильный дерматофит.

Возбудитель передаётся через кожные чешуйки. Факторы передачи зависят от локализации процесса у больного человека. Заражение может происходить за счёт обуви, одежды, спортивного инвентаря, бань, душевых и так далее.

Клиника — поражаются кожа, преимущественно крупных складок (паховые, ягодичные, подмышечные, под молочными железами), реже — кожа стоп и ногти. Очаги поражения гиперемированы, шелушатся, могут образовываться трещины (особенно между пальцами при повышенной потливости ног).

Морфологические свойства — при микроскопии чешуек выявляются фрагменты мицелия. Мицелий септированный, с интеркалярными хламидоспорами, располагающимися нередко цепочками. Микроконидии отсутствуют (отличительный признак от трихофитонов и микроспорумов). Макроконидии 4 — 5 клеточные, дубинкообразные, с гладкими стенками, с закруглёнными свободными концами. Располагаются пучками по 3 — 5 штук, как «плоды банана».

Культуральные свойства — колонии белые, с возрастом становятся лимонно-оливкового цвета, подошва колонии — желтовато-коричневая. Поверхность колоний хлопьевидная, в центре — складчато-бугристая, к периферии — ровная и пологая.

(Эпидермофития стоп чаще вызывается *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. rubrum*. Возбудители эпидермофитии ногтей (онихомикоза) — виды *Trichophyton*.)

Возбудитель эпидермофитии паховой

Эпидермофития паховая вызывается грибом *Epidermophyton floccosum*. Антропоноз. Поражаются кожа паховых складок, голеней, реже — кожа межпальцевых складок и ногтевые пластинки. В чешуйках кожи выявляются септированный ветвящийся мицелий, прямоугольные артроспоры, расположенные цепочками.

В чистой культуре *E. floccosum* состоит из септированного желтоватого мицелия, крупных хламидоспор (20—30 мкм) и тупоконечных макроконидий. Макроконидии располагаются группами на концах гиф.

Поражения паха (паховый дерматомикоз) могут также вызывать *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, грибы рода *Candida*.

Возбудитель эпидермофитии стоп

Эпидермофития стоп вызывается грибом *Trichophyton interdigitale* (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*). Антропоноз. Поражаются ногтевые пластинки (онихомикозы) и кожа стоп (образование пузырьков, трещин, чешуек и эрозий). Волосы не поражаются.

В соскобе ногтевых пластинок и в чешуйках кожи находятся мицелий и артроспоры.

Чистая культура *T. interdigitale* состоит из тонкого ветвистого септированного мицелия с грушевидными микроконидиями (2—3 мкм), макроконидий (5 x 25 мкм) и хламидоспор. Поражения стоп могут также вызывать *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*

Микроспория

Возбудитель — *Microsporum ferrugineum* (антропофильные, источник заражения — больной человек), *M. canis* (зоофильные, источник заражения — больные животные — кошки, собаки, но также больной человек), *M. gypseum* (геофильные, источник заражения — почва). Заболевание чрезвычайно заразно. Могут наблюдаться эпидемические вспышки, например, в детских коллективах — школах, детских садах, яслях. (Инкубационный период для *M. canis* — 5-7 дней, для *M. ferrugineum* — 4-6 недель.)

Клиника — Микроспорумы поражают кожу и волосы (но не ногти!!!). Кожа в месте поражения нормального цвета или розоватая, покрыта мелкими чешуйками «как бы посыпана

мукой». Для микроспории характерно наличие нескольких крупных очагов (1-2), округлой или овальной формы, резко ограниченных, не имеющих тенденции к слиянию. В очагах поражения волосы обломаны на высоте 4-6 мм и выглядят как бы подстриженными, имеются участки облысения (“тёмных точек” (обломанных волос), как при трихофитии — нет). Споры микроспориумов (мелкие, круглые) поражают волосы по типу “эктотрикс”, располагаются хаотично, цепочек не образуют. (Извлечённые волосы у основания покрыты рыхлым беловатым чехлом, напоминают “стеклянную палочку, опущенную в клей, а затем в мелкий песок” (по описанию Сабуро). Для волос поражённых микроспориумами характерна зеленоватая люминисценция в ультрафиолетовых лучах (под лампой Вуда, $\lambda=365$ нм).

Морфологические свойства — Мицелий септированный, нередко бамбуковидный, с «гребешками», содержит интеркалярные хламидоспоры. Макроконидии веретенообразные, толстостенные (с двухконтурной стенкой) и покрыты шипиками. Микроконидии грушевидные, встречаются непостоянно. У *M. ferrugineum* макро-и микроконидии — отсутствуют.

Культуральные свойства — Колонии *M. canis* — зернистые или пушистые, поверхность белая или светло-коричневая, распластанные, по краям лимонно-жёлтые желобки с жёлто-оранжевой подошвой. Колонии *M. ferrugineum* — полиморфные, кожистые, куполообразные, с радиальными складками, обратная сторона колоний коричнево-оранжевого цвета “ржавая”.

Актиномицеты

Длительное время актиномицеты считали грибами, однако изучение морфологии и биологических свойств позволило отнести их к бактериям семейства Actinomycetaceae отдела Firmicutes. В отличие от грибов, актиномицеты не содержат в клеточной стенке хитина или целлюлозы; они не способны к фотосинтезу, а образуемый ими мицелий достаточно примитивен. Также они резистентны к противогрибковым средствам. С бактериями актиномицеты объединяют отсутствие чётко выраженного ядра, сходство строения клеточной стенки, а также чувствительность к бактериофагам и антибиотикам. Для их роста также оптимальны слабощелочные, но не кислые значения pH среды.

Большинство актиномицетов — обитатели поверхности слизистых оболочек у млекопитающих; некоторые виды — почвенные сапрофиты. У человека актиномицеты колонизируют слизистые оболочки полости рта и ЖКТ. Способность вызывать специфические поражения выражена сравнительно слабо. В соответствии с этим их следует рассматривать как условно-патогенные микроорганизмы. Бактерии вызывают актиномикозы — хронические гнойные гранулематозные поражения различных органов. Первое описание поражений у человека привёл Д. Израель (1878).

Актиномикозы у людей отмечают редко; подавляющее большинство случаев вызывает *A. israelii*, лишь в редких случаях выделяют *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. bovis* и *A. viscosus*.

Эпидемиология

Актиномикозы регистрируют практически во всех странах мира. Они составляют до 2,5–10% всех хронических гнойных процессов различной локализации. Основные предрасполагающие факторы — травмы полости рта, периодонтиты, различные медицинские манипуляции; реже актиномикозы бывают осложнениями аппендэктомий, холецистэктомий, ранений кишечника или язв двенадцатиперстной кишки.

Основная среда обитания и источник инфекции — почва. Постоянно обнаруживаются в воде, воздухе, на различных предметах, покровах растений, животных и человека. Колонизируют слизистую оболочку полости рта человека и млекопитающих. Характерна множественность механизмов, путей и факторов передачи; хотя чаще всего механизм передачи — контактный, а путь передачи — раневой. Восприимчивость к актиномицетам, как ко всем УПМ, низкая у лиц с нормальным иммунным статусом и повышенная у иммунокомпромированных хозяев.

Устойчивость в окружающей среде. При попадании на воздух мгновенно погибают.

Чувствительность к антимикробным препаратам. Чувствительны к пенициллинам, тетрациклину, эритромицину и клиндамицину, но резистентны к антимикотикам. Чувствительны действию обычно применяемых антисептиков и дезинфектантов.

Морфология

Ветвящиеся бактерии. В отличие от грибов не содержат в клеточной стенке хитина или целлюлозы, а сама стенка имеет строение грамположительных бактерий. Актиномицеты представлены тонкими, прямыми или слегка изогнутыми палочками размером 0,2/1,0x2,5 мкм, но часто образуют нити длиной до 10–50 мкм. Характерная особенность актиномицетов — способность образовывать хорошо развитый мицелий. Палочковидные формы часто имеют утолщённые концы, в мазках располагаются одиночно, парами, V-или Y-образно. Грам⁺ окраску, однако, по Граму фиксируют плохо; часто образуют зернистые либо чёткообразные формы. Кислотонеустойчивы. Факультативные анаэробы; для хорошего роста нуждаются в повышенном содержании CO₂.

Культуральные свойства

Облигатные и факультативные анаэробы, капнофилы. Растут медленно, посеvy следует культивировать 7-14 суток. Температурный оптимум роста — 37 °С. Некоторые штаммы дают β-гемолиз на средах с кровью. Некоторые виды формируют нитчатые микроколонии, напоминающие мицелий, а на 7—14-е сутки образуют крошковатые S-формы колоний, иногда окрашенные в желтый или красный цвет. *Actinomyces israelii* склонен образовывать длинный ветвящийся мицелий, со временем распадающийся на полиморфные кокковидные, колбовидные и другие элементы. На простых питательных средах растёт плохо, лучше растёт на белковых средах, содержащих сыворотку; образует прозрачные бесцветные пастообразные, обычно гладкие колонии, плотно срастающиеся со средой. Воздушный мицелий скудный, пигментов не образует, на некоторых средах, например на кровяном агаре, может формировать белые бугристые колонии. *A. odontolyticus* на кровяном агаре образует красные колонии с зоной β-гемолиза.

Биохимическая активность

Хемоорганотрофы. Ферментируют углеводы с образованием кислоты без газа, продукты ферментации — уксусная, муравьиная, молочная и янтарная кислоты (но не пропионовая). Наличие каталазы и способность восстанавливать нитраты в нитриты переменны у разных видов, индол не образуют. Видовая дифференциация основана на различиях в способности ферментировать углеводы и на некоторых других биохимических тестах.

Антигенная структура

В ИФА выделяют 6 серогрупп: А, В, С, D, Е и F.

Патогенез

Вызывают оппортунистическую инфекцию. Актиномицеты, особенно *A. israelii*, проявляют выраженную адгезивную активность на слизистых оболочках и способность к быстрой их колонизации. Поражения могут носить эндогенный (например, воспалительные процессы или травмы полости рта) и экзогенный (при имплантации возбудителя в рану) характер. Основной предрасполагающий фактор — снижение сопротивляемости организма, обусловленное сопутствующей патологией (туберкулёз, сахарный диабет), беременностью и др. Особое значение имеет сопутствующая микрофлора, способная значительно усугублять тяжесть поражений. Возбудитель диссеминирует лимфогенно; наиболее часто в ткани с низким содержанием O₂. Вокруг внедрившегося в подслизистую оболочку возбудителя происходит формирование специфической гранулёмы (актиномикомы), содержащей колонии возбудителя (друзы). Позднее очаг распадается с развитием гнойного и фиброзного процессов.

Клиника

Актиномикоз — хроническая оппортунистическая инфекция человека и животных, вызываемая анаэробными и факультативно-анаэробными актиномицетами, которая характеризуется гранулематозным воспалением с полиморфными клиническими проявлениями.

Заболевание проявляется в формировании гранулёмы, которая подвергается некротическому распаду с образованием гноя, выходящего через свищи на поверхность кожи и слизи-

стых оболочек. Гной — различной консистенции, желтовато-белого цвета, иногда с примесью крови, часто содержит друзы. Одновременно отмечается фиброз гранулемы.

Наиболее частое поражение — актиномикоз лица, наблюдаемый у 55–60% всех больных актиномикозами и у 6–10% лиц, страдающих воспалительными поражениями челюстей и лица. Заболевание протекает хронически, но часто осложняется присоединением вторичных бактериальных инфекций; возможны поражения кожи, мышц, лимфатических узлов, языка, слюнных желёз и костных тканей. Реже наблюдают торакальный актиномикоз; наиболее часто отмечают поражения лёгких, плевры, реже — мягких тканей грудной клетки. У 25–30% пациентов наблюдают абдоминальный актиномикоз. В большинстве случаев первичный очаг локализован в слепой кишке и червеобразном отростке. Сравнительно редкие поражения — актиномикоз мочеполовой системы (наиболее часто связывают с применением внутриматочных контрацептивов), актиномикоз костей (возникает как контактно, так и гематогенно), актиномикоз ЦНС (с развитием менингитов и менингоэнцефалитов) и генерализованный актиномикоз (типа метастазирующего сепсиса).

Иммунитет изучен недостаточно.

Микробиологическая диагностика

Материалом для исследования служат мокрота, ликвор, гной из свищей, пунктаты не вскрытых очагов размягчения, соскобы с грануляций, биопсия тканей.

Для диагностики используют *бактериоскопический, бактериологический, серологический и аллергологический методы*.

Обычно диагноз ставят бактериоскопически по обнаружению в нативном исследуемом материале друз актиномицетов, имеющих вид мелких желтоватых или серовато-белых зернышек с зеленоватым отливом. Под малым увеличением видны образования округлой формы с бесструктурным центром и периферией радиального строения; под большим увеличением в центре видны сплетения тонких гиф с пигментированными зёрнами, по периферии от этого клубка мицелия отходят радиально в виде лучей гифы с колбовидными утолщениями на концах. По Граму споры окрашиваются в темно-фиолетовый, мицелий — в фиолетовый, а друзы — в розовый цвет. По Циллю—Нельсону мицелий окрашивается в синий, а споры — в красный цвет.

Окончательный диагноз устанавливают на основании выделения возбудителя. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры гной и мокроту перед посевом центрифугируют в растворе пенициллина и стрептомицина, затем отмывают изотоническим раствором NaCl для удаления антибиотиков. Засевают на питательные среды (сахарный агар, среда Сабуро и др.) и культивируют в, аэробных и анаэробных условиях. Выделяют и идентифицируют чистую культуру по общепринятой схеме. У выделенных культур определяют способность свертывать и пептонизировать молоко — признак, характерный для актиномицетов. Выделение анаэробных видов подтверждает диагноз актиномикоза.

Для серодиагностики ставят РСК с актинолизатом. Реакция недостаточно специфична, поскольку положительные результаты могут отмечаться при раке легкого и тяжелых нагноительных процессах. Применение в качестве АГ вместо актинолизата внеклеточных белков актиномицетов повышает чувствительность РСК. Этот же АГ можно использовать и для постановки РИГА.

Аллергическую пробу проводят с актинолизатом. Диагностическое значение имеют лишь положительные и резкоположительные пробы. При висцеральном актиномикозе аллергическая проба часто отрицательная.

Лечение

Актиномикозы хорошо поддаются терапии пенициллинами, тетрациклинами, эритромицинами, клиндамицинами. Следует помнить, что антибиотики необходимо применять в высоких дозах и на протяжении не менее 4–6 нед. При необходимости проводят хирургическое иссечение очагов поражения и наложение дренажа. В некоторых случаях проводят специфическую терапию актинолизатом (лучше из аутоштамма).

Профилактика

Специфическая профилактика не разработана. Неспецифическая профилактика направлена на повышение иммунного статуса

III. План практической работы

1. Изучить питательные среды для культивирования кандид.

Кандиды растут на специальных питательных средах с добавлением углеводов (глюкозо-пептонный агар, среда Сабуро, кукурузный питательный агар и др.).

2. Описать культуральные свойства кандид, выросших на среде Сабуро.

Оптимальная температура роста грибов — +22-36°C; pH — 5,8-6,5. Колонии на среде Сабуро при температуре +25°C через 1-3 дня роста — средних размеров, молочно-белые или беловато-кремовые с тусклым блеском; вначале гладкие, влажные напоминают «капли майонеза», при дальнейшей инкубации могут стать морщинистыми.

3. Изучить и зарисовать морфологические и тинкториальные свойства кандид при окраске по Граму.

При окраске по Граму грибов рода *Candida* в поле зрения выявляется скопление средних округлых дрожжеподобных клеток синего цвета, образующих псевдомицелий, являются Грам+, но могут быть окрашены неравномерно: периферические слои клетки фиолетовые, а в середине — розовые.

4. Поставить и учесть (демонстрация) опыт по определению чувствительности кандид к противогрибковым препаратам, красителям, антибиотикам широкого спектра действия

Чистую культуру возбудителя, выделенную из клинического материала больного (соскоб белого налета из мест поражений), засевают на поверхность питательного агара (среда Сабуро) сплошным газоном с помощью стеклянного шпателя. После посева крышку чашки приоткрывают не более чем на 15 мин и дают поверхности среды подсохнуть. Затем стерильным пинцетом следует положить на поверхность агара бумажные диски, пропитанные раствором определенного противогрибкового препарата, и слегка придавить. Расстояние между дисками и краем чашки должно быть не менее 15 мм. Для контроля наносят диски с антибиотиками широкого спектра действия (тетрацилин, стрептомицин и др.). Чашки инкубируют около 18 ч при 37°C в перевернутом положении. При наличии чувствительной к антибиотику флоры вокруг соответствующих дисков отмечается зона угнетения роста микроорганизмов. Диаметр зоны измеряют с точностью до 1 мм, определяя чувствительность: чувствительные (>20 мм), промежуточная чувствительность (15-20 мм), устойчивые (14 мм и менее).

Заключение: рекомендовано применение противогрибковых препаратов, к которым чувствительны кандиды:

5. Учесть и зарисовать готовую РА с «парными» сыворотками в серодиагностике кандидоза.

Данный серологический метод диагностики используют для выявления противогрибковых антител в сыворотке крови больного.

Компоненты реакции: исследуемые сыворотки пациента (материал берется на конец 1-й — начало 2-й и конец 3-й — начало 4-й неделях с момента заболевания), кандидозный диагностикум и фосфатный буфер.

Постановка: «парные» исследуемые сыворотки титруют в 2-х рядах пробирок фосфатным буфером от 1:50 с двукратным увеличением титра. Для создания контролей в каждую предпоследнюю пробирку ряда вносят 0,5 мл сыворотки на физиологическом растворе и в каждую последнюю — 0,5 мл кандидозного диагностикума на физиологическом растворе. После добавления во все опытные лунки одинакового количества кандидозного диагностикума проводят инкубацию в термостате при температуре 37° 30-40 минут, а затем сутки выдерживают при комнатной температуре (18-20°C).

Учет развернутой реакции агглютинации производят, оценивая последовательно каждую пробирку, начиная с контрольных. Контроль сыворотки больного — жидкость прозрачная, осадка нет. Контроль диагностикума — жидкость прозрачная, на дне осадок в виде белой «пуговки».

Для опытных лунок положительным результатом является агглютинация в лунках (хлопья агглютината в абсолютной прозрачной жидкости (белый «зонтик»); отрицательная реакция «-» — отсутствие агглютинации (белая «пуговка»).

Учет результатов реакции производят путем установления нарастания антител в «парных» сыворотках (нарастание титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой в 4 и более раза является положительным результатом).

Заключение: отмечается нарастание титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой в 4 раза, что является признаком «свежего» инфекционного процесса.

6. Изучить и зарисовать морфологические и тинкториальные свойства актиномицетов и друзы в тканях по таблице.

Характерная особенность актиномицетов — способность образовывать хорошо развитый мицелий. Грам+ палочковидные формы часто имеют утолщённые концы, в мазках располагаются одиночно, парами, V-или Y-образно. Окраску по Граму фиксируют плохо; часто образуют фиолетовые зернистые формы.

Друзы актиномицетов имеют плотную, каменистую консистенцию и скрипят как песок при раздавливании между стеклами. Друзы актиномицетов (по Романовскому-Гимзе) образованы агрегатами мицелия, имеющими вид округлых или овальных базофильных масс с эозинофильными включениями на поверхности.

7. Примеры ситуационных задач

Ситуационная задача

У больного С. 22 года, после курса антибиотикотерапии появился желтоватый «творожистый» налет на слизистой оболочке полости рта. При микроскопии в мазке обнаружены скопления Грам+ овальных клеток. При посеве на питательные среды возбудитель образует колонии средних размеров, молочно-белые, напоминающие «капли майонеза». Биохимические свойства характеризуются способностью ферментировать глюкозу и мальтозу с образованием кислоты и газа.

Назовите возбудителя данного заболевания:

- 1) *Actinomyces israelii*
- 2) *Epidermophyton floccosum*
- 3) *Trichophyton rubrum*
- 4) *Candida albicans*
- 5) *Staphylococcus aureus*

Назовите питательные среды для культивирования данного возбудителя:

- 1) сывороточная среда с ристомицином
- 2) *среда Сабуро*
- 3) среда Сотона
- 4) *глюкозо-пептонный агар*
- 5) ЖСА

Перечислите методы лабораторной диагностики заболевания:

- 1) *бактериоскопический*
- 2) биологический
- 3) *серологический*
- 4) *бактериологический*
- 5) *аллергологический*

Теоретические вопросы для рубежного контроля знаний

- 1) Характеристика биологических свойств возбудителя и особенности микробиологической диагностики сыпного тифа: эпидемического и эндемического (крысиного)
- 2) Характеристика биологических свойств возбудителя и особенности микробиологической диагностики Ку-лихорадки
- 3) Характеристика биологических свойств возбудителя и особенности микробиологической диагностики возвратного тифа
- 4) Характеристика биологических свойств возбудителя и особенности микробиологической диагностики клещевого боррелиоза (болезни Лайма)

- 5) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики сифилиса
- 6) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики гонореи
- 7) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики трихомоноза
- 8) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики урогенитального хламидиоза
- 9) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики урогенитального микоплазмоза
- 10) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики кандидоза
- 11) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики дерматомикозов (*Achorion* sp., *Epidermophyton* sp., *Trichophyton* sp.)
- 12) Характеристика биологических свойств и особенности микробиологической диагностики актиномикоза

Перечень практических навыков

1. Микроскопировать мазок из отделяемого уретры и дать заключение
2. Микроскопировать мазки из отделяемого влагалища и дать заключение
3. Учесть РСК в серодиагностике Ку-лихорадки
4. Учесть реакцию Вассермана в серодиагностике сифилиса
5. Учесть и дать заключение по развёрнутой реакции агглютинации с парными сыворотками в диагностике кандидоза

Модуль VI «Зоонозные инфекции»

Занятие №1

ТЕМА: Микробиологическая диагностика бруцеллеза и туляремии

Цель занятия: знать классификацию и таксономию, основные биологические свойства, особенности культивирования, факторы патогенности возбудителей; эпидемиологию; патогенез, микробиологическую диагностику; методы профилактики и особенности терапии заболеваний.

уметь ставить и учитывать пластинчатую реакцию агглютинации по Хеддельсону, учитывать развернутую реакцию агглютинации в серодиагностике бруцеллеза.

Задание на дом:

I. Вопросы для самоподготовки:

1. Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителя бруцеллеза
2. Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителя туляремии

II. Базовый текст

Возбудители бруцеллеза

1. Классификация и таксономия

Бруцеллез — зоонозное инфекционно-аллергическое заболевание, характеризующееся длительной лихорадкой, преимущественным поражением опорно-двигательного аппарата, поражением сердечно-сосудистой, нервной, мочеполовой и других систем; часто имеет затяжное, хроническое, рецидивирующее течение. Название рода связано с именем Д.Брюса, открывшего в 1886 г. возбудителя бруцеллеза.

Возбудителями бруцеллеза являются бактерии рода *Brucella*. Род *Brucella* включен в семейство *Brucellaceae* отдела *Gracilicutes*. В соответствии с общепринятой классификацией бруцеллы подразделяются на 6 видов, включающих 17 биоваров, при этом для каждого вида характерен свой хозяин. Патогенностью для человека обладают не все виды бруцелл. Основными возбудителями бруцеллеза у человека являются: *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis* и их биовары.

Таблица 21. Классификация бруцелл и их этиологическое значение

Вид бруцелл	Количество биоваров	Типовой хозяин	Значение в патологии человека
<i>B.melitensis</i>	3	Козы, овцы	Наиболее патогенен, высоко контагиозен, вызывает эпидемический бруцеллез
<i>B.abortus</i>	9	Крупный рогатый скот	Обладает патогенностью, вызывает спорадический бруцеллез
<i>B.suis</i>	5	Свиньи, зайцы, северные олени	Менее контагиозен, вызывает спорадический бруцеллез
<i>B.canis</i>		Собаки	Выявлены единичные случаи заболевания
<i>B.neotomae</i>		Пустынные кустарниковые крысы	Не обладает патогенностью
<i>B.ovis</i>		Овцы	Патогенность для человека не доказана

2. Нозологические формы

B.melitensis, *B.abortus*, *B.suis* вызывают бруцеллез у человека.

3. Эпидемиология и пути передачи

Бруцеллез — зоонозная инфекция. Резервуар и источник инфекции — домашние животные (овцы, козы, коровы, свиньи, реже собаки). Человек — вторичный хозяин; заболевания людей (исключая случаи лабораторного заражения) возникают на фоне эпизоотий. От животного к животным и человеку бактерии передаются через зараженные

фекалии, мочу, молоко и мясо. Как правило, каждый из патогенных для человека видов бруцелл избирательно инфицирует специфических животных. *B.melitensis* чаще вызывает бруцеллез коз и овец, а *B.abortus* — крупного рогатого скота. В РФ заболеваемость людей бруцеллезом носит профессиональный характер. Возбудитель внедряется в организм человека через поврежденную кожу, слизистую оболочку дыхательных путей и ЖКТ, конъюнктиву. Контактный путь заражения более характерен для овечьего и свиного бруцеллеза. Восприимчивость человека к бруцеллам высокая. Заболевания носят спорадический характер или в виде отдельных вспышек, что зависит от видовой принадлежности возбудителей. Бруцеллы длительно сохраняются в окружающей среде: в молоке — до 45 дней; в масле, сливках, простокваше и свежих сырах — в течение всего периода их пищевой ценности; в брынзе — до 60 дней; в замороженном мясе — свыше 5 мес, в засоленных шкурах — 2 мес, в шерсти — до 3-4 мес, в воде — до 5 мес; в почве — до 3 мес. Малоустойчивы к высокой температуре, при кипячении погибают моментально, при 60 °С — в течение 30 мин.

4. Морфология и тинкториальные свойства

Бруцеллы — мелкие неподвижные грамотрицательные бактерии шаровидной, овоидной или палочковидной формы длиной 0,6-1,5 мкм, шириной 0,5-0,7 мкм. Не образуют спор, не имеют жгутиков, у некоторых штаммов имеется капсула. Бруцеллы в мазках располагаются беспорядочно, нередко в виде скоплений. Легко окрашиваются анилиновыми красителями. Хемоорганотрофы, каталаза- и оксидаза-положительны.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Бруцеллы — строгие аэробы. Температурный оптимум 37°C, оптимальный pH 6,6-7,4. Они требовательны к питательным средам. Посевы обычно проводят на 5% кровяной агар (с кровью барана) или печеночный агар Хаддльсона. На твердых средах бруцеллы образуют мелкие выпуклые гладкие мутноватые, с перламутровым оттенком S-формы колоний. В процессе диссоциации они формируют шероховатые R-формы. В жидких средах дают равномерное помутнение.

6. Антигенная структура

У бруцелл выявлено до 15 антигенных фракций. Разные виды бруцелл содержат общие антигены, которые дают перекрестные реакции. Имеется общий родовой специфический антиген и поверхностные видовые антигены *M* и *A*. Антиген *M* в наибольшем количестве представлен у *B.melitensis*, но содержится и у других видов. Антиген *A* преобладает у *B.abortus*, и *B.suis*. Обнаружен поверхностный *L*-антиген, имеющий сходство с Vi-антигеном сальмонелл. Шероховатые формы бруцелл содержат R-антиген. У бруцелл обнаружены также антигены, общие с бактериями родов *Yersinia*, *Bordetella*, *Francisella*. Такие антигенные особенности бруцелл затрудняют их серологическую идентификацию, требуют применения адсорбированных моноклональных сывороток или моноклональных антител.

7. Биохимические свойства

Бруцеллы ферментируют глюкозу и арабинозу с образованием кислоты. Восстанавливают нитраты; цитрат не утилизируют; индол не образуют; реакции с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра отрицательные, образуют сероводород.

8. Факторы патогенности

Бруцеллы обладают инвазивными, токсическими, антифагоцитарными свойствами, а также выраженным аллергизирующим действием на организм.

Инвазивность обусловлена рядом ферментов — гиалуронидазой, лецитиназой, ДНК-азой, протеазами и др. Для бруцелл характерна высокая кинетика размножения.

Токсичность бруцелл связана с действием эндотоксина (ЛПС), который вызывает супрессию иммунного ответа.

Антифагоцитарные свойства связаны с наличием капсулы (имеется не у всех штаммов) и с активностью поверхностных структур бактериальной клетки.

Будучи факультативными внутриклеточными паразитами ретикулоэндотелиальной системы, бруцеллы с помощью ряда ферментов препятствуют слиянию фагосом с лизосомами, угнетают окислительный взрыв, что приводит к незавершенному фагоцитозу.

Бруцеллы способны вызывать аллергизацию организма с формированием различных типов аллергии. Наибольшее значение имеют развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и аутоиммунные реакции.

9. Патогенез

Бруцеллы попадают в организм через поврежденную кожу (даже через микротравмы) и неповрежденные слизистые оболочки, не вызывая местной реакции в входных воротах.

Патогенез бруцеллеза включает пять фаз развития заболевания:

1. Фаза лимфогенного заноса и размножения бруцелл в лимфоузлах. Эта фаза охватывает инкубационный период, обычная продолжительность которого 2-4 недели, но может затягиваться даже до 6 месяцев.

В случае активного иммунного ответа развивается лимфаденит, происходит массовая гибель бруцелл и инфекция дальше не развивается.

При выживании бруцелл в лимфоузлах (вследствие незавершенного фагоцитоза) может возникнуть первично-латентная форма инфекции, в дальнейшем переходящая в хроническую инфекцию. Но обычно бруцеллы, являясь внутриклеточными паразитами, интенсивно размножаются в макрофагах лимфоузлов и, преодолев лимфатический барьер, выходят в кровоток.

2. Фаза гематогенного заноса с развитием бактериемии и первичной генерализации инфекционного процесса — клинически соответствует острому периоду болезни, который длится 2-3 месяца. С кровью бруцеллы и освободившийся из распавшихся бактерий эндотоксин проникают в различные органы и системы (в печень, селезенку, лимфоузлы, костный мозг, репродуктивные органы и др.), вызывая общую интоксикацию, лихорадку, гепато-и спленомегалию, артралгии и другие характерные симптомы.

3. Фаза полиочаговых локализаций с формированием в различных органах и тканях метастатических инфекционных очагов и началом аллергизации организма. В этой фазе острая форма инфекции постепенно переходит в подострую, продолжительностью 2-6 месяцев.

В органах бруцеллы поглощаются тканевыми резидентными макрофагами. Макрофагальная реакция является защитной и уменьшает интенсивность бактериемии. Вместе с тем в органах формируются локальные поражения (артриты, бурситы, орхоэпидидимиты, полилимфадениты и др.), сопровождающиеся экссудативным воспалением и инфекционно-реактивными васкулитами.

На характер патологических процессов начинает влиять аллергическая перестройка организма. В пораженных органах образуются имеющие защитное значение инфекционные гранулемы, состоящие из эпителиоидных и гигантских клеток, а также лимфоцитов. С развитием ГЗТ усиливаются поражения опорно-двигательной системы.

4. Фаза вторичной генерализации и усиления аллергических процессов. Сопровождается переходом подострой формы заболеваний в хроническую, рецидивирующую, которая может продолжаться несколько лет (в среднем 2-3 года). Длительное выживание бруцелл в организме больного связано с их внутриклеточным паразитизмом и способностью переходить в L-формы.

При снижении защитных сил организма бруцеллы активируются и возникают рецидивы. При этом бруцеллы при каждом рецидиве проникают в кровь (вторичная генерализация) и повторно реагируют с сенсибилизированными органами, часто при этом наблюдаются лихорадка и интоксикация. Локальные поражения органов все больше прогрессируют, чему способствуют развитие ГЗТ и аутоиммунных реакций. Развиваются системные деструктивные изменения соединительной ткани, процессы склерозирования. Вследствие развития васкулитов нарушается микроциркуляция. Увеличивается количество инфекционных гранул в печени, лимфоузлах, селезенке, костном мозге, почках. Поражаются различные органы и системы, особенно повреждаются опорно-двигательный аппарат и нервная система.

5. Фаза резидуального метаморфоза — соответствует исходу и остаточным проявлениям бруцеллеза. Через 2-3 года или позже инфекционный процесс затухает и

возможно самоизлечение. Исходом может быть выздоровление с полным восстановлением структур и функций пораженных органов и систем.

Но чаще после завершения инфекции остаются стойкие, необратимые поражения: деформация и анкилозы суставов, контрактуры, изменения и боли в позвоночнике, стойкие боли в костях и суставах, неврастенический синдром и нервно-психические отклонения, цирроз печени и склеротические изменения в других органах, бесплодие и др. Нередко человек после перенесенного бруцеллеза становится инвалидом.

Представленная схема патогенеза бруцеллеза реализуется далеко не всегда. Развитие инфекции и проявление фаз патогенеза (которые сменяют друг друга постепенно, неравномерно, иногда наслаиваясь одна на другую) зависит от ряда факторов: от вида бруцелл и вирулентности конкретного возбудителя, величины инфицирующей дозы, реактивности организма и степени его аллергизации. Следует отметить, что современный бруцеллез стал протекать несколько легче — менее часто встречаются тяжелые формы заболевания, реже наблюдается высокая, длительная лихорадка, тяжелые поражения опорно-двигательного аппарата и нервной системы.

10. Иммунитет

Иммунитет при бруцеллезе формируется замедленно и не отличается стойкостью. Он имеет перекрестный (межвидовой) характер вследствие общности антигенных свойств разных видов бруцелл. Например, человек, переболевший бруцеллезом, вызванным *B. melitensis*, становится невосприимчивым к другим возбудителям — *B. abortus*, *B. suis*.

Иммунитет носит как клеточный, так и гуморальный характер. Первоначально фагоцитоз бывает незавершенным, что способствует генерализации инфекции и внутриклеточному персистированию возбудителя. По мере развития заболевания происходит реализация иммунного ответа с формированием ГЗТ и выработкой антител классов IgM и IgG. В результате иммунологической перестройки организма фагоцитоз становится завершенным. В стимуляции фагоцитарной активности определенную роль играют продуцируемые организмом антитела.

Формирующийся иммунитет нередко имеет недостаточно напряженный характер. В течение болезни, под действием неблагоприятных факторов, он может снижаться, что способствует хроническому, рецидивирующему течению.

У переболевших пожизненно сохраняется аллергизация организма (ГЗТ, аутоиммунные реакции), о чем свидетельствует положительная кожно-аллергическая проба Бюрне.

Постинфекционный иммунитет сохраняется в течение 6-9 месяцев, а затем ослабевает, поэтому встречаются повторные заболевания бруцеллезом.

11. Методы лабораторной диагностики

При диагностике бруцеллеза используют бактериологический, биологический, аллергический и серологический методы, и молекулярно-генетический — полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

В связи с высокой контагиозностью возбудителей, бактериологическая диагностика, а также другие исследования с живыми бруцеллами, выполняются только в специальных лабораториях с соблюдением правил работы с особо опасными инфекциями.

Материал для исследований: кровь, моча, грудное молоко, костный мозг, суставная жидкость, ликвор, желчь и др.

Бактериологический метод

Принимая во внимание системный характер поражений, в первую очередь исследуют кровь. Образцы культивируют в МПБ при 37°C, засевают 2 флакона и в одном создают повышенную концентрацию углекислого газа. Через 4-5 суток в этом флаконе наблюдают рост бруцелл; среда может оставаться слегка мутной или прозрачной. После пересева на твердые среды отмечают характерный рост колоний, из которых отсеивают чистые культуры с последующей их идентификацией. Хорошие результаты дают посевы костного мозга, которые выполняют аналогично.

Ускорения и увеличения высеваемости бруцелл удается достичь при посеве исследуемого материала в желток свежих куриных яиц или в желточный мешок куриного

эмбриона. Зараженные куриные эмбрионы выдерживают в термостате при 37°C 5 дней, после чего желтки высевают на плотные и жидкие среды.

Для отличия бруцелл от других бактерий используют окраску мазков из испытуемой культуры по способу Козловского. Мазки окрашивают раствором сафранина (красного цвета) при подогревании, промывают водой, докрашивают раствором малахитового или бриллиантового зеленого и снова промывают водой. В результате окраски бруцеллы сохраняют красновато-розовый цвет, а остальные бактерии приобретают зеленую окраску.

Испытуемая культура должна агглютинироваться диагностической противобруцеллезной сывороткой в реакции агглютинации на стекле (ориентировочной) и в развернутой реакции агглютинации с возрастающими разведениями диагностической сыворотки (до ее титра), причем агглютинация культуры должна достигать не менее 2/3 титра сыворотки.

Если испытуемая культура обладает вышеперечисленными свойствами, ее относят к бруцеллам и у больного диагностируют бруцеллез.

Для установления вида и биовара бруцелл проводят тестирование выделенной культуры по комплексу дифференциальных признаков: потребность в CO₂, образование H₂S, бактериостатическое действие анилиновых красителей тионина и фуксина, агглютинация монорецепторными сыворотками А и М, способность к метаболическому окислению некоторых кислот и углеводов.

Биологический метод

Его используют для выделения возбудителя при отрицательном результате бактериологического метода. Метод заключается в заражении исследуемым материалом восприимчивых лабораторных животных — морских свинок или белых мышей — подкожно или внутрибрюшинно. Через 20-25 дней животных забивают и проводят бактериологическое исследование с выделением чистой культуры бруцелл из органов трупа с последующей идентификацией.

Серологический метод

Серологический метод заключается в постановке серологических реакций с целью выявления в исследуемой сыворотке антител против бруцелл. Чаще всего применяют реакции агглютинации Хеддельсона и Райта.

Реакция Хеддельсона (ускоренная, ориентировочная, скрининговая). Ее ставят на стекле с неразведенной сывороткой и единым бруцеллезным диагностикумом. Обезжиренное стекло расчерчивают на 6 квадратов (4x4 см), затем в первом квадрате ставят номер испытуемой сыворотки, на 2,3 и 4 опытные квадраты микропипеткой наносят сыворотку в объемах 0,04-0,02-0,01 мл и добавляют в каждую каплю по 0,03 мл диагностикума. 5-й квадрат — контроль сыворотки (0,02 мл сыворотки + 0,03 мл изотонического раствора NaCl), 6-й квадрат — контроль антигена (0,03 мл диагностикума + 0,03 мл изотонического раствора NaCl). При положительной реакции во всех трех опытных дозах сыворотки или в дозах 0,02 и 0,04 мл появляются хлопья, окрашенные в синий цвет. Реакцию Хеддельсона используют при массовых обследованиях, например в бруцеллезном очаге. С сыворотками, давшими положительный результат, обязательно ставят реакцию Райта.

Реакция Райта — развернутая реакция агглютинации, которую проводят в пробирках с разведениями сыворотки от 1:50 до 1:800. Для разведения сыворотки используют изотонический раствор NaCl, в который добавлен фенол (0,5%). В качестве антигена берут единый бруцеллезный диагностикум, разведенный 1:10. Диагностический титр реакции Райта 1:200.

Более надежные результаты дает исследование парных сывороток, взятых с интервалом 7-10 дней, что позволяет выявить динамику выработки антител (у вакцинированных титр сыворотки не изменяется). Используют и другие серологические реакции — РНГА, РСК, непрямую РИФ, ИФА.

Аллергический метод

Внутрикожная аллергическая проба Бюрне. Выявляется аллергия организма к антигенам (аллергенам) бруцелл. Реакция сохраняется в течение жизни, поэтому ее используют для распознавания различных форм бруцеллеза, в том числе и хронических. Пробу ставят на сгибательной поверхности предплечья, куда внутрикожно вводят 0,1 мл бруцеллина (фильтрат 3-х недельной бульонной культуры бруцелл). При положительной реакции через 24 часа на месте введения появляется гиперемия и отечность диаметром 3-6 см, при резко положительной реакции диаметр отека превышает 6 см. Положительный результат пробы Бюрне наблюдают и у вакцинированных людей.

Генетический метод

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет в течение одного рабочего дня подтвердить наличие бруцелл в разных жидкостях (физиологический раствор, молоко, кровь), контаминированных небольшим количеством возбудителя, а также в патологическом материале от инфицированных бруцеллами животных.

12. Лечение и профилактика

В остром и подостром периоде назначают антибиотики широкого спектра действия: препараты группы тетрациклина, рифампицин, гентамицин и др. Рекомендуется проводить лечение одновременно 2-3 различными антибиотиками, их сочетание с бактримом (бисептол). Для предупреждения рецидивов назначают противобруцеллезный иммуноглобулин. Выраженный терапевтический эффект при хроническом бруцеллезе оказывает лечебная (убитая) вакцина, дозируемая количеством бактериальных клеток в 1 мл. Вакцину чаще вводят внутривенно или внутрикожно.

При бруцеллезе обязательна патогенетическая терапия — десинсибилизирующие препараты, дезинтоксикационные средства. Назначают и симптоматические средства, физиотерапию, санаторно-курортное лечение.

Для предупреждения заболеваемости бруцеллезом проводят противоэпидемические и противоэпизоотические мероприятия с привлечением ветеринарной службы.

В настоящее время вакцинация населения показана только в активных очагах бруцеллеза мелкого рогатого скота. Используют живую бруцеллезную вакцину (вакцинный штамм *B.abortus* 19 ВА), эффективность которого недостаточна, и при попадании в организм больших доз возбудителя может возникнуть заболевание. В то же время отмечено, что у привитых людей, заразившихся бруцеллезом козье-овечьего типа, снижается острота развития инфекционного процесса. В выраженных очагах бруцеллеза крупного рогатого скота вакцинация не рекомендуется, так как вакцина способствует сенсibilизации населения.

Возбудители туляремии

1. Классификация и таксономия

Туляремия (от названия местности Tulare в Калифорнии) — зоонозная инфекционная болезнь с природной очаговостью, вызываемая *Francisella tularensis*, характеризующаяся лихорадкой и поражением лимфатических узлов. Возбудитель болезни открыт в 1911 г. Г.Мак-Коем и Х.Чепином в районе озера Туляре в Калифорнии, изучен Э.Френсисом.

F. tularensis относится к отряду *Gracilicutes*, семейство не определено. Выделяют подвиды *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*.

2. Нозологические формы

Francisella tularensis вызывает туляремию у человека.

3. Эпидемиология и пути передачи

Туляремия — зоонозная инфекция, выделена у многих диких и домашних животных, а также рыб, птиц и земноводных. Основные источники заражения человека — обыкновенные полевки, домовые мыши, водяные крысы, ондатры, а также зайцы. Переносчики инфекции — кровососущие членистоногие: иксодовые и гамазовые клещи, блохи, слепни, комары, москиты. Человек заражается от больных животных, кровососущих членистоногих и объектов окружающей среды. Пути заражения — контактный (через кожу и слизистую

оболочку глаз), трансмиссивный (при укусе переносчика), алиментарный (через ЖКТ), аспирационный (через дыхательные пути). От человека к человеку возбудитель не передается.

F. tularensis длительно сохраняется в окружающей среде, особенно при низкой температуре (8-10 мес.); нестойка к высоким температурам: кипячение убивает немедленно, нагревание до 60 °С вызывает гибель через 20 мин. Бактерии не стойки к обычным дезинфектантам и ионизирующему излучению.

Туляремия распространена в Европе, в том числе в России, а также в Азии, Северной Америке; встречается в виде sporadic случаев или эпидемических вспышек. Болеют чаще жители сельской местности и лица, имеющие профессиональный контакт с грызунами (сельскохозяйственные работы, охота и т. д.).

4. Морфология и тинкториальные свойства

F. tularensis — мелкие (0,1-0,5 мкм) капсулированные полиморфные неподвижные палочки, спор не образуют, жгутиков не имеют. В мазках из культур доминируют кокковидные формы, а в мазках из органов — коккобактерии. Слабо воспринимают анилиновые красители и окрашиваются бледнее, чем другие грамотрицательные бактерии, размножаются почкованием.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Франциселлы — строгие аэробы, оптимальная температура 36-37°С. Бактерии требовательны к составу питательных сред; для их культивирования применяют сложные среды с добавлением экстрактов тканей, крови и антибиотиков, подавляющих рост других микроорганизмов. На твердых средах образуют очень мелкие колонии в виде капелек беловатого цвета с голубоватым оттенком. Колонии вирулентных штаммов по морфологическим и биологическим свойствам соответствуют S-диссоциатам. В жидких средах размножаются хуже и только у поверхности среды, что связано с аэрофильностью бактерий.

6. Антигенная структура

F. tularensis содержит оболочечный Vi-и соматический O-антигены, обнаруживает антигенную близость к бруцеллам.

7. Биохимические свойства

Франциселлы ферментируют углеводы с образованием кислоты, регистрируемым снижением pH. Каталаза положительны; индол не образуют, восстанавливают (обесцвечивают) красители — метиленовый синий, малахитовый зеленый и др. В соответствии с распространенностью и биохимическими особенностями и выделяют подвиды.

Таблица 22. Подвиды франциселл

Название подвида	Биохимические свойства	Распространенность	Патогенность
<i>tularensis</i>	Ферментирует глицерин, содержит цитруллинуреидазу	Распространен в Северной Америке	Высокопатогенен для человека
<i>holarctica</i>	Не ферментирует глицерин, не содержит цитруллинуреидазу	Возбудитель регистрируют в Европе и Азии	Умеренно патогенен для домашних животных и человека
<i>mediasiatica</i>	Ферментирует глицерин, содержит цитруллинуреидазу	В Средней Азии и в дельтах рек Или и Аму-Дарьи	Умеренно патогенны для домашних кроликов и человека

8. Факторы патогенности

Патогенные свойства связаны с Vi-антигеном и с токсическими веществами типа эндотоксина. Возбудитель патогенен для млекопитающих многих видов, особенно для мелких грызунов и зайцев. Из лабораторных животных к нему высокочувствительны морские свинки и белые мыши.

9. Патогенез

В патогенезе туляремии выделяют несколько фаз: внедрение и первичная адаптация возбудителя, лимфогенное распространение, первичные регионарно-очаговые и общие реакции организма, гематогенные метастазы и генерализация процесса, вторичные очаги, реактивно-аллергические изменения, обратный метаморфоз и выздоровление.

Возбудитель туляремии попадает в организм человека через кожу, слизистые оболочки глаз, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта. После проникновения возбудитель распространяется с током лимфы. Фагоциты активно поглощают *F.tularensis*, но не способны к их внутриклеточному уничтожению, что создает предпосылки для депонирования бактерий в лимфатических узлах. Часть возбудителей погибает, что сопровождается выделением эндотоксина, действующего на лимфатический узел и окружающие ткани. Таким образом, развивается стадия очаговых реакций, и формируются туляремийные бубоны. Последние разделяют на первичные (возникают метастатически лимфогенно и связаны с местом входных ворот) и вторичные (связаны с вторичным заносом из первичного бубона). Периодически из сформированных очагов возбудитель проникает в лимфо-и кровоток, что сопровождается выделением новых порций эндотоксина и сенсибилизацией организма. Прорывы бактерий в кровоток могут приводить к метастазированию в печень, селезенку, легкие, костный мозг и другие органы, что обуславливает вторичные поражения (например, вторичную пневмонию, менингит).

Выделяют четыре основные клинические формы туляремии: бубонную, легочную, генерализованную и желудочно-кишечную. В неосложненных случаях заболевание завершает обратный метаморфоз пораженных лимфатических узлов и выздоровление больного.

10. Иммуитет После перенесенной инфекции сохраняется длительно, иногда пожизненно; развивается аллергия к антигенам возбудителя.

11. Методы лабораторной диагностики

Материал для исследования — кровь, пунктат из бубона, соскоб из язвы, отделяемое конъюнктивы, налет из зева, мокрота и др. — определяется клинической формой болезни. Кроме того, на исследование можно брать воду и пищевые продукты. В природных очагах туляремии проводят плановые систематические исследования для выделения возбудителя туляремии от грызунов.

Для диагностики применяют все методы микробиологической диагностики. Исследование проводят в режимных лабораториях.

Бактериологический метод

Бактериологический метод в диагностике туляремии у человека редко дает положительные результаты. Чистую культуру, как правило, выделяют после накопления ее в восприимчивых лабораторных животных. Для биопробы применяют белых мышей и морских свинок. Мышей заражают подкожно, морских свинок — внутрибрюшинно; животные погибают на 3—6-е сутки, иногда позднее. Зараженных животных содержат в особых условиях (как при диагностике чумы) и наблюдают за ними в течение 6—14 дней. Если экспериментальные животные на протяжении 7—15 дней не погибают, их забивают на 15-20-й день и трупы вскрывают. При наличии туляремии обнаруживают патологоанатомические изменения в виде продуктивного процесса с некрозом. Чистую культуру выделяют из внутренних органов на желточной среде, глюкозоцистеиновом кровяном агаре, среде Емельяновой и др. При идентификации опираются на морфологию и тинкториальные свойства возбудителя, отсутствие роста на МПА, агглютинацию гомологичной сывороткой, патогенность для белых мышей и морских свинок. Чистую культуру можно выделить, заражая 12-дневные куриные эмбрионы в желточный мешок. Для выделения чистой культуры возбудителя из воды последнюю центрифугируют или фильтруют через бактериальные фильтры и полученным осадком заражают лабораторных животных. При исследовании пищевых продуктов их промывают мясопептонным бульоном — МПБ, центрифугируют и осадком заражают лабораторных животных.

Параллельно с бактериологическим исследованием из исследуемого материала готовят мазки-отпечатки, которые окрашивают по Романовскому—Гимзе. В мазках из органов можно обнаружить мелкие кокковидные и палочковидные бактерии, которые располагаются внутриклеточно и в виде скоплений, образуя нежную капсулу. Из-за сложности

биологический метод применяется ограничено. В широкой практике чаще используются серологический и аллергический методы.

Серологический метод

Для серодиагностики используют развернутую реакцию агглютинации, реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА), реакцию связывания комплемента (РСК) на холоде, реакцию иммунофлюоресценции (РИФ).

Аллергический метод

Аллергические пробы применяют для ранней диагностики туляремии (с 5-го дня от начала болезни). Используют два вида тулярина и, соответственно, 2 способа их введения: кожный и внутрикожный. Так как концентрация аллергена в обоих видах тулярина различная, недопустимо использовать кожный тулярин для внутрикожной пробы и наоборот. Результаты аллергической реакции учитывают в динамике через 24—36—48 ч. За положительный результат принимают инфильтрат диаметром не менее 5 мм. У вакцинированных или переболевших туляремией лиц в течение ряда лет аллергические пробы остаются положительными (поствакцинальная или анамнестическая реакция).

12. Лечение и профилактика

Применяют антибиотики стрептомицинового и тетрациклинового ряда. В случаях затяжного течения заболевания проводят комбинированную антибиотикотерапию и вакцинотерапию с применением убитой лечебной вакцины, которая вводится различными путями в дозах от 1 до 15 млн микробных тел с интервалом 3—6 дней. Курс лечения 6—10 инъекций.

Проводится в направлении всех трех звеньев эпидемического процесса: мероприятия 1-й группы направлены на источник инфекции; мероприятия 2-й группы — на разрыв механизма и путей передачи; мероприятия 3-й группы — на восприимчивый коллектив. Для специфической профилактики применяют живую туляремийную вакцину, полученную отечественными учеными Б. Я. Эльбертом и Н. А. Гайским из штамма № 15. Вакцина обеспечивает прочный иммунитет при заражении европейским и голарктическим подвидами и эффективна против американской разновидности возбудителя. Вакцинацию проводят по эпидемическим показаниям, а также лицам, относящимся к группам риска. Допускается одновременная вакцинация против туляремии и бруцеллеза; туляремии и чумы; а также против туляремии и некоторых других инфекций.

Не специфическая профилактика такая же, как при других зоонозах, и направлена, в первую очередь, на борьбу с грызунами.

III. План практической работы:

1. Сравнить возбудителей бруцеллеза и туляремии

Сравнить возбудителей, используя материал методических указаний.

2. Поставить и учесть результаты пластинчатой РА по Хеддельсону с сывороткой больного бруцеллезом

Реакцию Хеддельсона ставят на стекле с неразведенной сывороткой и единым бруцеллезным диагностикумом. Обезжиренное стекло расчерчивают на 6 квадратов, затем в 1 квадрате ставят номер испытуемой сыворотки, на 2-3-4 опытные квадраты микропипеткой наносят сыворотку в объемах 0,04-0,02-0,01 мл и добавляют в каждую каплю по 0,03 мл диагностикума. 5-й квадрат — контроль сыворотки (0,02 мл исследуемой сыворотки и 0,03 мл физиологического раствора), 6-й квадрат — контроль диагностикума (0,03 мл бруцеллезного диагностикума и 0,03 мл физиологического раствора).

При положительных реакциях во всех трех опытных дозах сыворотки или в дозах 0,02 и 0,04 мл появляются хлопья, окрашенные в синий цвет.

Схема пластинчатой реакции Хеддельсона

№	0,04 мл исследуемой сыворотки 0,03 мл бруцеллезного диагностикума	0,02 мл исследуемой сыворотки 0,03 мл бруцеллезного диагностикума
0,01 мл исследуемой	Контроль сыворотки:	Контроль диагностикума:

сыворотки 0,03 мл бруцеллезного диагностикума	0,02 мл исследуемой сыворотки 0,03 мл физиологического раствора	0,03 мл бруцеллезного диагностикума 0,03 мл физиологического раствора
---	---	--

3. Поставить и учесть развёрнутую реакцию агглютинации в диагностике бруцеллёза (реакция Райта).

В пяти рабочих пробирках готовят разведения исследуемой сыворотки от 1:50 до 1:800 с парными разведениями. Для этого в первую пробирку вносят 4,9 мл, в остальные четыре по 2,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. В первую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки (получают разведение 1:50), перемешивают, а затем выполняют её титрование, перенося из предыдущей пробирки в последующую по 2,5 мл жидкости. Из пятой пробирки после перемешивания удаляют 2,5 мл жидкости в дезинфицирующий раствор. Во все рабочие пробирки добавляют по 0,5 мл бруцеллезного диагностикума. Готовят **контроли: диагностикума**, включающий 0,5 мл бруцеллезного диагностикума и 2,5 мл изотонического раствора хлорида натрия, и **сыворотки**, содержащий 2,5 мл сыворотки, разведенной 1/50, и 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Пробирки встряхивают и инкубируют при 37°C в течение 2 часов, затем при комнатной температуре — 18-20 часов. Затем проводят учет результатов, начиная с контрольных пробирок. Положительным результат считается в случае образования рыхлого с фестончатыми краями осадка, покрывающего все дно пробирки (осадок в виде «зонтика»), отрицательным — при выпадении компактного с ровными краями осадка, занимающего центр пробирки (осадок в виде «пуговки»). Если в пробирке с контролем сыворотки жидкость прозрачная и в пробирке с контролем диагностикума наблюдается осадок в виде «пуговки» контроли считаются верными, а реакция специфичной. Затем оценивают результат в каждой рабочей пробирке. За титр сыворотки принимают максимальное её разведение, давшее положительный результат. Сравнивают титр антител в исследуемой сыворотке с диагностическим, который для реакции Райта составляет **1:200**. Если титр антител в исследуемой сыворотке равен или превышает диагностический, то выдают положительное заключение, подтверждающее наличие заболевания.

Модуль VI «Зоонозные инфекции»

Занятие №2

ТЕМА: Микробиологическая диагностика чумы и сибирской язвы

Цель занятия: знать основные биологические свойства возбудителей, признаки патогенности, патогенез заболевания, особенности иммунитета, микробиологическую диагностику, специфическую профилактику и лечение.

уметь описывать культуральные свойства колоний, готовить и окрашивать по Граму мазки из исследуемого материала, проводить световую микроскопию с масляной иммерсией, ставить и учитывать реакцию Асколи.

Задание на дом:

I. Вопросы для самоподготовки:

1. Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителя чумы
2. Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителя сибирской язвы

II. Базовый текст

Возбудители чумы

1. Классификация и таксономия

Чума — инфекционное заболевание, характеризующееся сильнейшей интоксикацией, лихорадкой, поражением лимфатических узлов с образованием бубонов, развитием септицемии и пневмонии. Чуму относят к группе карантинных, особо опасных инфекций.

Род *Yersinia* (семейство *Enterobacteriaceae*) включает 11 видов, из которых в патологии человека основное значение имеют 3 вида: возбудитель чумы *Y. pestis* и энтеропатогенные иерсинии: возбудитель псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* и возбудитель кишечного иерсиниоза *Y. enterocolitica*.

Род назван в честь французского бактериолога А. Иерсена, который в 1894 г. совместно с С. Китасато открыл возбудителя чумы. Подразделение внутри рода на виды производится на основе биохимических свойств и подвижности.

2. Нозологические формы

Yersinia pestis вызывает чуму у человека.

3. Эпидемиология и пути передачи

Резервуаром возбудителя природной чумы являются дикие и домашние животные (всего около 300 видов). Основными носителями являются грызуны (сурки, суслики, полевки, песчанки, крысы, зайцы и др.). У грызунов, впадающих зимой в спячку, чума протекает в хронической латентной форме. Эти животные являются источником инфекции в межэпидемический период.

Вторичные очаги, связанные с деятельностью человека, обнаруживаются в географических зонах между 35° северной широты и 35° южной широты. В них источниками и хранителями возбудителя служат домовые виды крыс и мышей, от них заражаются некоторые виды домашних животных, в частности верблюды и, возможно, кошки.

Специфическими переносчиками возбудителя в обоих типах очагов служат блохи. В инфицированной блохе возбудитель размножается в преджелудке, а при кровососании человека попадает в ток его крови.

Таблица 23. Пути заражения чумой

Путь заражения	Характеристика
Трансмиссивный	Через укусы инфицированных блох
Контактный	Разделка шкур и мяса зараженных животных, от больных чумой людей
Алиментарный	При употреблении в пищу недостаточно термически обработанных продуктов, обсемененных чумными бактериями
Воздушно-капельный	От больных легочной чумой

Восприимчивость людей к чуме очень высокая. Индекс контагиозности приближается к единице. Эпидемии чумы обычно следуют за эпизоотиями. В истории человечества известны три пандемии чумы. Первая, «юстинианова чума» свирепствовала в странах Ближнего

Востока, Европы в VI в. и вызвала гибель около 100 млн человек. Вторая пандемия, известная под названием «черная смерть», была занесена из Азии в Европу в 1348 г.; она унесла жизни более 50 млн. человек, т. е. четверти населения Европы. Третья пандемия началась в 1894 г. в Кантоне и Гонконге; особенностью этой пандемии явилось то, что она охватывала только портовые города, не распространяясь за их пределы. Природные очаги чумы существуют и сейчас на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды. В настоящее время ежегодно регистрируется несколько сот случаев чумы человека. В России такими очагами являются регионы Закавказья, Поволжья.

4. Морфология и тинкториальные свойства

Y. pestis, представляет собой неподвижную палочку овоидной формы, размером 1,5x0,7 мкм, с биполярным окрашиванием анилиновыми красителями. Образует нежную капсулу. В мазках из клинического материала палочки могут располагаться цепочками, в мазках из бульонных культур — беспорядочно. Палочки склонны к полиморфизму, образуя нитевидные, колбовидные или шарообразные инволюционные формы.

5. Питательные среды и культуральные свойства

Факультативный анаэроб. Растет на простых питательных средах. Оптимальная температура роста 28 °С, но может расти в широком диапазоне температур от 2 до 40 °С. Для ускорения роста в питательные среды добавляют стимуляторы, сульфит натрия и гемолизированную кровь. При росте на плотных питательных средах через 8 — 12 ч появляются колонии в виде «битого стекла». Через 18—20 ч инкубации вирулентные бактерии образуют колонии в R-форме, которые имеют форму «кружевных платочков»: со светлым центром и фестончатыми краями. Менее вирулентные бактерии образуют колонии в S-форме. На жидких средах бактерии растут в виде пленки, от которой спускаются нити, напоминающие пещерные сталактиты; на дне образуется хлопьевидный осадок.

6. Антигенная структура

Обладает комплексом антигенов, многие из которых относятся к факторам патогенности.

Таблица 24. Антигены *Y. pestis*

Антиген	Характеристика
антиген F1	Расположен в капсуле, основной компонент поверхностной структуры клетки, имеет гликопротеиновую природу
V-антиген	Белок, предположительно находится в цитоплазме
W-антиген	Липополисахаридный комплекс, расположен в наружной мембране клеточной стенки
pH6-антиген	Синтезируется при температуре 37 °С и низком значении pH среды; подавляет фагоцитоз, оказывая цитотоксическое действие на макрофаги

7. Биохимические свойства

Биохимическая активность достаточно высокая. Синтезирует плазмокоагулазу, фибринолизин, гемолизин, лецитиназу, РНКазу. Основные биохимические свойства, необходимые для идентификации:

- не разжижает желатину, не расщепляет мочевины,
- не ферментирует рамнозу и сахарозу,
- ферментирует декстрин.

По отношению к утилизации глицерина подразделяется на хемовары.

8. Факторы патогенности

Y. pestis обладает многочисленными факторами патогенности, генетическая детерминация которых осуществляется как хромосомой, так и тремя плазмидами: pPst (6 мДа), pCad (45 мДа), pFra (60 мДа).

Синтез ферментов патогенности: фибринолизина и плазмокоагулазы, а также пестицина детерминирует pPst плазида; синтез F1-антигена, который препятствует поглощению микроба фагоцитами, детерминируется pFra плазмидой; этой же плазмидой детерминируется синтез F2-фракции, «мышинного токсина», функция которого окончательно

не ясна. Известно, что он обладает способностью блокировать адренергические рецепторы и ингибировать дыхательную активность митохондрий, понижая активность НАДФ-редуктазы.

Синтез V-и W-антигенов, обеспечивающих способность бактерий сохраняться в фагоцитах, детерминирует **pCad** плазида. К факторам патогенности, обеспечивающим антифагоцитарную активность микроба, относят также внеклеточную аденилатциклазу и цитохромоксидазу, а также пигмент, связывающий гемин и способность к синтезу эндогенных пуринов.

9. Патогенез

Зависит от пути заражения. При контактном пути, проникая через неповрежденную кожу, и трансмиссивном пути заражения возбудитель с током лимфы заносится в регионарные лимфатические узлы, где происходит его размножение. Вследствие незавершенности фагоцитоза в лимфатических узлах развивается серозно-геморрагическое воспаление, с развитием бубона, т. е. увеличенного лимфатического узла, иногда достигающего размеров куриного яйца. Так возникает первичная бубонная форма. Утрата лимфатическим узлом барьерной функции приводит к генерализации процесса. Возбудитель разносится гематогенно в отдаленные лимфатические узлы, где формируются вторичные бубоны, а также в органы, где развиваются септико-пиемические очаги. Гематогенный занос чумных микробов в легкие приводит к развитию вторично-легочной формы заболевания, которая характеризуется развитием пневмонии с обильным серозно-геморрагическим экссудатом, содержащим большое число микробов. При воздушно-капельном заражении возникает первично-легочная форма, а при контактном и алиментарном путях заражения развиваются соответственно кожная и, в редких случаях, кишечная формы заболевания.

Инкубационный период — от нескольких часов до 2—6 дней, у привитых — до 10 дней. Заболевание начинается остро: температура тела повышается до 39°C и выше, возникает озноб, наблюдаются явления интоксикации, которая проявляется резкой головной болью, разбитостью, мышечными болями, помрачением сознания. Больной возбужден. При бубонной форме на 1—2-й день болезни появляется лимфаденит (чумной бубон). Различают несколько клинических форм чумы: кожную, бубонную, первично-и вторично-септическую, первично-и вторично-легочную формы. Летальность до применения антибиотиков при диссеминированных формах чумы достигла 100 %, при локальных формах — до 70 %; при антибиотикотерапии достигает 10 %.

10. Иммуитет

Иммуитет может быть различной длительности и напряженности. Отмечены случаи повторных заболеваний. Протективная активность обеспечивается главным образом клеточным иммунным ответом, реализующимся через иммунные макрофаги. Роль антител считается второстепенной.

11. Методы лабораторной диагностики

Используют бактериоскопический, бактериологический, биологический и серологический методы исследования, которые проводят в специальных лабораториях, работающих в соответствии с инструкциями о режиме работы противочумных учреждений. Материалами для исследования являются: пунктаты бубонов, мокрота, отделяемое карбункулов и язв, кровь, моча, рвотные массы, трупный материал.

Бактериоскопическое исследование. Из взятого материала готовят мазки и фиксируют их в смеси Никифорова. Мазки окрашивают по Граму и метиленовым синим по Леффлеру (для выявления биполярной окраски). При обнаружении в мазках грамотрицательных мелких бактерий овоидной формы, окрашенных биполярно, выдают предварительно положительный результат. В качестве экспресс-диагностики используют прямую РИФ, позволяющую поставить предварительный диагноз уже через 2 ч.

Бактериологическое исследование. Материал засевают на питательные среды (МПА, бульон Хоттингера, элективные среды). Для стимуляции роста в питательный агар добавляют кровь кролика или лошади — цельную или гемолизированную и сульфит натрия, который также подавляет рост посторонней микрофлоры. В качестве ингибитора посторонних бактерий добавляют и генцианвиолет. При росте на плотных питательных средах через 8 — 12

ч появляются колонии в виде «битого стекла». Через 18—20 ч инкубации вирулентные бактерии образуют колонии в R-форме, которые имеют форму «кружевных платочков»: со светлым центром и фестончатыми краями. В бульоне образуется рыхлая пленка, от которой спускаются нити; на дне образуется хлопьевидный осадок.

Выделенную чистую культуру идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам, по чувствительности к чумному бактериофагу и патогенности для животных.

Серологическое исследование проводится с целью выявления специфических антител в реакциях непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментного анализа (ИФА), реакции нейтрализации (РН).

Биологическое исследование проводят одновременно с другими методами. Ставят биопробу на морских свинках и белых мышах внутрибрюшинно, подкожно или наочно. Из крови и внутренних органов делают мазки-отпечатки для микроскопического исследования. При вскрытии учитывают патологические изменения: воспаление лимфатических узлов, геморрагически-некротические очаги в селезенке и других органах, экссудаты в полостях.

12. Лечение и профилактика

Больные чумой подлежат строгой изоляции и обязательной госпитализации. Для лечения используют этиотропную антибиотикотерапию (стрептомицин, тетрациклин и др.). Прогноз неблагоприятный, так как при генерализованных формах болезни летальность может достигать 100 %.

Специфическая профилактика осуществляется живой вакциной из штамма EV. После вакцинации развивается иммунитет продолжительностью до 6 месяцев. Вакцина вводится однократно наочно или подкожно с помощью безыгольного инъектора; разработана таблетированная живая вакцина из штамма EV для перорального применения, а также аэрозольная вакцина.

Большое значение имеет не специфическая профилактика, которая включает: предупреждение заболевания людей и возникновения эпизоотии в природных очагах, предупреждение завоза чумы на территорию страны, которое осуществляется согласно специальным «Международным санитарным правилам»; предупреждение заражения лиц, работающих с заразным *Y. pestis* материалом, осуществляемое регламентом работы противочумных учреждений. Вся работа с заразным *Y. pestis* материалом и в госпиталях для больных чумой должна проводиться в специальных защитных противочумных костюмах с соблюдением строгого порядка их надевания и снятия. В случае появления больного чумой проводятся карантинные мероприятия.

Возбудители сибирской язвы

1. Классификация и таксономия

Сибирская язва (anthrax, злокачественный карбункул) — острая антропозоонозная инфекционная болезнь, вызываемая *Bacillus anthracis*, которая характеризуется тяжелой интоксикацией, поражением кожи, лимфатических узлов и других органов и высокой летальностью. Возбудитель — *B. anthracis* — относится к семейству *Bacillaceae*, отдел *Firmicutes*.

Заболевание сибирской язвой известно с глубокой древности, со времен Гиппократ, Галена и Цельса заболевание известно под названиями «священный огонь» или «персидский огонь». Болезнь впервые была описана русским врачом С. С. Андриевским в XVIII в. во время эпидемии на Урале.

2. Нозологические формы

Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* выделен Р. Кохом в 1876 г.; относится к роду *Bacillus*.

3. Эпидемиология и пути передачи

Сибирская язва распространена повсеместно, особенно в районах с развитым животноводством. Источник инфекции — больные животные, чаще всего крупный рогатый скот, овцы, козы, лошади, олени, буйволы, верблюды и свиньи. Резервуар возбудителя —

почва. Человек является биологическим тупиком. Как и для всех зоонозов, для сибирской язвы характерна множественность механизмов, путей и факторов передачи. Человек заражается чаще всего контактным путем, реже — алиментарно, аэрогенно и другими путями.

Таблица 25. Пути заражения сибирской язвой

Путь заражения	Характеристика
Трансмиссивный	Через укусы оводов, мух-жигалок
Контактный	При уходе за больными животными, убое, переработке животного сырья
Алиментарный	При употреблении в пищу недостаточно термически обработанных животноводческих продуктов
Воздушно-пылевой	См. контактный путь передачи

Восприимчивость к возбудителю относительно невысокая.

В настоящее время в России сибирская язва встречается sporadически, редко в виде локальных вспышек. Но имеется постоянная угроза нарушения скотомогильников при строительстве, земляных работах, во время паводков, при подмывании берегов рек и водохранилищ, что способствует распространению инфекции.

4. Морфология и тинкториальные свойства

Сибиреязвенные бациллы — очень крупные (5-10x1-2 мкм) грамположительные палочки с обрубленными концами, в мазке из чистой культуры располагаются в виде длинных цепочек (стрептобациллы), слегка утолщенных на концах и образующих сочленения («бамбуковая трость»). Неподвижны. Образуют расположенные центрально споры, а также капсулу. В клиническом материале располагаются парами или короткими цепочками, окруженными общей капсулой. Капсулы образуются только у бактерий, выделенных из организма, либо выращенных на питательной среде, содержащей нативную сыворотку. Капсулы более устойчивы к действию гнилостной микрофлоры, чем бактериальные клетки, и в материале из гнилых трупов нередко можно обнаружить лишь пустые капсулы («тени» микробов). Для обнаружения капсул мазки окрашивают методом Бури-Гинса (клетки — малиново-красные, капсулы — прозрачные). Споры сибиреязвенных бацилл — овальной формы, размером 0,8-1,0x1,5 мкм, сильно преломляют свет. В живом организме и невскрытом трупе споры не образуются, что обусловлено поглощением свободного кислорода в процессе гниения; для спорообразования необходим свободный кислород и определенная температура (12—42 °С).

5. Питательные среды и культуральные свойства

Аэробы. Хорошо растут на простых питательных средах (МПА, МПБ), бактерии можно выращивать на сыром или вареном картофеле, настое соломы, экстрактах злаков и бобовых в диапазоне температур 12—45 °С; температурный оптимум роста на плотной среде — 35-37 °С, на жидкой — 32-33 °С. Оптимум рН 7,2—8,6. На жидких средах дает придонный рост в виде комочка ваты, не вызывая помутнения среды; на плотных средах образует крупные, с неровными краями, шероховатые матовые колонии (R-форма). Под лупой колонии напоминают гриву льва или голову медузы. На свернутой лошадиной сыворотке растет в виде гладких прозрачных S-форм колоний, тянущихся за петлей. На средах, содержащих 0,05-0,5 ЕД/мл пенициллина, сибиреязвенные бациллы через 3—6 ч роста образуют сферопласты, расположенные цепочкой и напоминающие в мазке жемчужное ожерелье (тест «жемчужного ожерелья»). При посеве уколом в желатину дает характерный рост в виде «перевернутой елочки».

6. Антигенная структура

Содержит родовой соматический полисахаридный антиген и видовой белковый капсульный антиген. Образует белковый экзотоксин, обладающий антигенными свойствами. Капсульные антигены и экзотоксин кодируются плазмидами, потеря которых делает бактерии авирулентными.

- Капсульные антигены представлены полипептидами, соединенными с молекулами D-глутаминовой кислоты. По капсульным антигенам выделяют единственный серовар, антитела к капсульным антигенам не обладают протективным действием.

- Соматический антиген представлен полисахаридами клеточной стенки, антитела к нему не обладают протективным действием.

Сибирезвенный экзотоксин имеет сложную структуру и включает в себя протективный антиген.

7. Биохимические свойства

Достаточно высокая биохимическая активность: ферментирует до кислоты глюкозу, сахарозу, фруктозу, мальтозу, крахмал, инулин, характеризуется протеолитической и липолитической активностью. Гидролизует крахмал, образует ацетилметилкарбинол. Выделяет желатиназу, обладает слабой гемолитической, лецитиназной и фосфатазной активностью. В отличие от почвенных бацилл практически лишены фосфатазы и не разлагают фосфаты, содержащиеся в питательной среде. Очень медленно и слабо коагулируют жидкую желточную среду (5-7 суток при 37 °С), в то время как почвенные бациллы разлагают ее за 6-10 ч. Молоко свертывают за 3-5 суток, затем сгусток медленно пептонизируется и разжижается; выделяется аммиак и накапливается бурый пигмент.

8. Факторы патогенности

Патогенен для человека и многих животных (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, свиньи, дикие животные). Вирулентные штаммы в восприимчивом организме синтезируют большое количество капсульного вещества, обладающего выраженной антифагоцитарной активностью, и сложный экзотоксин, который представляет собой белковый комплекс, состоящий из вызывающего *отек* (проявляет эффект аденилатциклазы, повышает концентрацию цАМФ и вызывает отеки), *протективного* и *летального* компонентов (проявляет цитотоксический эффект и вызывает отек легких). Эти компоненты по отдельности не способны проявлять токсическое действие.

9. Патогенез

Входными воротами возбудителя сибирской язвы в большинстве случаев являются поврежденная кожа, значительно реже — слизистые оболочки дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. В основе патогенеза лежит действие экзотоксина возбудителя, отдельные фракции которого вызывают коагуляцию белков, отек тканей, приводят к развитию токсико-инфекционного шока. На месте внедрения возбудителя в кожу развивается сибирезвенный карбункул — очаг геморрагически-некротического воспаления глубоких слоев дермы на границе с подкожной клетчаткой, сопровождающийся отеком и деструкцией тканей; в центре очага — некроз кожи с образованием буро-черной корки (*anthrax* — уголь), сопровождающейся отеком. Возбудитель из входных ворот заносится макрофагами в регионарные лимфатические узлы, в которых развивается воспаление без серьезных нарушений барьерной функции, в силу чего генерализация процесса не наступает или наступает в относительно поздние сроки от начала воспалительного процесса. При вдыхании пылевых частиц, содержащих сибирезвенные споры, макрофаги захватывают возбудителя со слизистой дыхательных путей и заносят в трахеобронхиальные лимфатические узлы, в которых развивается воспаление с исходом в тотальный некроз, способствующий гематогенной генерализации инфекции.

Продолжительность инкубационного периода сибирской язвы — от нескольких часов до 12 дней, в среднем 2—3 дня. Клиническая картина обусловлена характером пораженных органов. Различают кожную, легочную и кишечную клинические формы сибирской язвы, которые могут закончиться сепсисом. Генерализованные формы в 100 % случаев заканчиваются летально; при кожной форме летальность не превышает 5 %.

10. Иммуитет

После перенесенного заболевания развивается стойкий перекрестный клеточно-гуморальный иммунитет, хотя отмечаются отдельные случаи повторного заболевания.

11. Методы лабораторной диагностики

Материалом для исследования служат: содержимое карбункула и пузырьков, мокрота, испражнения, кровь и моча. При патолого-анатомическом исследовании забирают кусочки органов или целые органы. По эпидемиологическим показаниям исследуют различные объекты внешней среды, а также шерсть и щетину животных. Все образцы помещают в

герметичные сосуды и транспортируют закупоренными в опломбированных боксах или деревянных ящиках в лабораторию особо опасных инфекций.

Микробиологическую диагностику проводят с соблюдением правил техники безопасности как при особо опасных инфекциях. Для диагностики применяют все методы микробиологической диагностики.

Бактериоскопический метод

Первоначально из материала готовят мазки и окрашивают их по Граму и для обнаружения капсул (по Бури-Гинсу) и спор (по Ауэске). Наличие в мазках крупных грам-положительных стрептобацилл, окруженных капсулой, дает возможность поставить предварительный диагноз. Люминесцентная микроскопия применяется как дополнительный метод диагностики сибирской язвы, при этом сибиреязвенные бациллы, обработанные люминесцирующей сывороткой, выглядят как палочки с ободком, светящиеся зеленоватым светом.

Бактериологический метод

Для выделения чистой культуры исследуемый материал засевают на МПА и МПБ, а также заражают лабораторных животных (белые мыши, морские свинки). Выделенную чистую культуру идентифицируют по общепринятой схеме с учетом морфологии, характера роста на МПА и МПБ, разжижения желатина в виде перевернутой елочки, отсутствия подвижности, положительного теста «жемчужного ожерелья» и лизиса сибиреязвенным бактериофагом «ВА-9» и «Саратов». Дополнительно определяют лецитиназную, фосфатазную и гемолитическую активность.

Биологический метод

В биопробе патологический материал или испытуемую культуру вводят подкожно: морским свинкам в паховой области, мышам в корень хвоста. Обычно мыши погибают через 1—2 суток, морские свинки — через 2—4 суток. Наблюдение за животными продолжают в течение 10 дней. У павших животных исследуют печень, селезенку, лимфатические узлы, почки, кровь из полостей сердца, места введения исследуемого материала. О наличии возбудителя сибирской язвы свидетельствуют типичная патолого-анатомическая картина у подопытных животных: отек в месте введения исследуемого материала, темная, не свернувшаяся кровь, кровоизлияния в клетчатке, рыхлая селезенка и плотная красная печень. В мазках-отпечатках из органов и крови — наличие грамположительных капсулированных палочек.

Серологический метод

Серодиагностика проводится в тех случаях, когда не удается обнаружить возбудителя в материале. Для определения антител в сыворотке крови больного используют реакцию латексной агглютинации или РПГА с протективным сибиреязвенным АГ. Сибиреязвенные антигены определяют в РИФ, ИФА, РСК, РИГА, РП в геле и реакции термореципитации по Асколи. Реакция Асколи имеет большое значение, так как позволяет обнаружить возбудитель при отрицательных результатах бактериологического исследования. Наличие сибиреязвенного антигена в разложившемся или мумифицированном трупе животного, коже (свежей, сухой, выделанной) и изделиях из нее, шкурках, мехе, шерсти определяют с помощью реакции термореципитации по Асколи. Однако для прижизненной диагностики она не дает серьезных преимуществ перед бактериологическим и серологическим методами.

Для ретроспективной диагностики при эпидемиологических исследованиях ставят кожные аллергические пробы с антраксином. Антраксин вводят внутрикожно объемом 0,1 мл, результаты учитывают через 24—48 ч. Пробу считают положительной при наличии гиперемии диаметром более 16 мм и инфильтрата.

12. Лечение и профилактика

Применяют антибиотики и сибиреязвенный иммуноглобулин. Для антибактериальной терапии препарат выбора — пенициллин, при его непереносимости — тетрациклин.

Профилактика проводится в направлении всех трех звеньев эпидемического процесса: мероприятия 1 группы направлены на источник инфекции, мероприятия 2 группы — на разрыв механизма и путей передачи, мероприятия 3 группы — на восприимчивый коллектив. Для специфической профилактики применяется живая сибиреязвенная вакцина СТИ

(Санитарно-технический институт). Иммунизацию проводят по эпидемическим показаниям группам риска. Для экстренной профилактики назначают сибирезвенный иммуноглобулин. Не специфическая профилактика такая же, как и при всех зоонозах, и сводится в основном к санитарно-ветеринарным мероприятиям:

1. Изоляция больных и подозрительных животных.
2. Сжигание трупов погибших животных и зараженных объектов (подстилка, навоз).
3. Обеззараживание мест содержания больных животных.
4. Очистка водопоев.
5. Осушение заболоченных участков (перепашивание, хлорирование).
6. Организация скотомогильников. При невозможности сжигания трупов их хоронят на отдельных сухих и пустынных участках; глубина ямы должна быть не меньше 2 м, труп кладут на толстый слой хлорной извести и засыпают ею сверху слоем до 10 см. Все мероприятия по захоронению следует проводить с соблюдением санитарных норм.
7. Санитарный надзор за предприятиями, занятыми переработкой животного сырья. Все поступающее сырье проверяют в реакции термореципитации по Асколи, меховые изделия изготавливают только из сырья, давшего отрицательный результат в этой реакции.

III. План практической работы:

1. Сравнить возбудителей чумы и сибирской язвы

Сравнить возбудителей, используя материал методических указаний.

2. Микроскопировать готовые окрашенные препараты с «возбудителями чумы», зарисовать и описать их морфологические и тинкторильные свойства

Y.pestis представляет собой граммотрицательную овоидную короткую палочку, для которой характерно биполярное окрашивание.

3. Изучить и описать культуральные свойства вакцинного штамма *Бацилл сибирской язвы (СТИ)* на МПА

На МПА через сутки образуются крупные, с неровными краями, шероховатые матовые R-колонии 3-5 мм в диаметре. Колонии напоминают гриву льва или голову медузы.

4. Приготовить мазок из культуры вакцинного штамма *СТИ*, окрасить по Граму, микроскопировать, зарисовать

Метод окраски по Граму

1.	На фиксированный мазок поместить фильтровальную бумажку, пропитанную генцианвиолетом, смочить водой, 2-3 минуты.
2.	Снять бумажку, слить с препарата оставшуюся краску и налить раствор Люголя на 1 минуту.
3.	Для дифференцирования нанести на мазок этиловый спирт и обесцветить в течение 30-60 с, промыть водой.
4.	Нанести фуксин Пффейфера (водный раствор фуксина) и докрасить 1-2 мин, промыть водой, высушить.

Порядок проведения иммерсионной микроскопии (см. п.2).

Возбудитель сибирской язвы — *B.anthraxis* — представляет собой крупные грамположительные палочки с обрубленными концами, располагающиеся цепочками. Во внешней среде образуют центрально расположенные споры, не превышающие диаметра вегетативной клетки.

5. Поставить и учесть реакцию кольцепреципитации по Асколи в диагностике сибирской язвы (с целью обнаружения антигенов возбудителя сибирской язвы в исследуемом материале).

Из органов трупа животного (селезенки, участков воспаления и геморрагий кишечной стенки, легких) готовят термоэкстракт, путем кипячения в изотоническом растворе хлорида натрия и фильтрации, возможно содержащий термостабильный антиген возбудителя сибирской язвы. Реакцию ставят в узких преципитационных пробирках, внося равные объемы (0,3-0,5 мл) каждого компонента, причем второй компонент реакции осторожно накладывают на первый, наклоняя пробирку под углом 45°.

Реакция ставится согласно схеме (таблица).

Ингредиенты	Рабочая пробирка	Отрицательный контроль сыворотки	Положительный контроль сыворотки	Контроль термоэкстракта
Исследуемый материал (термоэкстракт из органов животного)	+			+
Диагностикум (стандартный сибирезвенный антиген)			+	
Преципитирующая сибирезвенная сыворотка (на дно)	+	+	+	
Нормальная сыворотка животного (на дно)				+
Изотонический раствор NaCl		+		

В случае наличия антигенов возбудителя сибирской язвы в термоэкстракте на границе между жидкостями появляется мутно-белое кольцо преципитата не позднее, чем через 15 минут.

IV. Примеры ситуационных задач

Ситуационная задача № 1

Работник животноводческой фермы обратился к врачу с жалобами на лихорадку, озноб, головную боль, карбункул на наружной поверхности предплечья и сильный отек всего предплечья. Укажите диагноз и форму заболевания.

1. чума
2. кожная форма
3. сибирская язва
4. легочная форма

Ситуационная задача № 2

Ветфельдшер обратился к врачу с жалобами на потливость, волнообразную лихорадку, головную боль, боли в мышцах и суставах. Перечислите серологические реакции, которые можно применить для уточнения диагноза.

1. Реакция агглютинации Райта
2. Реакция Хеддельсона
3. Реакция кольцепреципитации по Асколи

Теоретические вопросы для рубежного контроля знаний

1. Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителя бруцеллеза
2. Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителя туляремии
3. Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителя чумы
4. Характеристика биологических свойств и особенностей микробиологической диагностики возбудителя сибирской язвы

Перечень практических навыков

1. Поставить и учесть результаты пластинчатой реакции агглютинации по Хеддельсону с сывороткой больного бруцеллезом
2. Поставить и учесть развёрнутую реакцию агглютинации в диагностике бруцеллёза (реакция Райта)
3. Микроскопировать готовые окрашенные препараты с «возбудителями чумы», зарисовать и описать их морфологические и тинкторильные свойства
4. Изучить и описать культуральные свойства вакцинного штамма бацилл сибирской язвы (СТИ) на МПА
5. Приготовить мазок из культуры вакцинного штамма СТИ, окрасить по Граму, микроскопировать, зарисовать

6. Поставить и учесть реакцию кольцепреципитации по Асколи в диагностике сибирской язвы (с целью обнаружения антигенов возбудителя сибирской язвы в исследуемом материале)

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология // М.: Мед. информ. агенство, 2002, 736 с.
 2. Борисов Л.В., Кузьмин-Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С., Федорова З.В. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии // М.: Медицина, 1994, 252 с.
 3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник / Под ред. А.А. Воробьева. –М.: Медицинское информационное агентство, 2004. –691 с.: ил.
 4. Медицинская микробиология // Под ред. В.И. Покровского, О.К. Поздеева. –Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2001, 768 с.
 5. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии // Под ред. В.В.Теца.-М.: Медицина, 2002, 352 с.
 6. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А.Воробьева, А.С.Быкова –М.: Медицинское информационное агентство, 2003. –236 с.; ил.
 7. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология // Санкт-Петербург: Спец. Литература, 2000, 591 с.
 8. Тимаков В.Д., Левашев В.С., Борисов Л.Б. Микробиология // М.: Медицина, 1994, 528 с.
 9. Микробиология : учеб. пособие / В. В. Лысак. –Минск : БГУ, 2007. –430 с.
 10. Гурина С.В., Соколова И.П., «Микробиология», СПб, 2000 г.
 11. Прозоркина Н.В., Рубашкина Л.А., «Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии», Ростов-на-Дону, 2002 г.
 12. А.Н.Маянский Микробиология для врачей.-Нижний Новгород : изд -во НГМА, 1999.
 13. Проблемы инфектологии / Под ред. С.В.Прозоровского.-М., 1991.
 14. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М.: Мир, 2002.
 15. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. М.: Издательский центр «Академия», 2003.
 17. Емцев, В. Т. Микробиология / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. М.: Дрофа, 2005.
 18. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов [и др.]. М.: Издательский центр «Академия», 2005. –415 с.
 19. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта [и др.]. М.: Мир, 1997. Т. 1–2.
 20. Levinson, W. Medical Microbiology and Immunology [Text] : Examination and Board Review; the 5th Edition / W. Levinson, E. Jawetz. –Prentice-Hall International Inc., 2000. –546p.
 21. Medical Microbiology [Text] / Edited by D. Greenwood, R. Slack, J.F. Peutherer; the 16th Edition. –Churchill Livingstone, 2002. –710 p.
 22. Microbiology and infectious diseases (The National (USA) medical series for independent study) [Text] / Edited by Gabriel T. Virella; the 3rd Edition. –Williams and Wilkins, 1999. –576 p.
 23. Nester, E.W. Microbiology: A Human Perspective [Text] / E.W. Nester, C.E. Roberts, M.T. Nester. –Wm. C. Brown Publishers (WCB), 2001. –568 p.
 24. Rabson, A. Really Essential Medical Immunology [Text] / A. Rabson, I.M. Roitt, P.J. Delves; the 2nd Edition. –Blackwell Publishing, 2006. –320 p.
 25. Textbook of Microbiology [Text] / Edited by C.K.J. Paniker; the 17th Edition. –Orient Longman, 2005. –658 p.
- Интернет**
26. <http://www.cme.msu.edu/Bergeys/> –Bergey’s Manual Trust. Headquarters at Michigan State University.
 27. <http://www.microbeworld.org/home.htm> –© 2002 American Society for Microbiology.
 28. <http://www.bact.wisc.edu/Bact303mainpage> –© 2003, Dr.Kenneth T. (University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology)